

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Alenka GUČEK

**MERITVE ELEMENTARNIH DOGODKOV
URAVNAVANE EKSOCTOZE V ASTROCITIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Alenka GUČEK

**MERITVE ELEMENTARNIH DOGODKOV URAVNAVANE
EKSOCITOZE V ASTROCITIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**MEASUREMENTS OF UNITARY EXOCYTIC EVENTS IN
ASTROCYTES**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 40. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 5. 6. 2013 je bila izdana odločba, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje: znanosti o celici. Za mentorja je bil imenovan akademik prof. dr. Robert Zorec, univ. dipl. biol., za somentorja pa zn. sod. dr. Jerneja Jorgačevskega.

Doktorsko delo je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Bioznanost, znanstvenega področja: znanosti o celici. Opravljeno je bilo v LN-MCP na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: viš. znan. sod. dr. Matjaž STENOVEC

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Član: izr. prof. dr. Matjaž JERAS

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

Datum zagovora: 16. 6. 2015

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Alenka GUČEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dd
DK	UDK 6:616:612.397(043.3)=163.6
KG	eksocitoza/membranska fuzija/astrociti/STED mikroskopija/mikroskopija SIM/elektrofiziologija/membranska kapacitivnost/fuzijska pora/botulinusni toksini/holesterol/elektrostatične interakcije
AV	GUČEK, Alenka uni. dip. biokem.
SA	ZOREC, Robert (mentor)/JORGAIČEVSKI, Jernej (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni študij Bioznanosti, področje znanosti o celici
LI	2015
IN	MERITVE ELEMENTARNIH DOGODKOV URAVNAVANE EKSOCITOZE V ASTROCITIH
TD	Doktorska disertacija
OP	XI, 71 str., 19 sl., 128 vir.
IJ	SI
JJ	sl/en
AI	Astrociti sodelujejo pri prenašanju signala v sinaptični špranji tako s skladiščenjem nevrottransmiterjev kot s sproščanjem glijotransmiterjev. Da bi raziskali lastnosti uravnavane eksocitoze, smo s superločljivostnima mikroskopijama STED in SIM identificirali velikosti mešičkov z glijotransmiterji, nato pa preučili, kako se posamezni mešički zlivajo s plazmalemo z meritvami membranske kapacitivnosti (C_m). Rezultati so pokazali, da se aminokislinski (glutamat in D-serin) ter peptidergični (nevrotropni dejavnik možganskega izvora (BDNF) in atrijski natriuretični peptid (ANP)) glijotransmiterji skladiščijo v mešičkih s premerom ~ 70 nm, medtem ko je adenzin trifosfat (ATP) v mešičkih s premerom ~ 200 nm. Meritve C_m so pokazale, da se oba velikostna razreda mešičkov zlivata s plazmalemo različno. Manjši mešički s premerom ~ 70 nm se v spontanah pogojih zlivajo s plazmalemo prehodno, kjer se fuzijska pora reverzibilno odpira in zapira. Ko astrocitate stimuliramo z zunajceličnim ATP, ki poveča znotrajcelično koncentracijo prostih Ca^{2+} ionov, se poveča frekvenca odpiranja fuzijskih por in podaljša se povprečni čas odprte fuzijske pore, kar poveča verjetnost izstopa glijotransmiterjev. Nasprotno se večji mešički v spontanah pogojih zlivajo s plazmalemo s prehodno fuzijo z ozkimi fuzijskimi porami. Po stimulaciji se fuzijska pora ireverzibilno razširi do popolne fuzije, ki omogoči hkraten izstop celotne vsebine mešička. Proces uravnavane eksocitoze v astrocitih je odvisen od Ca^{2+} , proteinov SNARE in holesterola, na fuzijsko poro pa dodatno vplivajo elektrostatske interakcije.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Dn
DC	UDK 6:616:612.397(043.3)=163.6
CX	Exocytosis/membrane fusion/astrocytes/STED microscopy/SIM microscopy/electrophysiology/membrane capacitance/fusion pore/botulin toxins/cholesterol/electrostatic interactions
AU	GUČEK, Alenka
AA	ZOREC, Robert (supervisor)/JORGAVEVSKI, Jernej (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, scientific field Cell Science
PY	2015
TI	MEASUREMENTS OF UNITARY EXOCYTIC EVENTS IN ASTROCYTES
DT	Doctoral dissertation
NO	XI, 71 p., 19 fig., 128 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Astrocytes are involved in synaptic signal transduction by storing excess neurotransmitters from synaptic cleft and by actively releasing gliotransmitters. To investigate regulated exocytosis we used STED and SIM superresolution microscopies to anatomically determine gliotransmitter vesicles and membrane capacitance measurements (C_m) to monitor unitary exocytotic events of vesicle fusion with plasmalemma. We show that gliotransmitters glutamate, D-serine, atrial natriuretic peptide (ANP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are stored in small, ~70 nm diameter vesicles whereas ATP is stored inside larger, ~200 nm diameter vesicles. C_m revealed the two different sized vesicle populations respond differently to stimulation with ATP, which increases intracellular Ca^{2+} concentration. Small vesicles exhibit transient fusion in spontaneous conditions, which frequencies and dwell time increase after stimulation with ATP, enabling enhanced vesicle cargo discharge. Larger 200 nm diameter vesicles have narrow fusion pores in spontaneous conditions, which prevent gliotransmitters discharge. Upon stimulation with ATP these fusion pores irreversible widen and vesicle merges with the plasmalemma, releasing whole content at once. Monitored exocytotic events are Ca^{2+} - and SNARE protein-dependent. Moreover, membrane depletion of cholesterol prevents fusion of vesicles with plasmalemma, suggesting an important role of this lipid in membrane fusion process. Additionally, electrostatic interactions affect the transitions between different fusion pore discrete states.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO SLIK	VIII
SLOVARČEK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ASTROCITI	3
2.2 URAVNAVANA EKSOCITOZA	4
2.2.1 Proteini v uravnavani eksocitozi	5
2.2.1.1 Nekanonični proteini SNARE	6
2.2.1.2 Botulinusni nevrotoksini	6
2.2.1.3 Peptid dnSNARE	8
2.2.2 Lipidi v uravnavani eksocitozi	8
2.3 EKSOCITOZA V ASTROCITIH	9
2.3.1 Glijotransmiterji	9
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 POTEK DELA	13
3.1.1 Priprava celičnih kultur astrocitov	13
3.1.2 Priprava akutno izoliranih astrocitov	14
3.1.3 Vnos plazmidne DNA in peptidnih toksinov v sesalske celice	14
3.1.4 Imunocitokemija	14
3.1.5 Označevanje celic z MANT-ATP, kvinakrinom in barvilom LysoTracker	15
3.1.6 Elektrofiziološke meritve	15
3.1.7 Poskusi na tkivnih rezinah	17
3.1.8 Mikroskopija STED	18
3.1.9 Mikroskopija SIM	19

3.1.10	Konfokalna mikroskopija	19
3.1.11	Določitev razmerja med holesterolom in proteini v astrocitih	19
3.2	ANALIZE IN STATISTIČNO OVREDNOTENJE REZULTATOV	20
3.2.1	Analiza elektrofizioloških meritev	20
3.2.2	Analiza premera glijotransmiterskih mešičkov	21
3.2.2.1	Analiza slik zajetih z mikroskopom STED	21
3.2.2.2	Analiza slik zajetih z mikroskopom SIM	21
3.2.3	Analiza fluorescentno označenega SNAP23	21
3.2.4	Statistična analiza	22
3.3	MATERIALI	22
3.3.1	Hranilni mediji in raztopine	22
3.3.1.1	Hranilni medij za astrocite	22
3.3.1.2	Izolacijski medij za astrocite	22
3.3.1.3	Zunajcelična raztopina	22
3.3.1.4	Stimulacijska raztopina	23
3.3.1.5	Cerebrospinalnemu likvorju podobna raztopina	23
3.3.2	Botulinusna nevrotoksina tipa D in E (BotD in BotE) in dnSNARE	23
3.3.3	Amplex Red in BCA kit	24
4	REZULTATI	25
4.1	PREMERI MEŠIČKOV V ASTROCITIH	25
4.2	NEPOSREDNO SPREMLJANJE FUZIJE MEMBRANE MEŠIČKOV S PLAZMALEMO	29
4.3	STIMULACIJA Z ATP SPROŽI SELEKTIVNI ODZIV MEŠIČKOV Z RAZLIČNIMI PREMERI	31
4.4	PO STIMULACIJI Z ATP SE MEŠIČKOM Z GLIJOTRANSMITERJI ČAS ODPRTE FUZIJSKE PORE PODALJŠA	35
4.5	PO STIMULACIJI Z ATP SO FUZIJSKE PORE REVERZIBILNIH DOGODKOV ŠIRŠE	37
4.6	BOTULINUSNI TOKSINI IN PEPTIDI DNSNARE ZMANJŠAJO POJAVNOST ELEMENTARNIH DOGODKOV	39
4.7	SOČASNA STIMULACIJA Z ATP IN ADRENALINOM VPLIVA NA LASTNOSTI POSAMEZNIH FUZIJSKIH DOGODKOV	42
4.8	HOLESTEROL VPLIVA NA URAVNAVANO EKSOCITOZO V ASTROCITIH	46

4.9	VPLIV ELEKTROSTATSKIH INTERAKCIJ NA URAVNAVANO EKSOCITOZA V ASTROCITIH	48
5	RAZPRAVA	51
6	SKLEPI	57
7	POVZETEK (ABSTRACT)	59
7.1	POVZETEK.....	59
7.2	SUMMARY	60
8	VIRI	62

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Nevezikularni in vezikularni načini sproščanja glijotransmiterjev iz astrocitov.....	4
Sl. 2:	Stopnje uravnavane eksocitoze.....	5
Sl. 3:	Tipi mešičkov v astrocitech.	12
Sl. 4:	Izboljšanje šuma pri meritvah membranske kapacitivnosti.	17
Sl. 5:	Mešički z glijotransmiterji v primarni celični kulturi astrocitov.	26
Sl. 6:	Primeri endolizosomov v izoliranih astrocitech.....	27
Sl. 7:	Mešički z glijotransmiterji v akutno izoliranih in odraslih podganah.	28
Sl. 8:	Elementarni dogodki eksocitoze v astrocitech.....	30
Sl. 9:	Amplitude in frekvence elementarnih dogodkov uravnavane eksocitoze.....	32
Sl.10:	Amplitude elementarnih dogodkov uravnavane eksocitoze akutno izoliranih astrocitov in astrocitov v tkivnih kulturah.	33
Sl. 11:	Stimulacija z ATP podaljša čas odprte fuzijske pore.....	36
Sl. 12:	Stimulacija z ATP zmanjša delež preslikanih reverzibilnih dogodkov.	38
Sl. 13:	Kvantifikacija uspešnosti cepljenja BotE v astrocitech, ki so izražali tudi EGFP.	39
Sl. 14:	Vpliv BotD, BotE in dnSNARE na fuzijo manjših in večjih mešičkov.	41
Sl. 15:	Vpliv kombinirane stimulacije z ATP in adrenalinom na lastnosti fuzije.	43
Sl. 16:	Ločeni stimulaciji z ATP in adrenalinom vplivata na lastnosti fuzijske pore.	45
Sl. 17:	Holesterol vpliva na razmerje med širino fuzijske pore in premerom mešička.	47
Sl. 18:	Fuzijske pore v astrocitech, izmerjene v zunajcelični raztopini brez Ca^{2+}	49
Sl. 19:	Povzetek vpliva odsotnosti zunajceličnih kationov na premer fuzijske pore.....	50

SLOVARČEK

- Botulinusni nevrotoksini** so mestno-specifične proteaze, ki cepijo proteine SNARE, odgovorne za fuzijo mešičkov s plazmalemo. Njihovo delovanje posledično blokira sproščanje transmiterjev iz mešičkov.
- Eksocitoza** je večstopenjski celični proces, ki omogoča uravnavano izločanje molekul iz sekrecijskih mešičkov.
- Fuzijska pora** je ozka cevasta struktura, ki nastane v procesu eksocitoze po zlitju membrane mešička s plazmalemo (Spruce in sod., 1990). Fuzijska pora lahko reverzibilno prehaja med odprtim in zaprtim stanjem, kar imenujemo prehodna fuzija (ang. transient fusion) (Alvarez de Toledo in sod., 1993), ali pa se lahko razširi, da omogoča popolno zlitje membrane mešička s plazmalemo (t. i. popolna fuzija; ang. full fusion) (Neher in Marty, 1982).
- Membranska kapacitivnost (C_m)** je premosorazmerna površini plazmaleme (Neher in Marty, 1982) in tako omogoča spremljanje elementarnih dogodkov eksocitoze ali endocitoze mešičkov (Neher in Sakmann, 1992).
- Proteini SNARE** so proteini razporejeni na plazmalemi in membrani mešička, ki imajo ohranjen motiv SNARE (ohranjeno zaporedje 60 do 70 aminokislin) in sodelujejo pri procesu fuzije membran (Wilson in sod., 1989).
- SIM** mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo vzorca je superločljivostna mikroskopska tehnika, ki omogoča spremljanje fluorescenčno označenih struktur z ločljivostjo ~120 nm (Gustafsson, 2000).
- STED** fluorescenčna mikroskopija z vzbujenim praznjenjem emisije z ločljivostjo nekaj 10 nm (Hell in Wichmann, 1994).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ANP	atrijski natriuretični peptid
ATP	adenozin-5'-trifostat
BAPTA	kalcijev kelator (ang. 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)
BDNF	nevrotropni dejavnik možganskega izvora
BotD/E	botulinusni nevrotoksin D ali E
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
$[Ca^{2+}]_i$	znotrajcelična koncentracija prostih kalcijevih ionov
C_m	membranska kapacitivnost (ang. membrane capacitance)
C_v	kapacitivnost mešička (ang. vesicle capacitance)
DMEM	Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija (ang. Dulbecco's modified Eagles's medium)
DMSO	dimetilsulfoksid
dnSNARE	dominantno negativni peptid SNARE
EDTA	etilen-diamin-tetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
EGFP	zeleni fluorescentni protein (ang. enhanced green fluorescent protein)
fF	femtofarad (10^{-15} F)
G_p	prevodnost fuzijske pore
HEPES	N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-etansulfonska kislina (ang. N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid)
IgG	imunoglobulin G (tip protitelesa)
Im	imaginarni del admittance celice (ang. the imaginary part of the admittance)
LAMP1	lizosomski membranski protein (ang. lysosomal-associated membrane protein 1)
LD50	količina toksina (v mg na kg) ki pokonča 50 % populacije

λ	ocenjena dolžina fuzijske pore
M β CD	metil- β -ciklodekstrin
M Ω	megaohm ($10^6 \Omega$)
ν	frekvenca sinusne napetosti
pA	pikoamper (10^{-12} A)
PBS	fosfatni pufer (ang. phosphat-buffered saline)
PLL	poli-L-lizin
ρ	ocenjena upornost raztopine v fuzijski pori
rms	efektivna vrednost (ang. root mean square)
rpm	obratov na minuto (ang. revolutions per minute)
Re	realni del admittance celice (ang. the real part of the admittance)
SIM	mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo (ang. structured illumination microscopy)
SNAP23	protein iz družine proteinov SNARE z molekulsko maso 23 kDa (ang. synaptosomal associated protein)
SNAP25	protein iz družine proteinov SNARE z molekulsko maso 25 kDa (ang. synaptosomal associated protein)
SNARE	topni N-etilamleimidno-občutljivi faktor pripetega proteinskega receptorja (ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)
TIRF	mikroskopija popolnega notranjega odboja (ang. total internal reflection microscopy)
VAMP2	sinaptobrevin2 (ang. vesicle associated membrane protein 2)
VAMP3	celubrevin (ang. vesicle associated membrane protein 3)
VAMP7	na tetanus nevrotoksin odporen membranski protein (ang. vesicle associated membrane protein 7)
VGLUT1	vezikularni transporter za glutamat (ang. vesicular glutamate transporter 1)
ω	kotna hitrost

1 UVOD

Vzpostavitev sistema prenosa informacij med celicami je bil ključen korak za razvoj večceličnih organizmov. Z membrano obdani kompartmenti znotraj celice omogočajo višjo stopnjo organiziranosti celice, saj predstavljajo podprostore, ki so lahko vključeni v presnovo, v lumnu ali v membrani mešičkov pa se lahko skladiščijo različne molekule, ki se hitro in učinkovito transportirajo znotraj celice. Prenos informacij z mešički je v relativno velikih in kompleksnih evkariontskih celicah bolj učinkovit od prenosa informacij z difuzijo, ki je zadoščal za manjše in bolj preproste prokariontske celice. Pri komunikaciji med evkariontskimi celicami ima pomembno vlogo uravnavana eksocitoza. Uravnavana eksocitoza je večstopenjski proces, v katerem se s signalnimi molekulami napolnjeni mešički usmerjeno transportirajo do plazmaleme in v zadnji stopnji zlijejo s plazmalemo ter izločijo vsebino mešička v zunajcelični prostor. Verjetno najbolj znani in raziskani so sekrecijski mešički presinaptične membrane nevrona, ki s sproščanjem neurotransmiterjev vplivajo na receptorje posinaptične membrane in so bistveni za prenos signalov med posameznimi nevroni na t.i. kemičnih sinapsah.

Od vzpostavitve hipoteze tripartitne sinapse (Araque in sod., 1999), ki astrocitom pripisuje pomembno vlogo pri modulaciji sinaptičnega prenosa, so številne raziskave potrdile vpletenost vezikularnih mehanizmov sproščanja prenašalcev iz astrocitov in njihov vpliv na tako pre- kot posinaptične nevrone (pregledano v (Parpura in Zorec, 2010; Guček in sod., 2012; Zorec in sod., 2012)). Kljub mnogim dokazom je koncept glijotransmisije še vedno predmet številnih diskusij (Hamilton in Attwell, 2010; Fujita in sod., 2014; Sloan in Barres, 2014).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Astroцитi so najštevilčnejše celice glije, ki se na dražljaje nevronov odzivajo s sproščanjem številnih glijotransmiterjev, med drugim s procesom uravnavane eksocitoze, pri katerem se sekrecijski mešički, napolnjeni z glijotransmiterji, zlijejo s plazmalemo in vsebino izločijo v zunajcelični prostor. Molekulski mehanizmi, odgovorni za zlivanje membran, vključujejo tako proteine SNARE (ang. soluble N-ethyl maleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors) kot lipide (Rituper in sod., 2010). V astrocitih so izraženi t.i. nekanonični proteini SNARE, ki vključujejo celubrevin/VAMP3 (Parpura in sod., 1995), na tetanus nevrotoksin odporen VAMP7 (Verderio in sod., 2012) in SNAP23 (Hepp in sod., 1999), katerih molekularni mehanizmi so še slabše raziskani v primerjavi s klasičnim naborom proteinov SNARE (Ramirez in Kavalali, 2012). Uravnavana eksocitoza v astrocitih je torej pomanjkljivo pojasnjena, korak k boljšemu razumevanju pa predstavljajo nevrotoksini, ki specifično cepijo posamezne proteine SNARE, (botulinusni toksin D (BotD) cepi VAMP2 in VAMP3 (Bezzi in sod., 2004; Kreft in sod., 2004), medtem ko botulinusni toksin E (BotE) cepi SNAP25 in SNAP23) (Vaidyanathan in sod., 1999; Bowser in Khakh, 2007) ali pa peptidi, ki preprečijo nastanek kompleksa proteinov

SNARE (peptidni del sinaptobrevina, ki sodeluje pri nastanku kompleksa SNARE; dnSNARE) (Zhang in sod., 2004). V proces uravnavane eksocitoze v astrocitih vstopajo različni glijotransmiterji, zato je naš namen raziskati velikosti glijotransmiterskih mešičkov in določiti, na kakšen način poteka njihova fuzija s plazmalemo.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

- Določiti elementarne lastnosti fuzijskih dogodkov v astrocitih.
- Preveriti vpliv botulinusnih nevrotoksinov in peptida dnSNARE na elementarne lastnosti fuzijskih dogodkov v astrocitih.
- Preveriti vpliv odvzemanja holesterola na elementarne lastnosti fuzijskih dogodkov v astrocitih.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

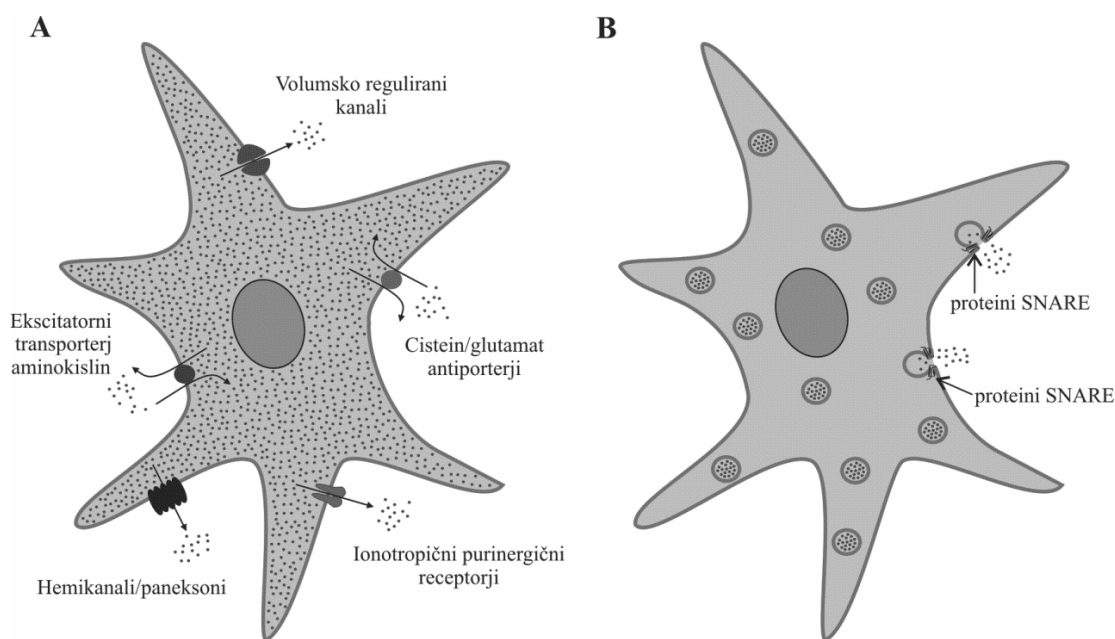
- Elektrofiziološka metoda vpete napetosti krpice membrane v konfiguraciji pritrjene celice omogoča meritve elementarnih dogodkov fuzije v astrocitih.
- Stimulacija astrocitov z ATP (1 mM) poveča pojavnost elementarnih dogodkov uravnavane eksocitoze.
- Botulinusni nevrotoksini vplivajo na pojavnost elementarnih dogodkov uravnavane eksocitoze v astrocitih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ASTROCITI

Astrociti so najštevilčnejše celice glije, ki s številnimi izrastki obdajajo nevrone in jim zagotavljajo strukturno, presnovno in trofično podporo (Haydon, 2000). Homeostazo v možganih vzdržujejo tudi z dovajanjem substratov nevronom (Sofroniew in Vinters, 2010). Med nevronske aktivnosti prevzemajo kalijeve ione ter tako preprečujejo povišanje zunajcelične koncentracije kalijevih ionov (Ransom in sod., 2003). Predstavljajo fizično pregrado med sinapsami sosednjih nevronov in z odstranjevanjem neurotransmiterjev (glutamat in GABA) iz sinaptične špranje zagotavljajo uravnavane sinaptične prenose. Astrociti so pomembni pri rasti nevronov in tvorjenju sinaps (Pfrieger in Barres, 1997). Astrociti niso sposobni proženja električnih akcijskih potencialov tako kot nevroni, imajo pa specifično obliko vzdražnosti, ki temelji na prehodnih spremembah v znotrajcelični koncentraciji prostih Ca^{2+} ionov $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Cornell-Bell in sod., 1990). Na specifične kemične dražljaje nevronov se astrociti odzivajo z dvigom $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bal-Price in sod., 2002), kar pa lahko vodi v sproščanje številnih glijotransmiterjev v zunajcelični prostor s procesom uravnavane eksocitoze (Parpura in Zorec, 2010). Komunikacija poteka tudi v obratni smeri, kjer sproščanje glutamata iz astrocitov povzroči sproščanje glutamata iz nevronov (Parpura in sod., 1994) in posledično modulacijo sinaptičnega prenosa (Araque in sod., 1998). Hipoteza tripartitne sinapse vključuje astrocit kot tretji partner pri sinaptičnem prenosu (Araque in sod., 1999), ki lahko s sproščanjem glijotransmiterjev pomembno modulira prenos med pre- in po-sinaptičnim nevronom. Posledično številni raziskovalci ugotavljajo, da naj bi bili astrociti manjkajoči člen v razumevanju spanja, dihanja, bolečine, učenja in spomina (pregledano v (Ben Achour in Pascual, 2012)).

Čeprav je eksocitoza evolucijsko najbolj dovršen način signaliziranja na velike razdalje, obstajajo tudi drugi mehanizmi sproščanja signalnih molekul. V astrocitih so znani številni mehanizmi (sl.1A), ki ne potekajo z eksocitozo ampak prek: a) volumsko reguliranih kanalov, b) cistein/glutamatnih antiporterjev, c) ionotropičnih purinergičnih receptorjev, d) hemikanalov/paneksonov in e) od Na^+ -odvisnih ekscitatornih transporterjih aminokislin.



Slika 1: Nevezikularni in vezikularni načini sproščanja glijotransmiterjev iz astrocitov. A) Akumulirani transmiterji v citosolu (pike) lahko prehajajo v zunajcelični prostor z različnimi načini nevezikularnega sproščanja, prek: volumsko reguliranih kanalov, cistein/glutamatnih antiporterjev, ionotropičnih purinergičnih receptorjev, hemikanalov/paneksonov in od Na^+ -odvisnih ekscitatornih transporterjev aminokislin. **B)** Sekreციjski mešički s transmiterji v lumnu se lahko hitro premeščajo in so lahko strateško usmerjeni na mesta, kjer so potrebni za učinkovito signaliziranje. Fuzija mešičkov s plazmalemo je mogoča ob posredovanju proteinov kompleksa SNARE. Slika je prirejena po (Guček in sod., 2012).

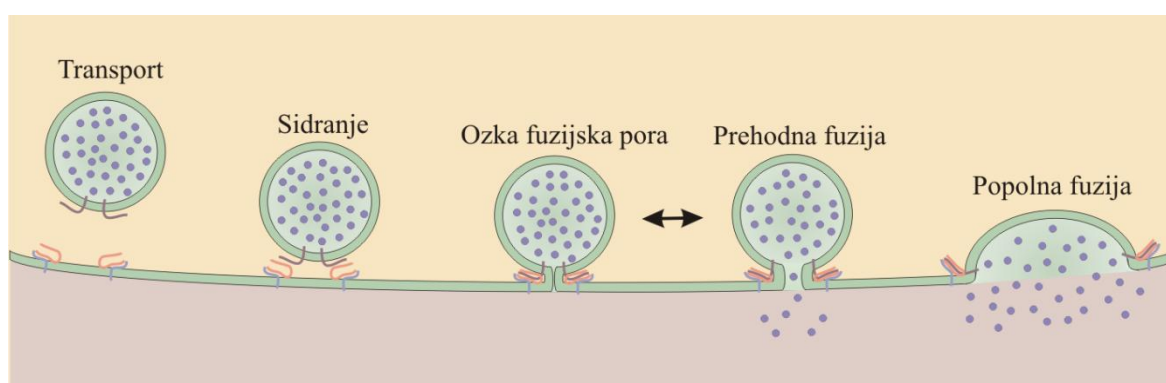
Figure 1: Vesicle- and Non-Vesicle Based Mechanisms of Gliotransmitter Release. A) Astrocyte with transmitters (dots) accumulating in the cytosol. They may exit into the extracellular space via mechanisms of non-vesicular secretion: (i) channel opening induced by cell-swelling, (ii) cysteine-glutamate antiporters and organic anion transporters, (iii) ionotropic purinergic receptors, (iv) connexin hemichannels/pannexons and (v) reversal of Na^+ -dependent excitatory amino acid transporters (EAAT). **B)** This panel shows that vesicles containing transmitters can be positioned to various sites at the plasma membrane. Thus high concentration-loaded compartments are movable and can be strategically positioned where required for efficient signalling. The fusion of vesicles with the plasma membrane is mediated by proteins forming the SNARE complex.

Adapted from (Guček in sod., 2012).

2.2 URAVNAVANA EKSOCITOZA

Večina od ~200 tipov celic v človeškem telesu dostavlja na plazmalemo različne proteine in sprošča sekretorne molekule v zunajcelični prostor s konstitutivno in/ali uravnavano eksocitozo. Splošno prisotna konstitutivna eksocitoza je namenjena dostavi lipidov, receptorjev, transporterjev, kanalčkov itd. na plazmalemo. Uravnavana eksocitoza poteka v specializiranih sekreციjskih celicah, kot so npr. nevroni in nevroendokrine celice (Burgess in Kelly, 1987). V uravnavani eksocitozi se z membrano obdani mešički, napolnjeni s signalnimi molekulami, dostavijo do celične membrane, kjer sledita procesa sidranja in priprave na fuzijo. Ob ustreznem aktivacijskem signalu, ki ga običajno predstavlja dvig $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pride do fuzije obeh membran (Südhof in Rizo, 2011). Eksocitoza je eden izmed najhitrejših znanih bioloških procesov, ki lahko poteče v časovnem okviru milisekund pod

pogojem, da so sekrecijski mešički tik ob membrani pripravljani za fuzijo. V primeru, da se morajo mešički dostaviti do membrane, ali ob dolgotrajni stimulaciji, je proces eksocitoze zakasnen. Sam proces zlivanja še vedno ni pojasnjen do podrobnosti, saj k njemu pripomorejo tako anizotropni lipidi na obeh membranah kot tudi proteini kompleksa SNARE in ostali proteini, ki z nastankom obvite vijačnice med domenami proteinov na mešičku in celični membrani približajo obe membrani, da se lahko zlijeta (Wilson in sod., 1989). Zlivanje mešička s plazmalemo lahko poteka na dva načina (sl. 2). Fuzijska pora se lahko ireverzibilno razširi, kar privede do združitve membrane mešička z membrano celice (ang. full fusion), ali reverzibilno zapre (ang. transient fusion), kar omogoči, da mešiček ohrani obliko in funkcijo, hkrati pa zadrži del vsebine.



Slika 2: Stopnje uravnavane eksocitoze. Uravnavana eksocitoza je večstopenjski proces, v katerem se sekrecijski mešiček, napolnjen s signalnimi molekulami, naprej transportira do plazmaleme, kjer se po procesu sidranja in ustreznem signalu zlije s plazmalemo. Fuzijo mešička s plazmalemo sproži povečana koncentracija $[Ca^{2+}]_i$. Pri tem nastane fuzijska pora, ki omogoča izločanje signalnih molekul. Fuzijska pora se lahko reverzibilno odpira in zapira (prehodna fuzija) ali pa se mešiček v celoti zlije s plazmalemo (popolna fuzija). Proteini SNARE mešiček približajo membrani in so shematično prikazani na membrani mešička in na plazmalemi.

Figure 2: Steps a Secretory Vesicle Undergoes in Regulated Exocytosis. Regulated exocytosis is a multistep process. Following the delivery to the plasma membrane docking sites, the vesicle is docked and primed for fusion. Local increase in cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ leads to the establishment of a fusion pore. Once formed, the fusion-pore may reversibly widen (transient fusion), or proceed to a complete merger with the plasma membrane (full-fusion exocytosis). SNARE proteins are responsible for bringing membranes together and are schematically drawn on the vesicle membrane and on the plasma membrane.

2.2.1 Proteini v uravnavani eksocitozi

Za približanje membrane mešička in celične membrane naj bi bili odgovorni proteini SNARE, ki s pozitivnimi aminokislinskimi ostanki privlačijo negativno nabite lipidne molekule in omogočijo njihovo približevanje. Klasičen nabor proteinov, vključenih v eksocitozo v nevronih, sestoji iz sinaptobrevina2/VAMP2 (ang. vesicle-associated membrane protein), sintaksina 1 in SNAP25 (ang. synaptosomal associated protein, molekulska masa 25 kDa), katerim je skupen ohranjen motiv SNARE, odgovoren za povezovalno štirivijačno strukturo kompleksa SNARE (Jahn in Scheller, 2006). Na membrani sekretornega mešička je sinaptobrevin 2, na plazmalemi pa sta SNAP25 in

sintaksin-1 (Jahn in Scheller, 2006). Ob približanju membran se ti proteini z motivi SNARE povežejo v tesno strukturo, ki jo tvorijo štiri verige (po eno prispevata sinaptobrevin 2 in sintaksin 1, dve prispeva SNAP25). Povežejo se v smeri N- proti C-koncu, proces pa spominja na zapiranje zadrge (Jahn in Scheller, 2006). Poleg osnovnega kompleksa SNARE so za regulacijo in iniciacijo potrebni dodatni proteini, od katerih sta najpomembnejša Munc 18 in Munc 13, ki pripravita proteine SNARE za sestavljanje, ter sinaptotagmini in kompleksini, ki so nujni za sproženje fuzije ob povečanem kalciju (Jahn in Fasshauer, 2012).

2.2.1.1 Nekanonični proteini SNARE

Nekanonični proteini SNARE predstavljajo alternativni nabor proteinov SNARE, ki lahko sodelujejo pri fuziji mešičkov med posameznimi organeli celice, v spontani transmisiji ali v uravnavani eksocitozi ne-nevronske celice (Ramirez in Kavalali, 2012). Alternativno sinaptobrevinu 2 predstavljajo drugi proteini brevinske družine: sinaptobrevin 1, ki je izražen v hrbtenjači in VAMP3, ki sodeluje pri uravnavani eksocitozi v astrocitih (Papura in sod., 1995) in endotelijskih celicah (Ramirez in Kavalali, 2012). Longinska družina, ki je strukturno podobna brevinski, ima podaljšan N-konec in vključuje VAMP7, VAMP4 in Vti1a. Ti proteini so vključeni v fuzije v endocitotski poti, v Golgijevem aparatu in endosomih. VAMP7 najdemo tudi v lizosomih (Ramirez in Kavalali, 2012; Verderio in sod., 2012), kjer je odgovoren za njihovo uravnavano eksocitozo (Verderio in sod., 2012). Alternativno sintaksinu 1 predstavljajo sintaksin 6, sintaksin 7, sintaksin 12/13 in sintaksin 16, ki so vključeni v fuzije mešičkov v endocitotski poti. Alternativno SNAP25 predstavljajo SNAP23, SNAP29 in SNAP47. SNAP23 je vključen v uravnavano eksocitozo ne-nevronske celice, primer predstavljajo astrociti (Hepp in sod., 1999). SNAP29 se nahaja na endosomih, lizosomih, Golgijevem aparatu in deluje kot negativni regulator razstavljanja kompleksa SNARE, kar upočasni recikliranje sinaptičnih mešičkov. SNAP47 je najnovejšo odkriti analog, ki je izražen v možganih in nadomešča SNAP25, vendar z manjšo učinkovitostjo (Ramirez in Kavalali, 2012).

2.2.1.2 Botulinusni nevrotoksini

Klostridijske nevrotoksine proizvajajo Gram pozitivne bakterije *Clostridium* (Davletov in sod., 2012), ki so obligatorno anaerobni sporogeni bacili (Berginc-Dolenšek in sod., 2004), odgovorni za sintezo presinaptičnih nevrotoksinov, ki inhibirajo sproščanje neurotransmiterjev v sinapso (Schiavo in sod., 2000). Posledici delovanja toksinov sta tetanus, ki ga povzroča *Clostridium tetani* ali botulizem, ki ga povzročajo serotipi A-G toksičnih sevov *Clostridium botulinum*, *Clostridium barati* ali *Clostridium butyricum*. Anaerobne rane predstavljajo razmere za intoksikacijo s tetanusnim toksinom, medtem ko je običajni vstop botulinusnih toksinov posledica uživanja kontaminirane hrane, shranjene v anaerobnih pogojih (npr. konzervirana hrana, klobase, med) (Schiavo in sod., 2000). Tetanusni nevrotoksin povzroči spastično paralizo tako, da prepreči sproščanje inhibitornih

nevrotoksinov v centralnem živčnem sistemu (glicin in GABA). Posledica delovanja botulinusnih nevrotoksinov je inhibicija sproščanja acetilholina v ekscitatornih sinapsah, kar vodi v ohlapno paralizo. Transport toksina do mesta delovanja je različen. Tetanusni nevrotoksin se veže na periferno živčevje in se retrogradno transportira znotraj aksona motonevrona do hrbtenjače, kjer se akumulira v ventralnih rogovih sivine (Schiavo in sod., 2000), nato pa potuje iz dendritov perifernih motonevronov čez sinapse v inhibitorne internevrone, kjer inhibira sproščanje nevrotoksinov. Botulinusni nevrotoksini so sintetizirani v kompleksih z netoksičnimi proteini, ki jih obvarujejo pred prebavnimi sokovi želodca. Alkalni pH v črevesju povzroči razpad kompleksov in botulinusni nevrotoksin s transcitozo preide epiteljske celice in vstopi v krvni obtok (Schiavo in sod., 2000).

Klostridijski nevrotoksini so metaloproteinaze, sestavljene iz težke verige (100 kDa), ki je odgovorna za vezavo na celično površino in lahke verige (50 kDa), ki deluje kot proteolitični encim (Schiavo in sod., 1993). Med sabo sta v aktivni obliki (po delovanju peptidaz) povezani z nekovalentnimi vezmi in enim cisteinskim mostičkom, ki ga razgradi reducirajoče okolje citosola in s tem loči katalitično verigo od translokacijske (Davletov in sod., 2012). V katalitičnem mestu lahke verige je atom cinka, obdan z vezavnim motivom His-Glu-Xaa-Xaa-His (Schiavo in sod., 2000). Ti toksini so najbolj toksične substance, saj so LD50 vrednosti v miših med 0,1 in 1 ng/kg telesne teže (Schiavo in sod., 2000). Posamezni serotipi se med sabo razlikujejo glede na mesto cepitve specifičnega proteina SNARE. Sinaptobrevin cepijo serotipi B, F, G in D. Sintaksin 1 cepi serotip C, SNAP25 pa serotipi A, C in E (Schiavo in sod., 2000; Davletov in sod., 2012). Trajanje sinaptične blokade se močno razlikuje med posameznimi serotipi in lahko traja od nekaj dni do nekaj mesecev (Bajohrs in sod., 2004), odvisno pa je od razdalje med presinaptičnim terminalom in telesom nevrona, obstojnosti specifičnega nevrotoksina in obstojnosti odcepljenega peptida SNARE (Davletov in sod., 2012). Primer je BotA, ki cepi SNAP25, a ne inhibira eksocitoze popolnoma (Banerjee in sod., 1996), saj odcepi zgolj 9 aminokislinskih ostankov (Eleopra in sod., 1998). Protein postane nefunkcionalen, vendar ne sproži ubikvitinacije, ki bi normalno usmerila protein v razgradnjo (Eleopra in sod., 1998). Cepljeni del se akumulira, kar kompetitivno inhibira fuzijo mešička s plazmalemo (Popoff in Poulain, 2010). Po drugi strani pa BotE odcepi 26 aminokislinskih preostankov (Vaidyanathan in sod., 1999) na proteinu SNAP25, zato celica spremembo hitreje zazna in nadomesti (Eleopra in sod., 1998). V omenjenem primeru je inhibicija eksocitoze zgolj posledica cepitve SNAP25, ne pa tudi kompeticije antagonistov kompleksa SNARE. Skrajšanje SNAP25 zmanjša sposobnost vezave na sintaksin (Bajohrs in sod., 2004) in destabilizira štirivijačni kompleks SNARE ter povzroči sprostitvev SNAP25 v citosol (Bajohrs in sod., 2004).

Klostridijski toksini cepijo tudi nekanonične proteine SNARE; če so mikroinjicirani v citoplazmo, so membrane permeabilizirane, ali pa so vnešeni geni za lahko verigo posameznega toksina (Schiavo in sod., 2000). VAMP3 cepi tetanusni nevrotoksin (v

ledvičnih celicah: (Proux-Gillardeaux in sod., 2005)) in BotD (v astrocitih: (Bowser in Khakh, 2007)). BotA/C/E cepijo mišjo izoformo SNAP23, medtem ko je človeška na cepljenje odporna (Vaidyanathan in sod., 1999). Longinska družina proteinov SNARE je zaradi podaljšanega N-terminala na cepljenje s tetanusnim nevrotoksinom odporna; VAMP7 ima zato tudi drugo ime: TI-VAMP, na tetanusni toksin neobčutljiv VAMP (ang. tetanus-insensitive VAMP) (Verderio in sod., 2012).

2.2.1.3 Peptid dnSNARE

Temelj proteinske teorije fuzije membrane mešička s plazmalemo sta proteina SNARE VAMP2 in SNAP25, ki s približanjem in tvorjenjem obvite vijačnice med ohranjenima motivoma SNARE približata obe membrani (Jahn in Scheller, 2006). Alternativno nevrotoksinom za študij uravnavane eksocitoze predstavlja peptid dnSNARE (ang. dominant negative SNARE), N-končni peptid proteina VAMP2 (aminokislina 1-96). Njegovo izražanje v astrocitih prepreči sproščanje glutamata (Zhang in sod., 2004) in ATP-ja (Pascual in sod., 2005), kar posledično vodi v zmanjšanje heterosinaptične inhibicije (Pascual in sod., 2005) ali deregulacijo mehanizma uravnavanja spanja (Halassa in sod., 2009). Peptid dnSNARE se verjetno veže na proste molekule SNAP na plazmalemi in tako zasede vezavna mesta za VAMP2, vendar natančen mehanizem še ni pojasnjen.

2.2.2 Lipidi v uravnavani eksocitozi

Za fuzijo membrane mešička s plazmalemo so pomembni tudi lipidi. Kompleksne proteinsko-lipidne interakcije omogočajo učinkovito, časovno in prostorsko natančno uravnavano eksocitozo (Rituper in sod., 2010). Pomemben lipid v uravnavanju eksocitoze je holesterol, katerega koncentracija je v celičnih membranah natančno uravnavana (Pfrieger in Ungerer, 2011). Predvideva se, da holesterol skrbi za rigidnost membran in je v lipidnem dvosloju sposoben združevanja v membranske splave (Simons in Ikonen, 1997), ki predstavljajo sidrišča za proteine, kritične za sidranje in pripravo mešička na fuzijo (proteini SNARE), sprožitev fuzije (napetostno odvisni Ca^{2+} kanalčki) in fuzijo samo (Rituper in sod., 2010). Holesterol je anizotropna molekula, katere hidrofilna glava ima v primerjavi s hidrofobnim repom manjši premer, in je t.i. negativno intrinzično ukrivljena molekula. Ta fizikalna lastnost holesterola je pomembna za ukrivljanje lipidnega dvosloja, še posebej v procesu fuzije, ko se lokalno deli plazmaleme in membrane mešička močno ukrivijo. Na pomembno vlogo holesterola pri ukrivljanju membran kaže podatek, da je v sinaptičnih mešičkih, ki so relativno majhni in posledično močno ukrivljeni, vsebnost holesterola kar 40 mol% (Pfrieger in Ungerer, 2011). Za primerjavo, plazmalema vsebuje do 20 mol% holesterola (Mukherjee in sod., 1998).

Rezultati v hipofiznih laktotrofih kažejo, da se ob zmanjšani koncentraciji holesterola značilno zmanjšajo frekvence pojavnosti prehodnih dogodkov uravnavane eksocitoze (Rituper in sod., 2012). Odvzemanje holesterola vpliva na uravnavano eksocitozo

najverjetneje na dva načina: 1) podre strukturo membranskih splavov in s tem prepreči sidranje proteinov SNARE (Rituper in sod., 2013b), 2) z odstranitvijo negativno intrinzično ukrivljenih molekul verjetno prepreči nastanek (ozke) fuzijske pore ali njeno stabilizacijo (Rituper in sod., 2012). Ni pa znano, kako odvzemanje holesterola vpliva na lastnosti fuzijske pore in pojavnost fuzijskih dogodkov v astrocitih.

2.3 EKSOCITOZA V ASTROCITIH

V astrocitih so izraženi proteini SNARE membran mešička in plazmaleme. Na membrani mešička sta ali VAMP2 ali pogosteje njegov homolog celubrevin (VAMP3) (Parpura in sod., 1995), na plazmalemi pa sintaksin 1, 2, 3 ali 4 ter SNAP23 (Hepp in sod., 1999). Dodatno se v astrocitih izražajo številni proteini, ki sodelujejo pri procesu fuzije membran (sinaptotagmin 4, Munc 18, kompleksin 2; pregledano v (Montana in sod., 2006)). Nedavne raziskave so pokazale tudi prisotnost VAMP7, ki je pogosto na membrani lizosomov (Verderio in sod., 2011), katerih eksocitoza je odvisna od Ca^{2+} (Zhang in sod., 2007). Proteini, vključeni v eksocitozo v astrocitih, niso kopija proteinov SNARE v nevronih (Schubert in sod., 2011), kjer so tipično prisotni VAMP2 in sinaptotagmin 1 na membrani mešička ter sintaksin 1 in SNAP25 na plazmalemi.

Sproščanje glijotransmiterjev je ena izmed številnih nalog, ki jih astrociti opravljajo v možganih in hrbtenjači. Kriteriji, da posamezno molekulo obravnavamo kot glijotransmiter, so: (1) sinteza in/ali skladiščenje v celicah glije, (2) uravnavano sproščanje, ki poteka v fizioloških ali patoloških razmerah, (3) povzročitev hitrega odziva (na nivoju milisekund) v sosednjih celicah in (4) vloga v (pato)fizioloških procesih (Parpura in Zorec, 2010). Glijotransmiterji se v sekretorne mešičke transportirajo proti koncentracijskemu gradientu preko različnih prenašalcev. Astrociti izražajo tri izoforme vezikularnega glutamatnega prenašalca (VGLUT): VGLUT1, VGLUT2 in VGLUT3 (Bezzi in sod., 2004), ki uporabljajo protonski gradient V-ATPaz za koncentriranje glutamata znotraj mešičkov. Za uravnavanje od Ca^{2+} -odvisne eksocitoze glutamata naj bi bila omejitvena dejavnika citosolna koncentracija Ca^{2+} in ekspresija VGLUT3 (Ni in Parpura, 2009). ATP vstopa v sekretorne mešičke preko prenašalca SLC17A9 (Sawada in sod., 2008), ki je nukleotidni prenašalec (VNUT), prisoten tudi v astrocitih (Larsson in sod., 2011). Vstop D-serina v sekretorne mešiček poteka verjetno preko transporterja VSERT (Martineau in sod., 2013). Kljub znanim vstopom glijotransmiterjev v sekretorne mešičke še vedno ni bilo neposredno pokazano, kako poteka njihov izstop ob fuziji mešička s plazmalemo.

2.3.1 Glijotransmiterji

Kot odziv na neurotransmiterje povečana koncentracija Ca^{2+} v astrocitih povzroči sproščanje glijotransmiterjev z uravnavano eksocitozo (Pasti in sod., 1997; Porter in McCarthy, 1997). Po tem mehanizmu se sproščajo glutamat (Bezzi in sod., 2004), D-serin (Martineau in sod., 2006), ATP (Coco in sod., 2003) ter peptidi: ANP (Krzan in sod.,

2003), BDNF (Jean in sod., 2008) in neuropeptid Y (Ramamoorthy in Whim, 2008). Od vrste stimulusa in specifične lokacije tarčnega receptorja na membrani astrocita je odvisno, kakšen bo odziv celice in kateri/-e glijotransmiter/-je bo sprostila (Perea in Araque, 2005). Dokazi obstoja uravnavane eksocitoze številnih glijotransmiterjev so zbrani v nadaljevanju. Ker je literatura na to tematiko obsežna in se mestoma razhaja, smo podatke o posameznih tipih mešičkov, skupaj z njihovo vsebino in izmerjenimi premeri, združili v sl. 3.

Z uporabo fluorescenčne mikroskopije s popolnim notranjim odbojem (ang. total internal fluorescence microscopy oz. TIRF microscopy) so dokazali sekrecijsko aktivnost v primarni celični kulturi astrocitov (Bezzi in sod., 2004). Majhni, sinaptičnim podobni sekrecijski mešički (ang. synaptic-like microvesicles, SLMV), ki imajo premer 30–50 nm, se nahajajo v proksimalnih delih celic in vsebujejo glutamat (Bezzi in sod., 2004) in D-serin (Bergersen in sod., 2011). Označevanje s protitelesi proti VAMP2 (Crippa in sod., 2006) je pokazalo, da so v telesih astrocitov prisotni mešički premerov med 30 in 100 nm. Dodatna heterogenost glutamatnih sekrecijskih mešičkov je bila potrjena z elektronsko mikroskopijo. Od $[Ca^{2+}]_i$ odvisno eksocitozo so potrdili za mešičke s premeri 310–340 nm (Chen in sod., 2005). Reciklirajoči mešički, ki iz zunajceličnega prostora prevzamejo protitelesa proti VGLUT1, so veliki ~50 nm (Stenovec in sod., 2007).

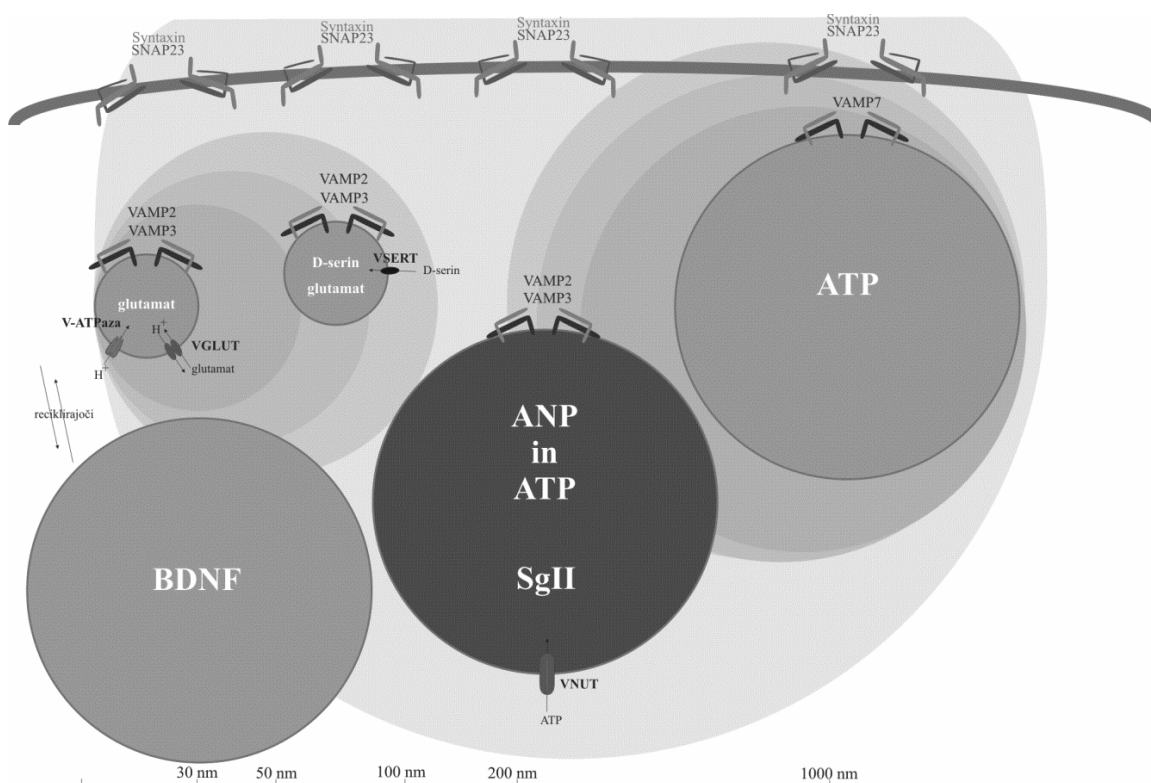
Posamezni kvantni dogodki sproščanja glutamata so bili pokazani z uporabo amperometričnih meritev, kjer so astrocite najprej napolnili z dopaminom, nato pa spremljali njegovo izločanje iz glutamatnih sekrecijskih mešičkov (Chen in sod., 2005). Posredno so, na podlagi oblike vrhov, skleпали, da poteka eksocitoza tipa prehodne fuzije, kjer se ob fiziološki stimulaciji z 0,5 mM glutamatom sprosti le 10 % vsebine mešička. Mehanska stimulacija povzroči popolno fuzijo s 100 % sprostitvijo vsebine mešička (Chen in sod., 2005). Uporaba mikroskopije TIRF je po drugi strani pokazala, da 40 % spontanah kvantnih dogodkov predstavlja prehodno fuzijo, medtem ko 60 % predstavlja popolno fuzijo (Bowser in Khakh, 2007). Podrobna analiza eksocitoze z uporabo fluorescenčnega proteina pHluorin, pripetega na domeno proteina VAMP2 (sinapto-pHluorina), je pokazala, da sta tipa fuzije v spontanah razmerah enako zastopana (50 % dogodkov popolne fuzije in 50 % dogodkov prehodne fuzije) in da je izbira med prehodno in popolno fuzijo odvisna od stimulusa (Malarkey in Parpura, 2011). Mehanska stimulacija poveča število dogodkov prehodne fuzije, medtem ko dvig $[Ca^{2+}]_i$ z ATP ali bradikininom poveča delež dogodkov popolne fuzije.

Lizosomi z molekulskim markerjem VAMP7 predstavljajo posebno skupino sekrecijskih mešičkov v astrocitih (Verderio in sod., 2011). Dvig $[Ca^{2+}]_i$ povzroči eksocitozo (Zhang in sod., 2007) teh ATP-vsebujočih mešičkov, kar lahko vodi v širjenje Ca^{2+} valov do sosednjih astrocitov (Zhang in sod., 2007). Ti mešički so neobčutljivi na dodajanje nevrotoksina tetanus, inhibirano izražanje proteina VAMP7 pa povzroči zmanjšano izločanje ATP-ja iz astrocitov (Verderio in sod., 2011). Druga populacija mešičkov, v

katerih je shranjen ATP, so mešički, ki vsebujejo sekretogranin II, imajo gosto jedro in premer okoli 100 nm (Coco in sod., 2003). Sproščanje ATP iz teh mešičkov je od Ca^{2+} -odvisno in občutljivo na tetanusni nevrotoksin (Coco in sod., 2003). Atrijski natriuretični peptid (ANP) se nahaja v teh mešičkih, verjetno skupaj z ATP (Pangršič in sod., 2007) in v reciklirajočih mešičkih (Potokar in sod., 2007). V reciklirajočih mešičkih velikosti ~125 nm so nedavno odkrili tudi prekursorsko obliko nevrotrofičnega dejavnika možganskega izvora (BDNF), ki nastaja v nevronih (Bergami in sod., 2008). Kot pro-BDNF z endocitozo vstopa v astrocite, kjer se shrani, reciklira in ob stimulaciji izloči iz astrocitov.

Metoda spremljanja membranske kapacitivnosti v izolirani krpici membrane (ang. patch-clamp) omogoča neposredno spremljanje spreminjanja površine celične membrane na kar vplivata fuzija in fisija sekrecijskih mešičkov (Neher in Marty, 1982). Merilna konfiguracija celotne celice (ang. whole-cell) omogoča spremljanje celokupne površine plazmaleme in njene spremembe v odvisnosti od časa (Lindau in Neher, 1988). Zhang in sodelavci (2004) so ta poskus v astrocitih izvedli tako, da so z agonistom sprožili dvig $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Opazovali so naraščanje membranske kapacitivnosti, z drugo metodo pa so hkrati izmerili sproščanje glutamata (Zhang in sod., 2004), kar je neposredno pokazalo, da je sproščanje glutamata povezano s povečanjem membranske površine zaradi povečanega $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Višjo ločljivost spreminjanja površine celične membrane omogoča konfiguracija pritrjene celice (ang. cell-attached), kjer z mikropipeto izoliramo del membrane in spremljamo posamezne kvantne dogodke fuzije sekretornega mešička s plazmalemo (Neher in Marty, 1982). Merjeni diskretni skoki v membranski kapacitivnosti so namreč posledica interakcije posameznega sekretornega mešička s plazmalemo (Neher in Marty, 1982). Da bi našte raziskave uravnavane eksocitoze glijotransmiterjev nadgradili z dokazi na nivoju fuzij posameznih mešičkov s plazmalemo, smo konfiguracijo pritrjene celice uporabili na astrocitih. Zaradi svoje neposrednosti bi lahko ta tehnika predstavljala direkten dokaz, kateri tip eksocitoze prevladuje v astrocitih (prehodna ali popolna fuzija) in kakšne so lastnosti fuzijske pore glijotransmiterskih mešičkov.



Slika 3: Tipi mešičkov v astrocitech. Glutamat in D-serin se iz astrocitov praviloma sproščata iz manjših, sinaptičnim podobnih mešičkih. ANP je shranjen v peptidergičnih mešičkih, označenih z označevalcem sekretogranin II (SgII), ki lahko vsebujejo tudi ATP. Dodaten izvor ATP-ja predstavljajo lizosomi, za katere je bistven protein SNARE VAMP7. Pro-BDNF, ki ima izvor v nevronih, se v astrocitate najprej endocitira, izloči pa ob stimulaciji. Različno veliki krogi prikazujejo neskladnost v izmerjenih objavljenih premerih.

Figure 3: Types of Secretory Vesicles in Astrocytes. Glutamate and D-serine are usually released from small-synaptic like vesicles. ANP is stored in peptidergic vesicles, marked with secretogranin II (SgII), which can also contain ATP. An additional source of ATP comes from lysosomes, marked with the SNARE protein VAMP7. Pro-BDNF, which originates in neurons, is first endocytosed and exocytosed upon stimulation. Different circle sizes are used to emphasize diverse diameters in different publications.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA

3.1.1 Priprava celičnih kultur astrocitov

Priprava celic je potekala skladno s Pravilnikom o strokovnih, kadrovskih in tehničnih pogojih za opravljanje poskusov na živalih (Uradni list RS, št. 40/85, 22/87) ter Zakonom o zaščiti živali (Uradni list RS, št. 43/07). Poskusi so bili izvedeni z veljavnim dovoljenjem za izvajanje poskusov na živalih s strani Veterinarske uprave Republike Slovenije (št. potrdila 34401-29/2009/2), izdanim 22. 4. 2009.

Primarno celično kulturo astrocitov smo pripravili iz možganske skorje 2–3 dni starih podgan (Potokar in sod., 2008). Odstranili smo možgansko ovojnico in korteks resuspendirali v izolacijskem mediju. Dvakrat smo centrifugirali po 4 min pri 1200 rpm (obratov na minuto, ang. revolutions per minute), po vsakem centrifugiranju smo odlili supernatant in ga nadomestili s 5 ml izolacijskega medija. Vsebino centrifugirke smo nato prenesli v petrijevko (premer 35 mm). Vsebino petrijevke smo po trikrat previdno povlekli skozi igle debeline 1,1 mm, 0,8 mm in 0,6 mm. Vsebino zadnje igle smo nato prenesli skozi filter premera 75 μm v novo 15 ml centrifugirko. Centrifugirali smo 4 min pri 1200 rpm. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in dodali 2 ml hranilnega medija za astrocite ter vsebino premešali petkrat. V 50 ml posodo za celične kulture s filtrom smo odpipetirali 3 ml hranilnega medija in dodali resuspendirane celice iz centrifugirke. Celice smo inkubirali pri 37 °C in 95 % zračni vlagi ter 5 % CO₂-ju. Po približno 7–10 dnevih, ko so celice dosegle zeleno gostoto, smo jih dali stresati čez noč pri 225 rpm. Naslednje jutro smo menjali medij in celice inkubirali do večera pri 37 °C in 95 % zračni vlagi ter 5 % CO₂-ju. Po enakem postopku smo stresali astrocite še naslednja dva dneva, tretje jutro pa smo jih presadili v centrifugirke s površino 10 cm². Celice smo najprej odlepili s tripsinom EDTA (5 min pri 37 °C). Sledilo je centrifugiranje 5 min na 900 rpm in resuspenzija v hranilnem mediju. Iz vsake podgane smo praviloma pripravili dvanajst centrifugirk s površino 10 cm², ki smo jih inkubirali pri 37 °C in 95 % zračni vlagi ter 5 % CO₂-ju do uporabe. Svežo primarno kulturo smo pripravljali vsakih 14 dni.

2–3 dni pred poskusi smo celice iz centrifugirk nasadili na krovnike. Astrocite smo odlepili s tripsinom-EDTA ter inkubirali pri 36,5 °C 5 min. V dve mikrocentrifugirki (1,5 ml) smo prenesli po 1 ml vsebine centrifugirke. Centrifugirali smo 5 min pri 490 rpm. Odlili smo supernatant in v posamezno mikrocentrifugirko dodali 700–1000 μl hranilnega medija, odvisno od starosti primarne celične kulture. Vsebino mikrocentrifugirke smo po trikrat previdno povlekli skozi igle debeline 1,1 mm, 0,8 mm in 0,6 mm. 50 μl resuspendiranih celic smo enakomerno razmazali po krovniku z 1 % poli-L-lizinom do takšne gostote, da

so bili posamezni astroцитi dovolj narazen in se niso stikali niti po treh dneh. Volumen smo po potrebi prilagodili glede na gostoto celične kulture. Krovnike smo inkubirali 40 min pri 37 °C, da so se astroцитi oprijeli podlage. Nato smo jim dodali 2 ml hranilnega medija. Astroцитe smo inkubirali pri 37 °C in 95 % zračni vlagi ter 5 % CO₂-ju. Hranilni medij smo menjali vsake dva dni. Celice smo porabili v dveh do štirih dneh od priprave.

3.1.2 Priprava akutno izoliranih astroцитov

Akutno izolirane astroцитe smo pripravili iz možganske skorje novorojenih (2–3 dni) ali starih (7–8 tednov) podgan. Tkivo smo ločili z uporabo kompleta za disociacijo možganov (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Nemčija). Astroцитe smo očistili z magnetnim označevanjem s protitelesi anti-GLAST (ACSA-1) in jih takoj nasadili na krovna stekelca (premera 22 mm), prekrita z 1 % poli-L-lizinom (10 % za astroцитe iz odraslih podgan). Poskuse smo izvedli 2–24 ur po izolaciji.

3.1.3 Vnos plazmidne DNA in peptidnih toksinov v sesalske celice

En dan po nasajanju smo v kontrolne celice vnesli plazmidno DNA (1 µg/ml), ki kodira zeleni fluorescentni protein (ang. pEGFP-N1) s transfekcijskim reagentom Lipofectamin (2000 ali LTX, Invitrogen) v mediju Opti-Mem (Gibco). Vnos peptida lahke verige (koncentracija 5 pmol/l) botulinusnih toksinov D in E (BotD, BotE) smo izvedli sočasno z vnosom pEGFP-N1 (1 µg/ml) z namenom identifikacije uspešno transfekciranih celic, medtem ko je imel konstrukt dnSNARE dodan zapis za protein EGFP že na plazmidu (Zhang in sod., 2004), zato dodaten vnos pEGFP-N1 ni bil potreben. 5 ur po transfekciji smo celicam dodali Ultraser G (2% koncentracija), naslednje jutro pa zamenjali medij s hranilnim gojiščem. Poskuse smo izvajali v obdobju 1–3 dni po transfekciji.

3.1.4 Imunocitokemija

Postopek označevanja proteinov v astroцитih pri imunocitokemiji je potekal po uveljavljeni metodi (Rupnik in sod., 2000). Celice smo pri sobni temperaturi spirali s fosfatnim pufrom (PBS, Sigma-Aldrich, ZDA) 3 min in jih 10 min fiksirali v 4 % formaldehidu (Sigma-Aldrich) z dodanim detergentom (0,1 % Triton X-100, Sigma-Aldrich), ki permeabilizira plazmalemo in tako omogoči vstop protiteles v citoplazmo. Celice smo nato štirikrat sprali s PBS (po 3 min na sobni temperaturi) in 1 h inkubirali pri 37 °C v 3 % govejem serumskem albuminu (BSA, Sigma-Aldrich) in 10 % kozjem serumu (Sigma-Aldrich) v PBS, da bi preprečili nespecifično označevanje. Celice smo nato sprali s PBS (3 min na sobni temperaturi), 2 h inkubirali s primarnimi protitelesi raztopljenimi v 3 % raztopini BSA pri 37 °C in jih ponovno štirikrat sprali s PBS (po 3 min na sobni temperaturi). Nato smo celice 45 min inkubirali s sekundarnimi, fluorescentno označenimi protitelesi, raztopljenimi v 3 % raztopini BSA pri 37 °C. Primarna in sekundarna protitelesa smo uporabili v različnih redčitvah v PBS s 3 % BSA. Po spiranju s PBS smo krovna stekelca

zalepili na objektna stekla skupaj z 20 μ l reagenta Slow Fade-Gold Antifade (Invitrogen), ki upočasnjuje bledenje fluoroforjev.

Za označevanje vzorcev, namenjenih za mikroskopijo STED, smo uporabili poliklonska primarna zajčja protitelesa proti VGLUT1 (1:800; Synaptic Systems), ANP (1:800; Abcam), BDNF (1:2000; Abcam), D-serinu (1:1000; Gemacbio) ali LAMP1 (1:800; Abcam) ter sekundarna fluorescentno označena protitelesa raztopljena v 3 % raztopini BSA proti zajčjim IgG, konjugirana s fluorescenčnim barvilom (Atto 647N, 1:100).

Da bi potrdili uspešnost delovanja botulinusnih toksinov na proteine SNARE, smo v astrocite najprej vnesli pEGFP-N1 in lahko verigo BotE ter 24-48 ur kasneje izvedli imunocitokemijo, kjer smo uporabili primarna zajčja protitelesa proti SNAP23 (1:100; SySy) in sekundarno protitelo označeno proti zajčjim IgG, konjugirana s fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor® 546 (1:600, Life Technologies, ZDA). Primarna protitelesa proti SNAP23 specifično prepoznajo odcepljeni del proteina SNAP23 in so zato uporabna za študij delovanja BotE.

3.1.5 Označevanje celic z MANT-ATP, kvinakrinom in barvilom LysoTracker

Astrocite smo označili v 50 μ M MANT-ATP (Molecular Probes, Invitrogen) v gojišču 8 h pri 37 °C, jih sprali v gojišču 1 h pri 37 °C, nato sprali s PBS ter fiksirali z 2 % formaldehidom, in sicer 5 min na sobni temperaturi. MANT-ATP je analog nukleotida ATP, ki ima na ribozno skupino dodan fluorofor. Za obarvanje kislih predelkov smo astrocite označili z 1 μ M kvinakrin dihidrokloridom (Sigma Aldrich, Nemčija) v zunajcelični raztopini 15 min na sobni temperaturi. Celice smo nato sprali z zunajcelično raztopino (5 min) in fiksirali z 2 % formaldehidom 5 s. Astrocite smo označili z 200 nM LysoTracker barvilom v zunajcelični raztopini tako, da smo jih inkubirali 5 min pri 37 °C. Označevanje celic je potekalo v sodelovanju z dr. Priyanko Singh in dr. Nino Vardjan.

3.1.6 Elektrofiziološke meritve

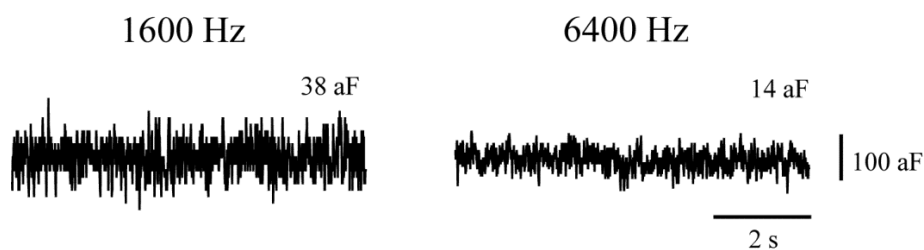
Elektrofiziološka metoda vpete napetosti krpice membrane omogoča spremljanje eksocitotske aktivnosti posamezne celice za številne celične tipe, ki izločajo hormone ali različne kemijske prenašalce in temelji na meritvi membranske kapacitivnosti (C_m), parametra, ki je premosorazmeren površini membrane. V procesu eksocitotske aktivnosti C_m naraste zaradi dodajanja membrane mešičkov v plazmalemo (Neher in Marty, 1982). Meritve C_m v konfiguraciji pritrjene celice (ang. cell-attached) imajo boljšo ločljivost kot meritve C_m celotne membrane, zato lahko opazujemo interakcije (fuzije in fizije) posameznih sekrecijskih mešičkov s plazmalemo (Kreft in Zorec, 1997).

Mikropipete za elektrofiziološke meritve smo pripravili iz borosilikatnih steklenih kapilar zunanlega premera 1,5 mm (Harvard Apparatus) s pomočjo vlačilca pipet (Model P-97, Shutter Instrument), in sicer tako, da je premer konice pipet znašal približno 1 μ m. Ker so

po obdelavi imele oster rob, smo ga zgladili s toplotno obdelavo z žarilno žico. Na koncu smo konice mikropipet prevlekli še s hidrofobno smolo (Sylgard, Down Corning, ZDA), da smo zmanjšali šumnost meritev. Pipete smo pripravljali vsak dan sproti, saj smo tako izboljšali kakovost pečatov (Neher, 1992). Uporabljali smo pipete, napolnjene z zunajcelično raztopino, katerih upornost je znašala 3–6 M Ω .

Vse meritve smo izvedli pri sobni temperaturi. Mikropipeto in nosilec pipete smo napolnili z zunajcelično raztopino ter vanj pritrdili pipeto. Pipeto smo temeljito osušili s papirnato brisačo in skupaj z nosilcem vstavili v merilno sondo. Referenčno elektrodo Ag/AgCl smo potopili v zunajcelično raztopino na krovnem stekelcu in jo povezali z referenčnim kontaktom na sondi. Nato smo z uporabo mikromanipulatorja v raztopino potopili mikropipeto (merilno elektrodo), vpeli potencial pipete na 0 mV in ji izmerili upornost (Rituper in sod., 2013a). Mikropipeto smo z mikromanipulatorjem (Eppendorf Injectman, Nemčija) približali celici, se je dotaknili in ustvarili gigaomski pečat s podtlakom. Pojem gigaomski pečat se nanaša na gigaomsko upornost, ki je posledica tesnega mehanskega stika med stekleno merilno pipeto ter membrano (Neher, 1992). Tesen pečat bistveno zmanjša tokovni šum meritve (Neher, 1992). Za meritve smo izbirali posamezne celice zvezdaste oblike. Ko smo vzpostavili dober pečat, je bila upornost najmanj 1 G Ω . Sledila je kompenzacija stresne kapacitivnosti na stekleni pipeti na fazno občutljivem ojačevalniku tako, da na membrani ni bilo nobenega neto toka. V naslednji stopnji smo nastavili fazni kot z uporabo ojačevalca tako, da je ločil spremembe v realnem delu signala (Re) od sprememb v imaginarnem delu signala (Im), ki je bil zamaknjen za $\pi/2$. Eden od signalov je bil tako sorazmeren spremembam v membranski kapacitivnosti (C_m) (Im – signal imaginarnega dela admitance, ki je proporcionalen s kapacitivnostjo), medtem ko so na drugega vplivale spremembe upornosti in tudi membranske kapacitivnosti (Re – signal realnega dela admitance) (Lindau, 1991). Pravilnost faznega kota smo preverili tako, da smo prožili kalibracijske pulze velikosti 10 fF, ki so ob pravilni nastavitvi faznega kota imeli negativni odklon samo na Im delu signala in ne tudi na Re delu signala. Fazni kot smo nastavili za vsak poskus posebej in ga po potrebi uravnavali tudi med meritvijo.

Na celico smo privedli vzbujujočo sinusno napetost (izmenična napetost): $U = U_0 \cdot \sin\omega \cdot t$ (ω predstavlja kotno hitrost, ν predstavlja frekvenco sinusne napetosti, t pa čas) (Rituper in sod., 2013a) z amplitudo 300 mV (111 mV rms). Pri naših poskusih smo uporabljali frekvenco 6,4 kHz, ki nam je omogočala nizek šum (sl. 4). Signale, dobljene s fazno občutljivim ojačevalcem, smo dvakrat ojačali in nizkoprepustno filtrirali (30 Hz, -3dB, Celica, Slovenija) ter digitalizirali z A/D pretvornikom in s pomočjo programa CELL (CELL – Electrophysiology software, verzija 2.3, Celica) zajeli ter shranili na računalnik. Zajemali in beležili smo signal enosmernega toka (Im, [pA]), signal toka, ki je v fazi z napetostjo, ter signal toka, ki je fazno zamaknjen za $\pi/2$.



Slika 4: Izboljšanje šuma pri meritvah membranske kapacitivnosti. Instrumentalni šum določen v stanju proste sonde je bil pri frekvenci sinusne napetosti 6400 Hz močno izboljššan v primerjavi s frekvenco 1600 Hz. Šum (rms) je bil določen iz 3 s intervalov in je pri frekvenci 1600 Hz znašal 38 aF, pri frekvenci 6400 Hz pa 14 aF.

Figure 4: Noise Reduction in Membrane Capacitance Measurements. Instrumental capacitance noise recorded in the open head-stage configuration at driving sine voltage with a frequency of 6400 Hz was much better compared to 1600 Hz. Noise (rms) was determined for 3 s intervals and was 38 aF at 1600 Hz and 14 aF at 6400 Hz.

Celice smo opazovali pri sobni temperaturi z invertnim svetlobnim mikroskopom Zeiss Axioobserver A1 pri 400-kratni povečavi (vodni objektiv 40-kratna, okular 10-kratna). Krovno stekelce smo vstavili v kamrico in ga fiksirali z vijaki, kamrico pa položili na objektno mizico mikroskopa. Na krovno stekelce smo dodali 200 μ l zunajcelične raztopine. Celice, ki so izražale EGFP, smo identificirali z monokromatorjem (Polychrome IV, Till Photonics) pri vzbujevalni svetlobi valovne dolžine 480 nm. Fluorescenco smo zbrali z emisijskim filtrom za valovne dolžine 515–565 nm. Objektiv se je nahajal pod krovnim stekelcem, osvetlitev pa nad njim, kar je omogočalo dostop do celic s stekleno mikropipeto ob uporabi mikromanipulatorja (Eppendorf Injectman). Mikroskop je stal v ozemljeni Faradayevi kletki na protivibracijski mizi, da zunanje elektromagnetno valovanje ter mehanski tresljaji niso motili meritev. V konfiguraciji pritrjene celice smo spremljali spontano eksocitotsko aktivnost v normalni zunajcelični raztopini (200 μ l) ~500 s, ki mu je sledil dodatek stimulacijske raztopine (ATP, 1mM) ter spremljanje eksocitotske aktivnosti nadaljnjih ~500 s. Meritve smo izvedli na kontrolnih celicah, v katere smo predhodno vnesli pEGFP-N1, ter celicah, tretiranih z BotE, BotD ali dnSNARE; celicah, stimuliranih z adrenalinom, adrenalinom in ATP-jem, ATP-jem, z zunajcelično raztopino brez Ca^{2+} ; celicah tretiranih z BAPTA, metil- β -ciklodekstinom (M β CD) ali nasičenim holesterolom.

3.1.7 Poskusi na tkivnih rezinah

Priprava tkivnih rezin je potekala v sodelovanju z Mathildé Le Bail in prof. Jean-Pierre Mothet z Aix Univerze v Marseillu. Tkivne kulture smo pripravili iz možganov 2–3 mesecev starih podgan. Podgane pod anestezijo (izofluran) smo dekapitali z giljotino in jim odstranili možgane v cerebrospinalnemu likvorju podobni raztopini (ang. artificial cerebrospinal fluid; ACSF) pri 0 °C. ACSF je bila oksigenirana s 95 % (volumski odstotek) O_2 in 5 % (volumski odstotek) CO_2 . Tkivne rezine debeline 350 μ m smo pripravili z vibratomom Leica VT1000 S (Nußloch, Nemčija) in jih do barvanja inkubirali na 30 °C v

oksigenirani ACSF z 2,5 mM Mg^{2+} in 1 mM Ca^{2+} . Za označevanje smo uporabili sulforodamin 101 (25 μ M, 10 min), nato pa je sledilo spiranje v ACSF 20 min.

Označene tkivne rezine smo prenesli v snemalno kamrico, vpeto v motoriziran sistem Slice Platform (Scientifica, Velika Britanija), ki je bil opremljen z fluorescenčnim mikroskopom (Olympus BX51W1, Center Valley, ZDA) in 20-kratnim vodnim objektivom. ACSF, namenjena snemanju, je vsebovala 1,3 mM Mg^{2+} in 2,5 mM Ca^{2+} , je bila oksigenirana in je imela pretok 2 ml/min. Fluorescenco astrocitov v regiji CA1 hipokampusa, označenih s sulforodaminom, smo identificirali z monokromatorjem (Polychrome IV, Till Photonics) pri vzbujevalni svetlobi valovne dolžine 565 nm in zajeli z emisijskim filtrom, ki prepušča valovne dolžine 570–650 nm. Elektrofiziološke poskuse vpete napetosti krpice membrane v konfiguraciji pritrjene celice smo izvedli na s sulforodaminom označenih astrocitih kot že opisano (glej poglavje 3.1.6 Elektrofiziološke meritve). Za poskuse na tkivnih rezinah smo uporabljali fazno občutljivi ojačevalce SWAM IIC z vzbujajočo sinusno napetostjo frekvence 1,6 kHz.

3.1.8 Mikroskopija STED

Mikroskopija STED (ang. STimulated Emission Depletion, kar pomeni fluorescenčna mikroskopija z vzbujenim praznjenjem emisije) presega omejitve ločljivosti fluorescenčne mikroskopije, ki jo je odkril in opisal nemški fizik Ernst Karel Abbe leta 1873. Leta 1994 je Stefan W. Hell zasnoval (Hell in Wichmann, 1994) in leta 1999 prvi zgradil mikroskop STED ter leta 2014 zanj dobil Nobelovo nagrado za področje kemije. Mikroskopija STED temelji na uporabi dodatnega laserja, ki prisili fluorokrome k izsevanju fotonov z daljšo valovno dolžino, preden bi jih ti oddali spontano (Fölling in sod., 2008). Prisiljeno in spontano izsevanje lahko ločimo na osnovi različnih valovnih dolžin s filtri in dikroičnimi zrcali. Pri običajnih fluorescenčnih mikroskopijah je ločljivost odvisna od valovne dolžine svetlobe, lomnega količnika snovi, v kateri je objekt opazovanja, in sinusa vpadnega kota. Pri mikroskopiji STED pa je ločljivost odvisna predvsem od moči laserja, s katerim praznimo emisije. Omejeni smo z barvili, katerih bledenje narašča z močjo laserja (Bückers in sod., 2011).

Meritve smo opravili na mikroskopu STED, ki je bil zgrajen v sodelovanju s prof. Stefanom W. Hellom (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen) ter dr. Alexandrom Egnerjem in dr. Claudio Geisler z inštituta Laser-Laboratorium Göttingen. Pri imunocitokemičnem označevanju mešičkov je sodelovala dr. Priyanka Singh, pri zajemanju slik pa somentor dr. Jernej Jorgačevski. Uporabili smo laser (Fianium, Velika Britanija), ki proži pulze dolge 100 ps, ki si sledijo na vsakih 50 ns, in ima tri izhode: en je namenjen vzbujanju fluorescence (t.i. beli laser z valovnimi dolžinami 450–2000 nm; za meritve smo z dikroičnimi zrcali in filtri izbrali curek z valovno dolžino 650 nm), dva izhoda pa sta namenjena praznjenju emisij (za meritve smo uporabili curek z valovno dolžino 745 nm). Celice smo opazovali pri sobni temperaturi z invertnim svetlobnim

mikroskopom Zeiss Axioobserver A1 (oljni DIC objektiv 100-kratna povečava, NA (numerična apertura) 1,4). Slike STED smo zajeli z vrstičnim vzorčenjem, kjer je bila velikost slikovnega elementa $25 \text{ nm} \times 25 \text{ nm}$ in časom zajemanja 25–50 μs /slikovni element. Za vsak vzorec smo zajeli konfokalno sliko in sliko STED s programom ImSpector (Schonle A., 2006, www.imspector.de).

3.1.9 Mikroskopija SIM

Mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo (ang. structured illumination microscopy; SIM) je visokoločljivostna tehnika, ki podvoji lateralno in aksialno ločljivost svetlobnega mikroskopa do ločljivosti $\sim 100 \text{ nm}$ v lateralni in $\sim 300 \text{ nm}$ v aksialni smeri (Gustafsson, 2000). Za določevanje premerov mešičkov smo uporabili mikroskop SIM Zeiss Elyra PS1 (Zeiss, oljni imerzijski filter $63\times$, NA 1,4). Velikost slikovnega elementa je bila $40 \text{ nm} \times 40 \text{ nm}$. Fluorescenco MANT-ATP smo vzbujali z diodnim laserjem pri valovni dolžini 405 nm, emitirano svetlobo pa zajemali s filtrom, ki prepušča valovne dolžine 420–480 nm. Fluorescenco barvil kvinakrin in Lysotracker smo vzbujali z argonskim (Ar) laserjem pri valovni dolžini 488 nm, emitirano svetlobo pa zajemali s filtrom, ki prepušča valovne dolžine 495–575 nm. Fluorescenco sekundarnih protiteles Alexa Fluor® 546, konjugiranih s primarnimi protitelesi proti LAMP1, smo vzbujali s DPSS 561-10 laserjem z valovno dolžino 561 nm, emitirano svetlobo pa zajemali s filtrom, ki prepušča valovne dolžine 570–650 nm. Slike smo zajeli in obdelali s programom Zen (Zeiss, 2011).

3.1.10 Konfokalna mikroskopija

Signale fluorescenčno označenih astrocitov smo zajemali s konfokalnim mikroskopom Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss, oljni imerzijski objektiv, Plan-neofluar $63\times$, NA 1,4). Fluorescenco EGFP smo vzbujali z argonskim (Ar) laserjem pri valovni dolžini 488 nm, emitirano svetlobo smo zajemali s filtrom, ki prepušča valovne dolžine 503–530 nm. Fluorescenco sekundarnih protiteles Alexa Fluor® 546 smo vzbujali s helij-neonskim (He/Ne) laserjem z valovno dolžino 543 nm, emitirano svetlobo pa zajemali s filtrom, ki prepušča valovne dolžine nad 560 nm.

3.1.11 Določitev razmerja med holesterolom in proteini v astrocitih

Za določitev koncentracije holesterola smo uporabili reagente Amplex Red (Life Technologies). Celice (približno 5×10^5 na vzorec) smo inkubirali v 10 mM M β CD 30 min, jih dvakrat sprali z medijem DMEM in jih za poskuse replacije holesterola inkubirali v nasičenem holesterolu nadaljnjih 30 min. Po tretiranju smo celice dvakrat centrifugirali na 1200 rpm po 5 min in jih nato 15 min lizirali v CelLyticu (Sigma-Aldrich, Nemčija) na 500 rpm pri 37 °C. Posamezen vzorec smo nato razdelili na tri dele in vsakemu dodali reakcijsko mešanico Amplex Red. Za določitev koncentracije smo uporabili naslednje standarde: 0 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 3,5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 7,5 $\mu\text{g/ml}$ in 10

$\mu\text{g/ml}$, ki smo jim enako dodali reakcijsko mešanico. Vzorce in standarde smo nato inkubirali 30 min pri $37\text{ }^\circ\text{C}$, jih prenesli na mikrotitrne plošče in izmerili fluorescenco z vzbujanjem pri 560 nm in emisijo pri 590 nm. Za standarde smo izrisali umeritveno krivuljo (prilagoditev krivulje je bila linearna) in ekstrapolirali koncentracijo v vzorcih.

Celotno koncentracijo proteinov smo določili z reagenti BCA (bicinhoninska kislina, ang. bicinchoninic acid, Thermo Scientific). Standardi za umeritveno krivuljo so bili: $0\text{ }\mu\text{g/ml}$, $6,25\text{ }\mu\text{g/ml}$, $12,5\text{ }\mu\text{g/ml}$, $25\text{ }\mu\text{g/ml}$, $50\text{ }\mu\text{g/ml}$, $100\text{ }\mu\text{g/ml}$, $250\text{ }\mu\text{g/ml}$, $500\text{ }\mu\text{g/ml}$, $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$ in $2000\text{ }\mu\text{g/ml}$. Vzorce in standarde smo nanesti na mikrotitrsko ploščo in jim dodali reagentno mešanico v razmerju 1:8. Ploščo smo nato inkubirali 30 min pri $37\text{ }^\circ\text{C}$ in po 30 min izmerili absorbanco pri 562 nm. Iz standardov smo določili umeritveno krivuljo in ekstrapolirali vrednosti vzorcev.

Vrednosti razmerja med holesterolom in proteini smo določili tako, da smo delili dobljene koncentracije za posamezen vzorec. Določanje razmerja med holesterolom in proteini je potekalo v sodelovanju z dr. Boštjanom Rituperjem.

3.2 ANALIZE IN STATISTIČNO OVREDNOTENJE REZULTATOV

3.2.1 Analiza elektrofizioloških meritev

Analize meritev smo opravili s programom CellAn (Celica, Slovenija), posebej razvitim za tovrstne meritve. Uporabljen program temelji na programskem jeziku MATLAB (Math Works, Natick MA, ZDA) in omogoča podrobno pregledovanje signalov, digitalno nizkopasovno filtriranje in označevanje posameznih dogodkov. Pri označevanju dogodkov smo si pomagali tudi z opazovanjem signala v programu CELL. Kriterij za dogodek popolne fuzije je bil diskretni skok v komponenti signala I_m , ki je presegal trikratno vrednost standardne deviacije šuma in ni bil preslikan na tokovno komponento (signal na toku običajno predstavlja odpiranje ionskih kanalčkov). Da je dogodek ustrezal kriteriju prehodnega dogodka fuzije mešička, je diskretnemu skoku v amplitudi navzgor sledil diskretni skok v I_m navzdol s podobno amplitudo ($\pm 10\%$) v manj kot treh sekundah. Ti dogodki predstavljajo t.i. prehodno fuzijo mešička s plazmalemo (Alvarez de Toledo in sod., 1993). Ireverzibilni dogodki v signalu I_m predstavljajo popolno fuzijo oz. fisijo mešičkov s plazmalemo (Neher in Marty, 1982). Iz meritev smo izmerili naslednje parametre: amplitudo dogodkov, frekvenco in dolžino trajanja dogodkov. Amplitudo prehodnega dogodka smo izračunali kot aritmetično sredino med amplitudo diskretnega skoka navzgor in skoka navzdol. Pojavnost oz. frekvenco dogodkov smo določili kot število dogodkov na enoto časa. Dolžina trajanja dogodka oz. čas odprtosti fuzijske pore je čas med skokom navzgor in skoka navzdol v signalu I_m pri prehodnih dogodkih in predstavlja čas, ko je notranjost mešička povezana z zunajceličnim prostorom prek fuzijske pore. Verjetnost odprtosti fuzijske pore smo izračunali kot celokupen čas, ko je fuzijska pora odprta, deljen s trajanjem posamezne meritve.

Za dogodke, ki so bili projicirani tudi na signal Re , smo izračunali dodatne parametre: G_p , C_v ter iz njiju r_p in r_m (Spruce in sod., 1990). G_p predstavlja prevodnost fuzijske pore (enačba 1), medtem ko C_v predstavlja kapacitivnost sekrecijskega mešička (enačba 2).

$$G_p = \frac{Im^2 + Re^2}{Re} \quad \dots (1)$$

$$C_v = \frac{Im^2 + Re^2}{Im} \quad \dots (2)$$

Polmer fuzijske pore (r_p) izračunamo iz enačbe 3.

$$G_p = \frac{\pi r_p^2}{\rho \lambda} \quad \dots (3)$$

ρ predstavlja ocenjeno upornost raztopine (100 Ωcm), λ pa ocenjeno dolžino fuzijske pore (15 nm) (Spruce in sod., 1990). Polmer sekrecijskih mešičkov (r_m) smo izračunali z upoštevanjem specifične membranske kapacitivnosti, ki v astrocitih znaša 10 $\text{fF}/\mu\text{m}^2$ (Gentet in sod., 2000).

3.2.2 Analiza premera glijotransmiterskih mešičkov

3.2.2.1 Analiza slik zajetih z mikroskopom STED

Za analizo slik STED je dr. Claudia Geilser uporabila program MATLAB (MathWorks, Natick, MA, ZDA) in izvedla analizo, ki je vključevala: (i) detekcijo gruč fluorescence z določitvijo prazne vrednosti intenzitete fluorescence, (ii) nelinearna prilagoditev 2D Gaussove distribucije z dolžinama d_x in d_y na polovični višini maksimalne vrednosti intenzitete zaznanih gruč in (iii) grafična predstavitev v obliki histograma povprečij širine $d=(d_x+d_y)/2$. Z mikroskopijo STED smo določili premere mešičkov, označenih s protitelesi proti VGLUT1, D-serinu, ANP in BDNF.

3.2.2.2 Analiza slik zajetih z mikroskopom SIM

Z mikroskopijo SIM smo izmerili premere lizosomov v astrocitih, obarvanih z barvili MANT-ATP, kvinakrin in Lysotracker ter astrocitih, označenimi s protitelesi proti LAMP1. Premer smo izmerili v ekvatorialnem delu signala, in sicer v x in y smeri, ter ga določili kot širino signala na polovici maksimalne intenzitete fluorescence. Podatke smo prikazali v obliki histograma.

3.2.3 Analiza fluorescentno označenega SNAP23

Da bi potrdili uspešno cepljenje proteina SNAP23 z botulinusnim toksinom tipa E, smo slike, ki smo jih zajeli s konfokalnim mikroskopom, izvozili v zapis bio format in jih prenesli v program ImageJ (NIH, ZDA). Za vse celice smo določili regijo interesa, ki je

obsegala celotno celico, in jim določili prazno vrednost intenzitete (IsoData, ImageJ). Število slikovnih elementov nad prazno vrednostjo smo določili v kontrolah in astrocitih, tretiranih z BotE, in podatke statistično obdelali.

3.2.4 Statistična analiza

Rezultati so podani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka. Statistično značilne razlike smo v elektrofizioloških meritvah ugotavljali z Mann-Whitneyevim u-testom. Skupine vzorcev premerov mešičkov smo primerjali s Studentovim t-testom. Za elektrofiziološke meritve, kjer so bili pogoji soodvisni, smo uporabili statistični test ANOVA. Statistično značilne razlike so bile tiste, kjer je bil $P < 0,05$ (*). Posebej pa smo označili razlike, kjer je bil $P < 0,01$ (**) oz. $P < 0,001$ (***). Za analizo podatkov in risanje grafov smo uporabili program Sigma Plot (Verzija 11.0, ZDA).

3.3 MATERIALI

3.3.4 Hranilni mediji in raztopine

3.3.4.1 Hranilni medij za astrocite

- 10 ml FBS (fetalni goveji serum) (Biocrom AG, Nemčija);
- 1 ml Na-piruvat (S8636, Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 1 ml 200 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 50 μ l penicilin in streptomycin;
- do 100 ml DMEM (ang. Dulbecco's modified eagles's medium) z 4500 mg/L glukoze, piridoksinom, HCl in NaHCO₃ (D5671, Sigma-Aldrich, Nemčija).

3.3.4.2 Izolacijski medij za astrocite

- 125 ml L-15 (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 1,25 ml 200 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 62,5 μ l penicilin in streptomycin;
- 0,125 g BSA (goveji serumski albumin) (Sigma-Aldrich, Nemčija).

3.3.4.3 Zunajcelična raztopina

- 130 mM NaCl (0,761 g) (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 5 mM KCl (0,037 g) (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 1 mM MgCl₂ (12 μ l nasičene raztopine) (Kemika, Hrvaška);
- 2 mM CaCl₂ (30 μ l nasičene raztopine) (Riedel-de Haën, Nemčija);
- 10 mM D-glukoza (0,180 g) (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 10 mM HEPES (0,238 g) (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- do 200 ml dodana miliQ H₂O.

Vse zgoraj omenjene raztopine smo sterilno filtrirali s filtrom (Sarstedt, Nemčija) s premerom por 0,2 μm in hranili pri 4 °C. Za zunajcelično raztopino brez Ca^{2+} smo CaCl_2 nadomestili z NaCl .

3.3.4.4 Stimulacijske raztopine

Na zalogo smo si pripravili raztopino z ATP-jem. 100 mM ATP smo pripravili v vodi miliQ in uravnali pH na 7.2 z 1 M KOH. Raztopino smo alikvotirali in do uporabe hranili na -20 °C.

Za poskuse z adrenalinom smo si na zalogo pripravili tudi raztopino adrenalina. 272 mM adrenalin smo pripravili v vodi miliQ in uravnali pH na 7.2 z 1 M KOH. Raztopino smo alikvotirali in do uporabe hranili na -20 °C.

Za poskuse odzemanja holesterola smo si pripravili 30 mM raztopino M β CD v mediju DMEM, ki smo jo do uporabe hranili na 4 °C. 100 mM M β CD z nasičenim holesterolom je bil pripravljen v DMEMu v molskem razmerju M β CD:holesterol 10:1 (mol/mol). Raztopino smo dobro premešali in sonificirali 20 min v vodni kopeli. Sledilo je stresanje pri 250 rpm pri 37 °C preko noči. Naslednje jutro smo raztopino filtrirali.

3.3.4.5 Cerebrospinalnemu likvorju podobna raztopina

- 123 mM NaCl (3,6 g) (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 2,5 mM KCl (0,093 g) (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 1,3 mM NaH_2PO_4 (0,078 g) (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 26,2 mM NaHCO_3 (1,1 g) (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 1,3 mM MgCl_2 (95 μl) (Kemika, Hrvaška)
- 2,5 mM CaCl_2 (111 μl) (Riedel-de Haën, Nemčija);
- 10 mM D-glukoza (0,90 g) (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- do 500 ml dodana miliQ H_2O

Cerebrospinalnemu likvorju podobna raztopina (ACSF) je bila pripravljena dnevno ter do uporabe hranjena na ledu. Za potrebe disekcije in okrevanja tkivnih rezin smo spremenili vsebnost Mg^{2+} in Ca^{2+} ionov. ACSF namenjena disekciji je vsebovala 4 mM MgCl_2 in 0,5 mM CaCl_2 , ACSF namenjena okrevanju tkivnih rezin pa 2,5 mM MgCl_2 in 1 mM CaCl_2 .

3.3.5 Botulinusna nevrotoksina tipa D in E (BotD in BotE) in dnSNARE

V naših poskusih smo uporabljali lahki verigi BotD, ki cepi VAMP2, in BotE, ki cepi protein SNAP25 in murinski SNAP23 (Vaidyanathan in sod., 1999). Toksina nam je podaril prof. dr. Bazbek Davletov (Sheffield, Western Bank, Velika Britanija). Konstrukt dnSNARE nam je podaril prof. dr. Philip Haydon (Tufts, Boston, ZDA).

3.3.6 Amplex Red in BCA kit

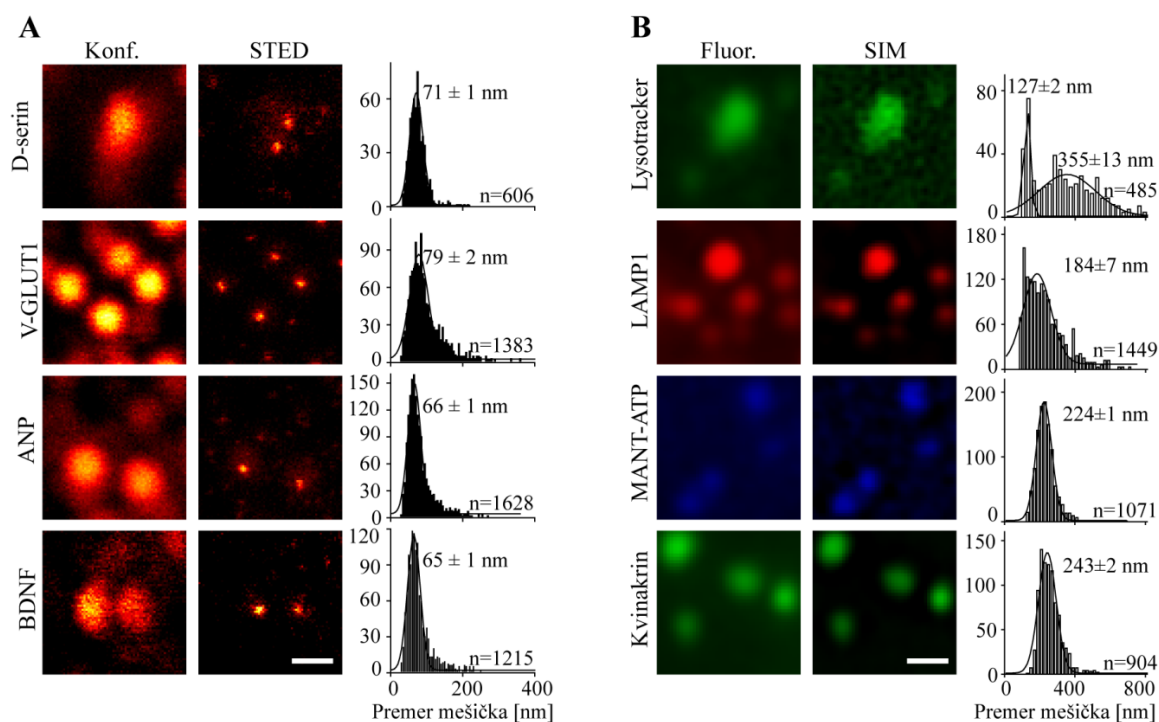
Za določitev koncentracije holesterola smo uporabili reagente Amplex Red (Life Technologies). Celotno koncentracijo proteinov smo določili z reagenti BCA (Thermo scientific).

4 REZULTATI

4.1 PREMERI MEŠIČKOV V ASTROCITIH

Glijotransmiterji se v astrocitih skladiščijo v sekretijskih mešičkih, ki omogočajo uravnavano izločanje ob stimulaciji (pregledano v (Guček in sod., 2012)). Objavljeni premeri mešičkov so v razponu od 30 do nekaj 100 nm (sl. 3) (Bezzi in sod., 2004; Chen in sod., 2005). Najmanjši, sinaptičnim podobni mešički, so velikostnega razreda okrog 30 nm (Bezzi in sod., 2004) in jih zato ne moremo natančno izmeriti s klasičnimi mikroskopskimi tehnikami, ki so omejene z uklonom svetlobe (prib. 200 nm lateralno in 500 nm po z osi). Razvoj naprednih superločljivostnih mikroskopij je v zadnjih letih omogočil več načinov, kako preseči omejitve ločljivosti, ki so pogojene z uklonom svetlobe. Dve takšni tehniki sta mikroskopija STED in mikroskopija SIM, ki omogočata spremljanje struktur velikostnega razreda okoli 40 nm (STED; ločljivost našega sistema) oziroma 120 nm (SIM; ločljivost našega sistema).

Za enoznačno določitev premerov različnih mešičkov, ki vsebujejo glijotransmiterje, smo astrocite fluorescenčno označili s protitelesi proti posameznim glijotransmiterjem. Rezultati meritev na primarni celični kulturi astrocitov so zbrani na sl. 5. Povprečni premeri mešičkov, ki vsebujejo aminokislino in peptide in so preračunani tako, da upoštevajo optično ločljivost našega sistema, so: 85 nm za mešičke z D-serinom ($n = 606$), 96 nm za glutamatne mešičke ($n = 1383$; te mešičke prepoznajo protitelesa proti glutamatnemu transporterju VGLUT1), 78 nm za mešičke z ANP ($n = 1628$) in 76 nm za mešičke z BDNF ($n = 1215$). Mikroskopija STED se je izkazala neprimerna za endolizosome označene s protitelesi proti LAMP1 (sl. 6), ker so bili epitopi na posameznih endolizosomih preveč razmaknjeni, da bi posamezni endolizosomi imeli enoten fluorescenčni signal (sl. 6Bii).

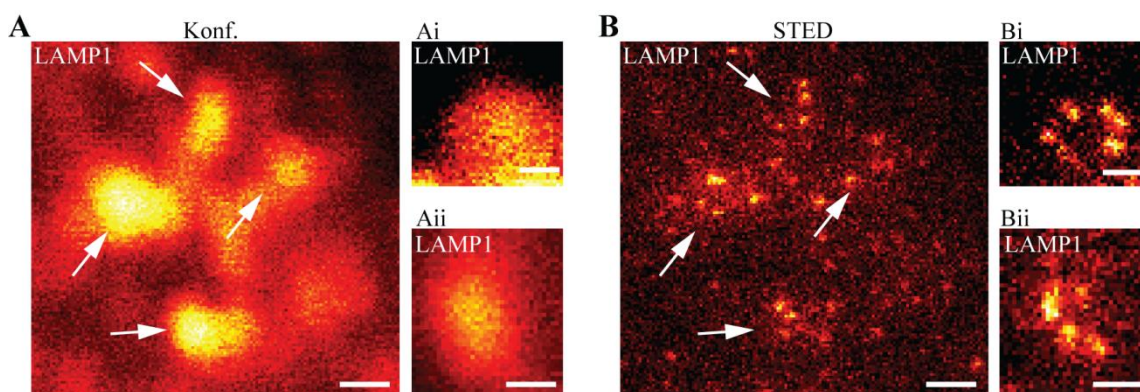


Slika 5: Mešički z glijotransmiterji v primarni celični kulturi astrocitov. A) Povečani izseki slik fluorescenčno označenih mešičkov, posnetih z mikroskopom STED. Za primerjavo imamo na levi strani konfokalne ((konf.) slike, na desni strani pa slike STED (STED) istih izsekov. Mešički so bili označeni s protitelesi proti aminokislini D-serin, proti vezikularnemu glutamatnemu transporterju VGLUT1, proti peptidu ANP in proti BDNF. Histogrami na desni prikazujejo porazdelitve premerov mešičkov ($n = 2$ celici na vsako označevanje). Razporeditve smo opisali z Gaussovimi krivuljami, povprečja (\pm standardna napaka) so napisana ob posameznem vrhu. Številke levo prikazujejo število mešičkov (n), merilo je 500 nm. **B)** Povečani izseki slik fluorescenčno označenih endolizosomov, kisljih predelkov in kompartmentov, ki vsebujejo ATP, posnetih z mikroskopom SIM. Za primerjavo imamo na levi strani fluorescenčne (fluor.) slike, na desni strani pa slike SIM. Kisle predelke smo označili z barvilom LysoTracker, endolizosome pa s protitelesi proti LAMP1 in kompartmente, označene z ATP, z analogom MANT-ATP ali kvinakrinom. Histogrami na desni prikazujejo premere mešičkov. Razporeditve smo opisali z Gaussovimi krivuljami, povprečja (\pm standardna napaka) so napisana ob posameznem vrhu. Številke levo prikazujejo število mešičkov, merilo je 500 nm.

Figure 5: Gliotransmitter Vesicles in Primary Culture of Astrocytes. A) Confocal and STED images of immunostained vesicles containing amino acids D-serine and glutamate (antibody against the vesicle glutamate transporter VGLUT1) and peptides ANP and BDNF. Histograms on the right display STED-acquired vesicle diameter distributions of two cells per staining. The curves show vesicle diameter distributions fitted with the Gaussian curve; numbers adjacent to the distribution peaks indicate the average vesicle diameter (average \pm SEM). n , number of vesicles. Scale bar, 500 nm. **B)** Wide-field and SIM images of acidic vesicles stained by LysoTracker, endolysosomal vesicles immunostained by LAMP1 antibodies, and vesicles loaded with the ATP analogue MANT-ATP and ATP marker quinacrine dihydrochloride (kvinakrin). Histograms on the right show SIM-acquired vesicle diameter distributions. The curves represent Gaussian fits of the diameter distributions with the average vesicle diameter (average \pm SEM) labelled adjacent to the distribution peaks. Scale bar, 500 nm.

Povprečni premeri lizosomov, označenih s protitelesi proti LAMP1 in posnetih z mikroskopom SIM, so bili približno 200 nm (184 ± 7 nm, $n = 1449$; sl. 5B). Znano je, da se v endolizosomih, ki jih prepoznajo protitelesa proti LAMP1, skladišči ATP, ki se lahko z

uravnavano eksocitozo sprošča v zunajcelični prostor (Zhang in sod., 2007). Preverili smo, če se premeri mešičkov, ki vsebujejo ATP, razlikujejo od premerov endolizosomov. Astrocite smo označili z barvilom kvinakrin, ki označi ATP-vsebujoče mešičke (Pangršič in sod., 2007) in ATP analogom MANT-ATP (sl. 5B). Obe označevanji sta pokazali podobne rezultate premerov mešičkov: 243 ± 2 nm (kvinakrin, $n = 904$) in 224 ± 1 nm (MANT-ATP, $n = 1071$). Barvilo Lysotracker, ki označi kisle kompartmente (Potokar in sod., 2010), je obarvalo dve populaciji mešičkov, prvo s povprečnim premerom 127 ± 2 nm, in drugo s povprečnim premerom 355 ± 13 nm. Prva populacija verjetno predstavlja mešičke z glijotransmitterji, pri čemer so premeri mešičkov, izmerjeni z mikroskopijo SIM, večji kot tisti, določeni z mikroskopijo STED zaradi slabše ločljivosti. Del druge populacije pa verjetno predstavljajo endolizosomi. Večje povprečne vrednosti premerov mešičkov označenih z barvilom Lysotracker najverjetneje odražajo prisotnost večjih kislih kompartmentov, ki ne vsebujejo epitopa, ki ga prepoznajo protitelesa proti LAMP1.

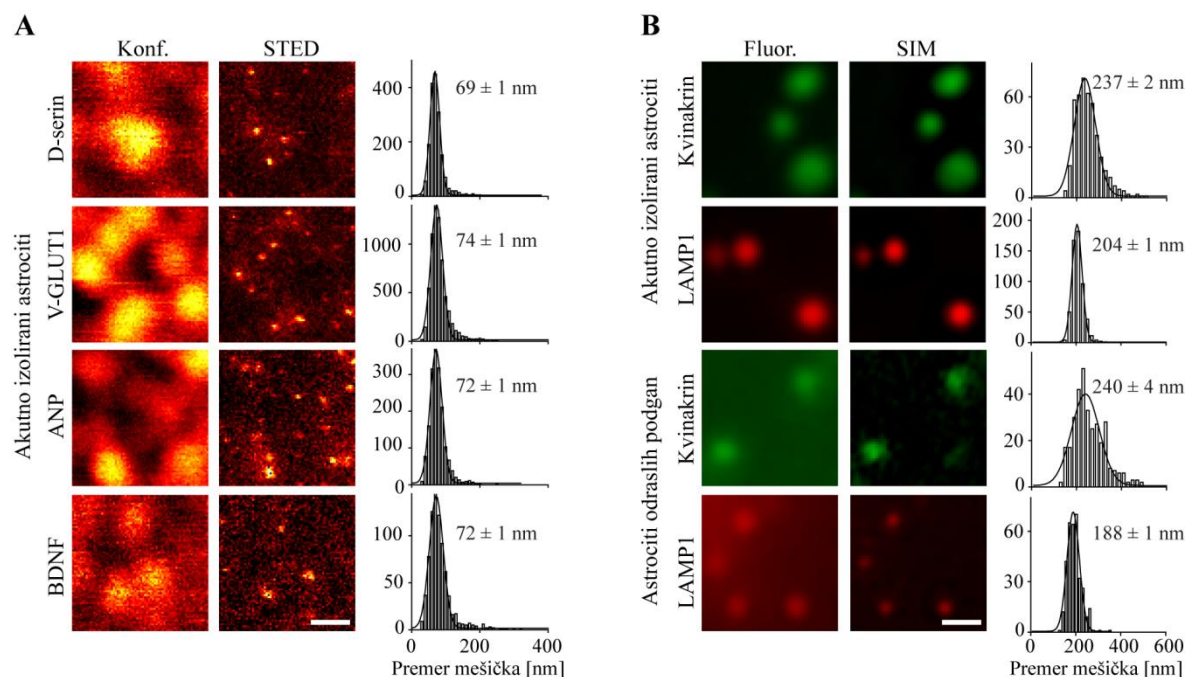


Slika 6: Primeri endolizosomov v izoliranih astrocitih. **A)** Konfokalna slika (konf.) in **B)** slika STED dela astrocita, fluorescenčno označenega s protitelesi proti LAMP1. S puščicami so označeni mešički, katerih fluorescenčni signal je enoten na konfokalni sliki (**A**), na sliki STED pa je fluorescenčni signal istih struktur zrnat (**B**). Redki primeri endolizosomov (**Ai** in **Bi**) imajo sferično razporeditev na membrani, ki bi omogočala določitev premera. V večini primerov določitev premera ni mogoča, npr. **Aii** in **Bii**. Merilo: 500 nm za veliki sliki, 300 nm za male slike.

Figure 6: Examples of Endolysosomes in Isolated Astrocytes. **A)** Confocal micrographs of LAMP1-labelled structures reveal homogeneous fluorescent signals of individual structures. **B)** STED micrographs reveal a discontinuous fluorescent signal of LAMP1-positive structures. Only rarely (compare panels Ai and Bi) did the distribution of discontinuous fluorescent signals appear to be a part of a spherical structure, i.e. a vesicle, and an apparent vesicle diameter could be estimated. However, in most cases STED micrographs were not suitable for the determination of lysosomal vesicle diameter if lysosomes were labelled by LAMP1 antibodies. Scale bars on larger micrographs: 500 nm. Scale bars on smaller micrographs: 300 nm.

Astroцитi *in vivo* tvorijo številne povezave s sosednjimi nevroni in astrociti. Ocenjeno je, da lahko posamezen astroцит obdaja tudi do 140000 sinaps (Bushong in sod., 2002). V primarni celični kulturi je nevronov zanemarljivo malo, astroцитi pa rastejo v več pasažah. Posledično obstaja nevarnost, da se primarna celična kultura razlikuje od astroцитov *in vivo*, kar lahko vodi v dvom o obstoju glijotransmisije (Hamilton in Attwell, 2010). Zato smo

preverili, če se anatomske značilnosti (premerov) mešičkov primarne celične kulture razlikujejo od akutno izoliranih astrocitov novorojenih in odraslih podgan (sl. 7).



Slika 7: Mešički z gliotransmitterji v akutno izoliranih in odraslih podganah. **A)** Povečani izseki slik fluorescenčno označenih mešičkov, posnetih z mikroskopom STED. Za primerjavo imamo na levi strani konfokalne (konf.) slike, na desni strani pa slike STED (STED) istih izsekov. Mešički so bili označeni s protitelesi proti aminokislini D-serin ($n = 1788$), proti vezikularnemu glutamatnemu transporterju VGLUT1 ($n = 6787$), proti peptidu ANP ($n = 1747$) in proti BDNF ($n = 798$). Histogrami na desni prikazujejo porazdelitev premerov mešičkov ($n = 2$ celici na vsako barvanje). Razporeditve smo opisali z Gaussovimi krivuljami, povprečja (\pm standardna napaka) so napisana ob posameznem vrhu. Številke levo prikazujejo število mešičkov (n), merilo je 500 nm. **B)** Povečani izseki slik fluorescenčno označenih endolizosomov, kislih predelkov in kompartmentov, ki vsebujejo ATP, posnetih z mikroskopom SIM. Za primerjavo imamo na levi strani fluorescenčne (fluor.) slike, na desni strani pa slike SIM. Endolizosome smo označili s protitelesi proti LAMP1 ($n = 557$ mešičkov iz dveh celic akutno izoliranih neonatalnih podgan ter $n = 338$ mešičkov iz treh celic iz akutno izoliranih odraslih podgan) in kompartmente z ATP s kvinakrinom ($n = 445$ mešičkov iz dveh celic akutno izoliranih neonatalnih podgan ter $n = 333$ mešičkov iz treh celic iz akutno izoliranih odraslih podgan). Histogrami na desni prikazujejo premere mešičkov. Razporeditve smo opisali z Gaussovimi krivuljami, povprečja (\pm standardna napaka) so napisana ob posameznem vrhu. Številke levo prikazujejo število mešičkov, merilo je 500 nm.

Figure 7: Gliotransmitter Vesicles in Acutely Isolated and Adult-Rat Astrocytes. **A)** Confocal and STED microscopy images of immunostained D-serine-, VGLUT1-, ANP- and BDNF-positive vesicles in acutely isolated astrocytes. Histograms display STED-acquired vesicle diameter distributions for 1788 (D-serine), 6787 (VGLUT1), 1747 (ANP) and 798 (BDNF) vesicles (2 cells per staining). The black curves show Gaussian fits of the diameter distributions, the numbers next to the distribution peaks indicate the average vesicle diameter (average \pm SEM). Scale bar, 500 nm. **B)** Wide-field microscopy and SIM were used to determine the vesicle diameter of immunostained LAMP1 endolysosomes and ATP-loaded vesicles (quinacrine dihydrochloride). Histograms show SIM-acquired vesicle diameter distributions for 557 (LAMP1, 2 cells) and 445 (kvinakrin, 2 cells) vesicles in acutely isolated astrocytes (upper two panels) and 338 (LAMP1, 3 cells) and 333 (kvinakrin, 6 cells) vesicles in astrocytes isolated from 7–8-weeks old rats

(lower two panels). The black curves show Gaussian fits of the diameter distributions; the average vesicle diameter (average \pm SEM) is labelled next to the distribution peaks. Scale bar, 500 nm.

Z mikroskopijo STED smo pokazali, da so premeri mešičkov z glijotransmitterji iz akutno izoliranih novorojenih podgan primerljivi s premeri mešičkov z glijotransmitterji iz celičnih kultur astrocitov. Rezultati za akutno izolirane novorojene astrocite so zbrani na sl. 7A. Povprečni premeri mešičkov, ki vsebujejo aminokislino in peptide in so preračunani tako, da upoštevajo optično ločljivost našega sistema, so: 81 nm za mešičke z D-serinom ($n = 1788$), 88 nm za mešičke z VGLUT1 ($n = 6787$), 86 nm za mešičke z ANP ($n = 1747$) in 87 nm za mešičke z BDNF ($n = 798$). Povprečni premer mešičkov z ATP, označenih z barvilom kvinakrin, je v akutno izoliranih astrocitih neonatalnih podganah 237 ± 2 nm ($n = 338$), v astrocitih odraslih podgan pa 240 ± 4 nm ($n = 333$). Ti premeri so primerljivi s premeri mešičkov v astrocitih primarne celične kulture (243 ± 2 nm). Do podobnega zaključka smo prišli tudi pri endolizosomih označenih z LAMP1. Povprečni premer endolizosomov v akutno izoliranih astrocitih novorojenih podgan je 204 ± 1 nm ($n = 571$), v astrocitih odraslih podgan pa 188 ± 2 nm ($n = 338$). Ti premeri so primerljivi s premeri mešičkov v astrocitih primarne celične kulture (184 ± 7 nm).

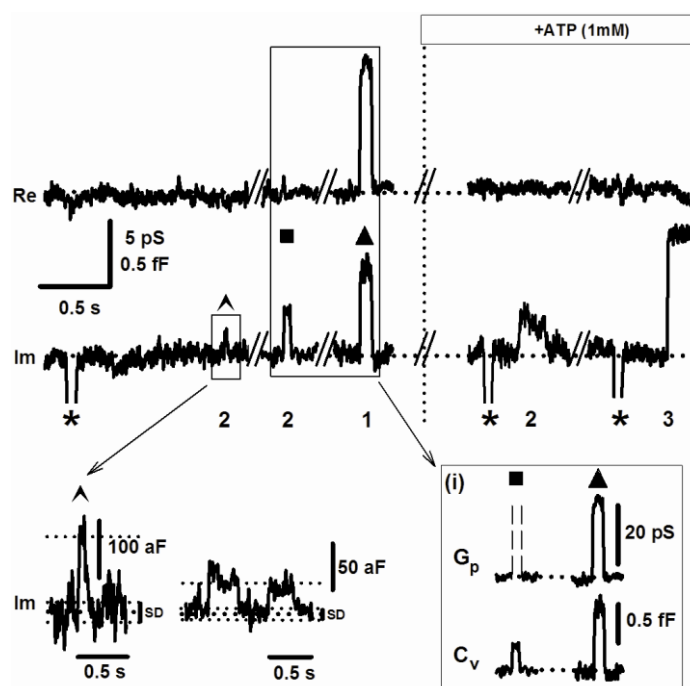
Rezultati meritev premerov mešičkov z glijotransmitterji nakazujejo, da sta aminokislini D-serin in glutamat ter peptida ANP in BDNF prisotna v mešičkih s premerom ~ 70 nm, medtem ko je ATP prisoten v mešičkih s premerom ~ 200 nm. Pokazali smo, da se velikosti mešičkov v astrocitih primarne celične kulture ne razlikuje od velikosti mešičkov akutno izoliranih astrocitov novorojenih in odraslih podgan.

4.2 NEPOSREDNO SPREMLJANJE FUZIJE MEMBRANE MEŠIČKOV S PLAZMALEMO

Elektrofiziološke meritve membranske kapacitivnosti omogočajo spremljanje procesov ekso- in endocitoze v realnem času (Rituper in sod., 2013a), saj so spremembe v membranski kapacitivnosti (C_m) neposredno povezane s spremembami v površini plazmaleme (Neher in Marty, 1982). S konfiguracijo pritrjene celice lahko merimo elementarne dogodke fuzije in fisije posameznih mešičkov s plazmalemo. Da bi preučili lastnosti elementarnih dogodkov fuzije, smo meritve izvedli v primarni celični kulturi astrocitov v spontanah in stimuliranih pogojih. Vsaka meritev je bila sestavljena iz dveh delov. Spremembe v C_m smo najprej 500 s spremljali v spontanah pogojih. Sledil je dodatek 1 mM ATP, ki v astrocitih poveča $[Ca^{2+}]_i$ (Pangršič in sod., 2006), kar je znan stimulus uravnavane eksocitoze v sinapsah (Heidelberger in sod., 1994) ter spremljanje sprememb v C_m nadaljnjih 500 s. Iz poskusov na nevroendokrinih celicah (Vardjan in sod., 2007; Calejo in sod., 2013) je znano, da v procesu zlivanja s plazmalemo mešiček preide več stopenj, preden se popolnoma zlije s plazmalemo.

Reprezentativni diskretni skoki v C_m so prikazani na sl. 8. V spontanah pogojih (sl. 8, levo zgoraj) smo opazili reverzibilne diskretne skoke različnih amplitud v signalu I_m . Dogodki,

ki so imeli večje amplitude, so pogosto imeli preslikavo na signal Re (s trikotnikom označen dogodek), medtem ko dogodki z manjšimi amplitudami preslikav na signal Re ponavadi niso imeli. Dogodkom v signalu Im, ki so imeli preslikavo na signal Re, smo izračunali vrednost G_p (poudarjeno v kvadratu). Po stimulaciji (sl. 8, desno zgoraj) se je dogodkom z manjšimi amplitudami podaljšal čas odprte fuzijske pore, dogodki z večjimi amplitudami pa so se pogosto popolno zlili s plazmalemo (ireverzibilni dogodek z oznako 3). Reverzibilni diskretni skoki predstavljajo dogodke prehodne fuzije mešičkov (Alvarez de Toledo in sod., 1993), medtem ko ireverzibilni diskretni skoki ustrezajo popolni fuziji mešičkov s plazmalemo (Neher in Marty, 1982).



Slika 8: Elementarni dogodki eksocitoze v astrocitih. Zgornji del prikazuje izsek realne komponente (Re), spodnji del pa imaginarne komponente (Im) časovno odvisnega signala admittance celice v spontanah razmerah (levo zgoraj) in po stimulaciji z ATP (desno zgoraj). Na signalu Im so vidni reverzibilni dogodki z amplitudo manj kot 0,5 fF, ki niso preslikani na signal Re (oznaka 2), in reverzibilni dogodki z amplitudo več kot 0,5 fF, ki so preslikani na signal Re (oznaka 1). Dogodek, označen s 3, predstavlja ireverzibilni dogodek. Dogodki s preslikavami na signal Re imajo merljive vrednosti G_p , medtem ko so te zaradi omejitev merilnega sistema za dogodke z večjimi vrednostmi G_p nemerljive (črtkani črti pri dogodku označenem s kvadratom). V kvadratu desno spodaj so prikazane preračunanane vrednosti membranske kapacitivnosti (C_v) in prevodnosti fuzijske pore (G_p). Standardna deviacija šuma (levo spodaj) je bila za ta posnetek 0,037 fF, v drugih posnetkih pa smo izmerili nižje vrednosti, do 0,013 fF (sredina spodaj). Najnižje vrednosti šuma so omogočale spremljanje diskretnih skokov z amplitudami 0,04 fF, ki ustrezajo sekretornim mešičkom s premeri 35 nm.

Figure 8: Unitary Exocytic Events in Astrocytes. Representative discrete steps in membrane capacitance (C_m). The top trace shows the real (Re), the bottom trace the imaginary (Im; proportional to C_m) parts of the admittance signals before (control) and post ATP. Im trace exhibits two types of exocytotic events: reversible events (a discrete on-step is followed by a similar amplitude off-step in C_m , events marked 2) and reversible events exhibiting projections to Re (event marked 1) and the irreversible events at >0.5 fF (event marked 3).

C_v and G_p can be estimated in events marked 1. However, G_p is undetectable for events marked 2 (see

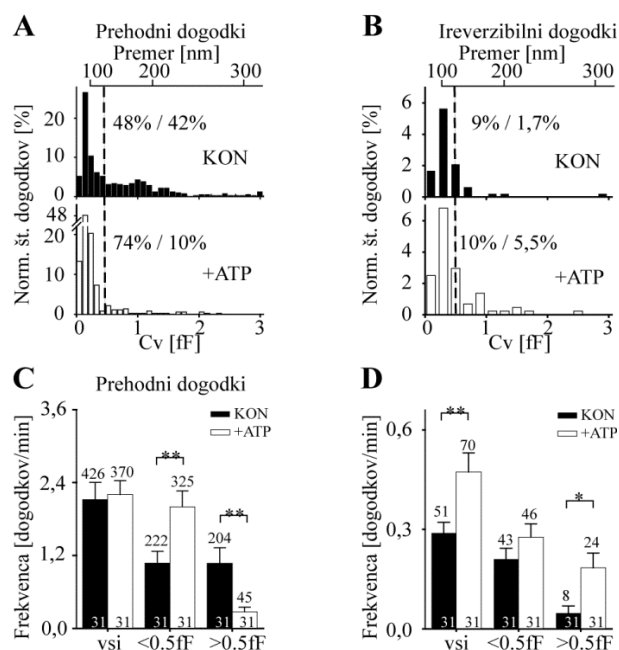
Methods and square-marked-event in (i)). Asterisks denote the calibration pulses, numbers exocytotic stages (as in a). To ascertain that a discrete step in C_m is not due to noise, a discrete step was considered when the amplitude was ≥ 3 times larger than the standard deviation of the noise (bottom left). Noise level for exhibited recordings was 0.037 fF, but the best noise level was elsewhere (0.013 fF, on the right), allowing detection of 0,04 fF events.

V astrocitih so prisotni mešički, ki so po velikosti podobni sinaptičnim, s premerom približno 30 nm (Bergersen in sod., 2011). Spremljanje teh mešičkov elektrofiziološko predstavlja meritve na meji fizikalnih danosti, zato smo vpeljali izboljšave. Frekvenco vzbujajoče sinusne napetosti smo povečali iz 1600 Hz na 6400 Hz (sl. 4), kar je nelinearno zmanjšalo šum (Debus in Lindau, 2000). Dodatno zmanjšanje šuma smo dosegli z natančno izolacijo posameznih komponent merilnega sistema. Minimalen šum, ki smo ga dosegli, je prikazan na sl. 8 (levo spodaj). Pri kriteriju, kjer je dogodek še razpoznaven, če je njegova amplituda večja kot je trikratnik standardne deviacije šuma (za podrobnosti glej Materiale in Metode), je imel najmanjši izmerjen dogodek amplitudo 0.039 fF, kar ustreza mešičku s premerom 35 nm. Zaključimo lahko, da je naš merilni sistem z omenjenimi izboljšavami omogočal meritve celotnega razpona velikosti premerov mešičkov v astrocitih.

4.3 STIMULACIJA Z ATP SPROŽI SELEKTIVNI ODZIV MEŠIČKOV Z RAZLIČNIMI PREMERI

Analiza amplitud C_v reverzibilnih dogodkov fuzije mešičkov je pokazala, da sta v kontrolah prisotni dve populaciji mešičkov (sl. 9A, C), za katere lahko iz vrednosti C_v določimo premere mešičkov. Manjši mešički z amplitudami manjšimi kot 0,5 fF imajo mediano premera 70 nm ($n = 222$). Večji mešički z amplitudami več kot 0,5 fF imajo mediano premera 188 nm ($n = 204$). Ireverzibilni dogodki v spontanah razmerah (sl. 9B) imajo večinoma amplitudo manjšo kot 0,5 fF (9 % vseh dogodkov). Obe populaciji sta se na stimulacijo z ATP odzvali različno. Stimulacija z ATP je povečala delež reverzibilnih dogodkov manjših mešičkov (sl. 9A) in njihovo frekvenco dvakratno (sl. 9C). Manjši mešički so torej po stimulaciji z ATP ostali ujeti v prehodni fuziji, a se jim je povečala frekvenca odpiranja (in zapiranja) fuzijske pore. Frekvenca ireverzibilnih dogodkov fuzije manjših mešičkov je ostala po stimulaciji z ATP nespremenjena (sl. 9D, $P = 0,16$, u-test).

Frekvenca reverzibilnih dogodkov fuzije večjih mešičkov se je po stimulaciji z ATP značilno zmanjšala, kot tudi njihov delež (sl. 9C). Narasli pa sta delež in frekvenca ireverzibilnih dogodkov fuzije večjih mešičkov (sl. 9B, D). Rezultati kažejo, da je stimulacija z ATP privedla do spremembe tipa fuzije večjih mešičkov iz prehodne v popolno fuzijo. Skladno s tem zaključkom so bile amplitude večjih mešičkov, ki so se v spontanah razmerah prehodno zlivale s plazmalemo, primerljive ($P = 0,14$, u-test) z amplitudami mešičkov, ki so se po stimulaciji z ATP popolno zlili s plazmalemo.

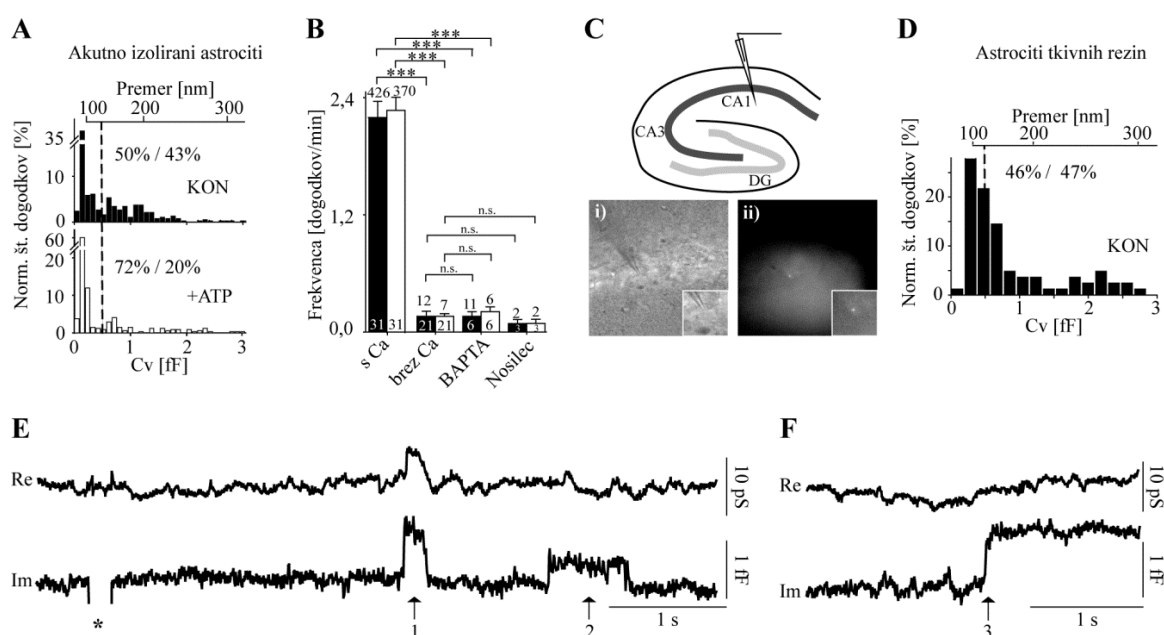


Slika 9: Amplitude in frekvence elementarnih dogodkov uravnavane eksocitoze. A) Histogram amplitud

C_v reverzibilnih dogodkov v spontanah razmerah (zgoraj) in po stimulaciji z ATP (spodaj) prikazuje prisotnost dveh populacij. Meja med obema populacijama je pri 0,5 fF (črtkana črta). V spontanah razmerah sta obe populaciji enakovredno zastopani (44 % manjših mešičkov in 46 % večjih mešičkov), po stimulaciji pa pride do povečanja populacije manjših mešičkov (78 %) in padca populacije večjih mešičkov (9,5 %). Deleži so izračunani glede na število vseh dogodkov, reverzibilnih in ireverzibilnih. **B)** Histogram amplitud C_v ireverzibilnih dogodkov v spontanah razmerah (zgoraj) in po stimulaciji z ATP (spodaj). Po stimulaciji z ATP se je delež ireverzibilnih dogodkov večjih mešičkov povečal za trikrat. **C)** Frekvenca reverzibilnih dogodkov vseh dogodkov se po stimulaciji z ATP ni spremenila ($P = 0,54$, u-test). Ločena obravnava manjših in večjih mešičkov pa je pokazala, da se frekvenca manjših mešičkov značilno poveča, frekvenca večjih mešičkov pa zmanjša ($P = 0,006$, u-test za $< 0,5$ fF in $P = 0,003$, u-test za $> 0,5$ fF). **D)** Frekvenca vseh ireverzibilnih dogodkov je po stimulaciji z ATP (beli stolpec) značilno porasla ($P = 0,006$, u-test) v primerjavi s kontrolo (črni stolpec), in sicer predvsem zaradi povečanja frekvence ireverzibilnih dogodkov večjih mešičkov ($P = 0,013$, u-test). Frekvenca ireverzibilnih dogodkov manjših mešičkov se je sicer tudi povečala, vendar sprememba ni bila značilna ($P = 0,16$, u-test). Števila nad stolpci predstavljajo število dogodkov, števila na dnu stolpcev število analiziranih celic.

Figure 9: Amplitudes and Frequencies of Exocytotic Events in Astrocytes. **A)** The C_v amplitude distributions of reversible exocytotic events in controls (black bars) and post ATP (white bars). Note a increase for < 0.5 fF events (48 % to 74 %) and a decrease for > 0.5 fF events (42 % to 10 %) post ATP. The percentages were estimated by taking into account all reversible and irreversible events recorded. **B)** The C_v amplitude distributions of irreversible events in controls ($n = 31$, black bars) and post ATP ($n = 31$, white bars) show that the percentage of irreversible events at > 0.5 fF increased threefold (1.7 % to 5.5 %) post ATP. **C)** The frequency of all reversible exocytotic events was unchanged post ATP ($P = 0.54$). However, the frequency of < 0.5 fF reversible events significantly increased post ATP compared with controls ($P = 0.006$, u-test), whereas it decreased for > 0.5 fF events ($P = 0.003$, u-test). **D)** The frequency of irreversible exocytotic events significantly increased post ATP (white bars) compared with controls (black bars, $P = 0.006$, u-test). This increase is mainly due to the increased frequency of events at > 0.5 fF ($P = 0.013$, u-test), whereas the frequency of events at < 0.5 fF was unchanged ($P = 0.16$, u-test).

Rezultate, ki smo jih pridobili na primarni celični kulturi astrocitov, smo nato preverili z elektrofiziološkimi meritvami C_m na akutno izoliranih astrocitih novorojenih podgan 2–24 ur po izolaciji. Spremembe v C_m smo spremljali 500 s v spontanah razmerah, nato smo dodali ATP in meritev izvajali nadaljnjih 500 s. Frekvenca reverzibilnih dogodkov v spontanah razmerah je bila $2,6 \pm 0,4$ dogodkov/min ($n = 20$ celic) in je bila primerljiva frekvenci dogodkov v primarni celični kulturi ($P = 0,21$, u-test). Histogram amplitud C_v je prikazan na sl. 10A. Reverzibilni dogodki z amplitudami manjšimi od 0,5 fF (manjši mešički) in amplitudami večjimi od 0,5 fF (večji mešički) so bili v spontanah razmerah enakomerno zastopani (50 % in 43 %). Po stimulaciji z ATP se je delež reverzibilnih dogodkov manjših mešičkov povečal s 50 % na 72 %. Delež reverzibilnih dogodkov večjih mešičkov se je zmanjšal s 43 % na 20 %, podobno kot pri primarni celični kulturi (sl. 9A).



Slika 10: Amplitude elementarnih dogodkov uravnavane eksocitoze akutno izoliranih astrocitov in astrocitov v tkivnih kulturah.

A Histogram C_v amplitud reverzibilnih dogodkov v akutno izoliranih astrocitih v spontanah razmerah (zgoraj) in po stimulaciji z ATP (spodaj) prikazuje prisotnost dveh populacij (razmejenih pri 0,5 fF, črtkana črta). Deleži so izračunani glede na število vseh dogodkov, reverzibilnih in ireverzibilnih skupaj ($n = 375$ v spontanah razmerah, $n = 343$ po stimulaciji z ATP). **B** V pogojih, kjer zunajcelična raztopina ne vsebuje Ca^{2+} (brez Ca^{2+} , $n = 21$ celic), je bila frekvenca reverzibilnih dogodkov značilno zmanjšana, tako pred stimulacijo (črni stolpci) kot po stimulaciji z ATP (beli stolpci), v primerjavi z normalnimi pogoji (s Ca^{2+}) ($P < 0,001$, u-test). Manjšo frekvenco reverzibilnih dogodkov smo izmerili tudi v astrocitih, ki smo jim dodali kelator BAPTA-AM, ki zniža Ca^{2+} znotrajcelično (BAPTA, $n = 6$ celic, $P < 0,001$ - u-test). Nosilec DMSO (1 %), ki je bil prisoten pri poskusih z BAPTA-AM, ni vplival na frekvenco reverzibilnih dogodkov (nosilec, $n = 3$ celice, $P = 0,60$ v nestimuliranih pogojih, $P = 0,17$ po stimulaciji z ATP, u-test). Števila nad stolpci predstavljajo število reverzibilnih dogodkov, števila na dnu stolpcev pa število analiziranih celic. **C** Shematični prikaz regij hipokampusa z regijo CA1, kjer smo izvajali poskuse. **i**) Povečan izsek transmissijske slike hipokampusa regije CA1 z mikropipeto na astrocitu, fluorescenčno označenem s sulfarodaminom **ii**). **D** Histogram C_v amplitud reverzibilnih dogodkov v tkivnih rezinah hipokampusne regije CA1 v spontanah razmerah (KON) prikazuje prisotnost dveh populacij (razmejenih pri 0,5 fF, črtkana črta). Deleži so izračunani glede na število vseh dogodkov, reverzibilnih in ireverzibilnih

skupaj ($n = 88$), in so enakomerno zastopani za manjše in večje mešičke, podobno kot pri primarni celični kulturi (sl. 9A) in akutno izoliranih astrocitih (sl. 10A). **E**) Reprezentativni dogodki elementarne fuzije v tkivnih rezinah hipokamusa regije CA1. Zgornji del prikazuje izsek realne komponente (Re), spodnji del pa imaginarne komponente (Im) časovno odvisnega signala admitance celice v spontanah razmerah. Na signalu Im so vidni reverzibilni dogodki z amplitudo manj kot 0.5 fF, ki niso preslikani na signal Re (oznaka 2), in reverzibilni dogodki z amplitudo več kot 0.5 fF, ki so preslikani na signal Re (oznaka 1). Dogodek, označen s 3, predstavlja ireverzibilni dogodek (**F**).

Figure 10: Reversible Events in Acutely Isolated Astrocytes and Astrocytes in Acute Brain Slices. **A**) The C_v amplitude distributions of reversible events in acutely isolated astrocytes in controls (black bars) and post ATP (white bars). Note the different occurrence of events at < 0.5 fF and > 0.5 fF; similar to cultured astrocytes ($n = 406$ control; $n = 379$ post ATP). The percentages were estimated by taking into account all reversible and irreversible events recorded ($n = 375$ for control; $n = 343$ post ATP). **B**) The frequency of reversible events in controls (black bars) and post ATP (white bars) was significantly decreased compared to non-treated astrocytes ($s Ca^{2+}$) in $noCa^{2+}$ ECS (brez Ca^{2+} , $P < 0.001$, u-test) or after application of a chelator BAPTA-AM ($P < 0.001$, u-test). Vehicle for BAPTA (1 % DMSO): $P = 0.60$ and $P = 0.17$, respectively. The numbers above the error bars represent the number of events recorded; the numbers at the bottom of the bars indicate the number of cells analysed. **C**) A schematic drawing of hippocampus regions with CA1 region, where experiments were performed. Transmitted (**i**) and fluorescent (**ii**) example of a CA1 region with a micropipette (**i**) positioned on sulphorodamine-labelled astrocyte (**ii**). **D**) The C_v amplitude distributions of reversible events in astrocytes from the CA1 hippocampal region of acute brain slices in controls (KON). Note the different occurrence of events at < 0.5 fF and > 0.5 fF; similar to cultured astrocytes (Fig. 9A) and acutely isolated astrocytes (**A**). The percentages were estimated by taking into account all reversible and irreversible events recorded ($n = 88$). **E**) Representative discrete steps in membrane capacitance (C_m) in astrocytes from acute brain slices. The top trace shows the real (Re), the bottom trace the imaginary (Im; proportional to C_m) parts of the admittance signals before (control) and post ATP. Im trace exhibits two types of exocytotic events: reversible events (a discrete on-step is followed by a similar amplitude off-step in C_m , events marked 2) and reversible events exhibiting projections to Re (event marked 1) and the irreversible events at > 0.5 fF (event marked 3; **F**).

Sproščanje glutamata in ATP-ja z uravnano eksocitozo iz astrocitov je odvisna od Ca^{2+} (Parpura in sod., 1994, Liu in sod., 2011). Preverili smo, če predstavljajo naše meritve diskretnih dogodkov v C_m posamezne dogodke uravnane eksocitoze. To smo storili tako, da smo meritve C_m izvedli v zunajcelični raztopini brez Ca^{2+} . Meritve pred stimulacijo so trajale 500 s, nato smo dodali ATP in meritev izvajali nadaljnjih 500 s. Povprečne frekvence pred in po stimulaciji z ATP so zbrane na sl. 10B. Frekvenca reverzibilnih dogodkov v pogojih brez Ca^{2+} je bila značilno nižja kot frekvenca reverzibilnih dogodkov v pogojih s Ca^{2+} pred in po stimulaciji z ATP ($P < 0,001$, u-test). Vlogo znotrajceličnih zalog Ca^{2+} smo določili z meritvami, kjer smo zunajcelični raztopini brez Ca^{2+} dodali kelator BAPTA-AM, ki zniža znotrajcelično koncentracijo Ca^{2+} . Povprečna frekvenca reverzibilnih dogodkov je bila značilno manjša kot pri meritvah v zunajcelični raztopini s Ca^{2+} tako pred kot po stimulaciji z ATP ($P < 0,001$, u-test). Dodatek nosilca (1 % DMSO), namenjen raztapljanju polarnega kelatorja, na rezultate meritev ni vplival pred ($P = 0,60$, u-test) in po stimulaciji z ATP ($P = 0,17$, u-test).

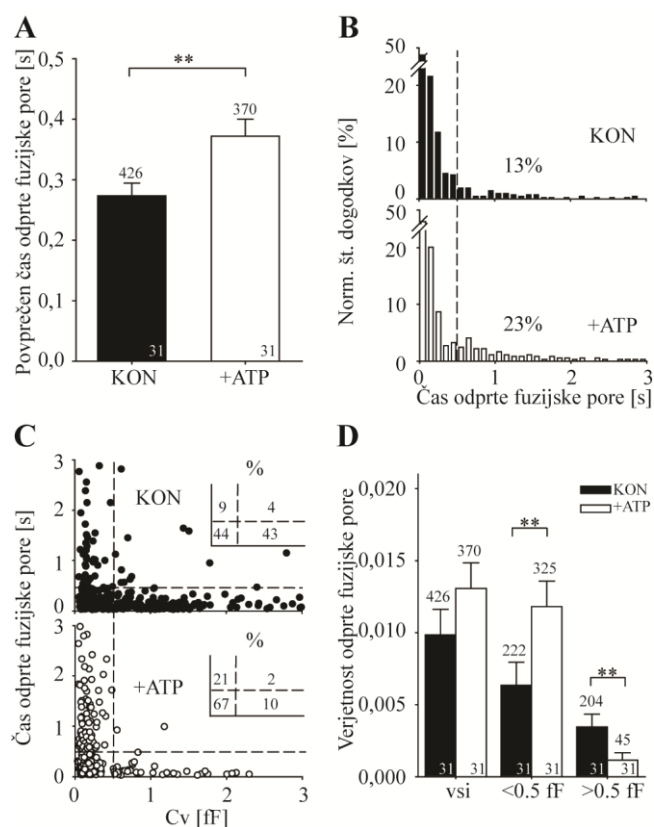
Dodatno smo elektrofiziološke meritve C_m izvedli tudi v astrocitih tkivnih rezin 2-3-mesece starih podgan 2-8 ur po njihovi pripravi. Spremembe v C_m smo spremljali 800 s v

spontanih razmerah na s sulforodaminom označenih astrocitih regije hipokampusa CA1 (sl. 10C). Frekvenca reverzibilnih dogodkov v spontanih razmerah je bila $2,2 \pm 0,9$ dogodkov/min ($n = 5$ celic) in je bila primerljiva frekvenci dogodkov v primarni celični kulturi ($P = 0,85$, u-test). Histogram amplitud C_v je prikazan na sl. 10D. Reverzibilni dogodki z amplitudami manjšimi od $0,5$ fF (manjši mešički, sl. 10E, oznaka 2) in amplitudami večjimi od $0,5$ fF (večji mešički sl. 10E, oznaka 1) so bili v spontanih razmerah enakomerno zastopani (46 % in 47 %), podobno kot v primarni celični kulturi (sl. 9A). Ireverzibilni dogodki (sl. 10F) so imeli povprečno amplitudo membranske kapacitivnosti $1,5 \pm 0,4$ fF ($n = 7$). Frekvenca ireverzibilnih dogodkov je bila $0,14 \pm 0,04$ dogodkov/min in je bila prav tako primerljiva frekvenci ireverzibilnih dogodkov v primarni celični kulturi ($P = 0,06$, u-test).

4.4 PO STIMULACIJI Z ATP SE MEŠIČKOM Z GLIJOTRANSMITERJI ČAS ODPRTE FUZIJSKE PORE PODALJŠA

Na sl. 11 je prikazana analiza časa odprte fuzijske pore. Po stimulaciji z ATP smo izmerili daljši povprečni čas odprte fuzijske pore (sl. 11A, $0,37 \pm 0,03$ s, $n = 31$ celic) v primerjavi s spontanimi razmerami ($0,27 \pm 0,02$ s, $P = 0,003$, u-test). Analiza časa odprte fuzijske pore je pokazala, da se manjši in večji mešički odzovejo na stimulacijo različno, podobno kot smo opazili pri analizi frekvenc. Opazili smo, da imajo manjši mešički po stimulaciji z ATP relativno večji delež reverzibilnih dogodkov, ki imajo čas odprte fuzijske pore daljši od $0,5$ s (sl. 11B, C). Ti dogodki pomembno vplivajo na povprečni čas odprte fuzijske pore (sl. 11A). Čas odprte fuzijske pore reverzibilnih dogodkov večjih mešičkov je bil v spontanih razmerah praviloma krajši od $0,5$ s (izjema so 4 % dogodkov, sl. 11C). Po stimulaciji z ATP se je njihov prispevek močno zmanjšal zaradi nižje frekvence (sl. 9C).

Verjetnost odprte fuzijske pore smo izračunali kot seštevek časov odprte fuzijske pore v posameznem posnetku, deljen z dolžino posnetka. Verjetnost odprte fuzijske pore vseh dogodkov je bila enaka v kontrolah in po stimulaciji z ATP (sl. 11D, $P = 0,1$, u-test). Verjetnost odprte fuzijske pore reverzibilnih dogodkov manjših mešičkov se je po stimulaciji z ATP povečala za faktor dva v primerjavi s spontanimi razmerami ($P = 0,006$, u-test), medtem ko se je za reverzibilne dogodke večjih mešičkov značilno zmanjšala ($P = 0,002$, u-test).



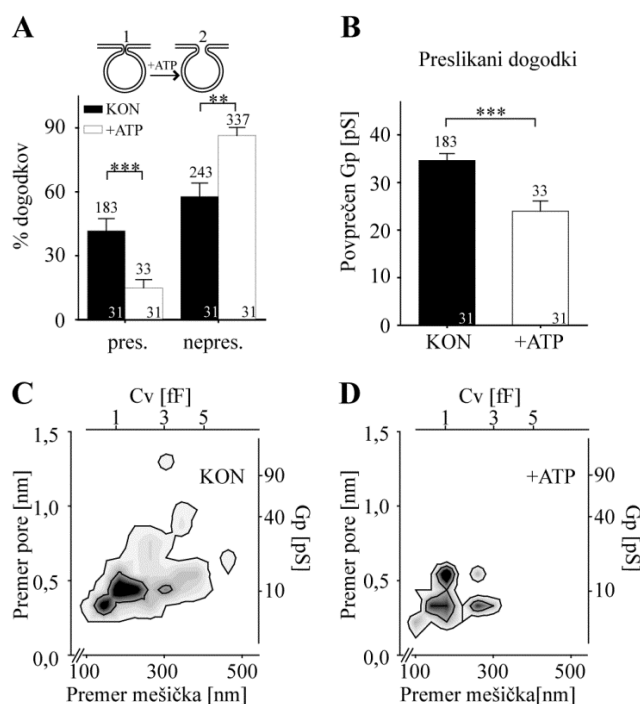
Slika 11: Stimulacija z ATP podaljša čas odprte fuzijske pore. **A)** Povprečen čas odprte fuzijske pore je bil po stimulaciji z ATP (+ATP, beli stolpec) značilno daljši v primerjavi s spontanimi razmerami (KON, črni stolpec; $P = 0,003$, u-test). Sprememba je bila predvsem posledica dvakrat večjega deleža reverzibilnih dogodkov, katerih čas odprte fuzijske pore je bil daljši kot 0,5 s (**B**, KON, črni stolpci in +ATP, beli stolpci). **C)** Čas odprte fuzijske pore reverzibilnih dogodkov v odvisnosti od amplitude C_v kaže, da imajo reverzibilni dogodki manjših mešičkov v spontanih razmerah (KON; črni krogci) fuzijske pore odprte večinoma manj kot 0,5 s. Po stimulaciji z ATP (+ATP, beli krogci) se delež fuzijskih por, ki so odprte dlje kot 0,5 s, poveča, kot tudi verjetnost odprte fuzijske pore (**D**) za manjše mešičke ($P = 0,006$, u-test). Večina reverzibilnih dogodkov večjih mešičkov je imela v spontanih razmerah in po stimulaciji z ATP (**C**) fuzijske pore odprte manj kot 0,5 s, vendar je bila verjetnost odprte fuzijske pore (**D**), zaradi manjše frekvence pojavljanja (glej sl. 9), po stimulaciji z ATP za te dogodke manjša ($P = 0,002$, u-test). Števila nad stolpci predstavljajo število reverzibilnih dogodkov, števila na dnu stolpcev pa število analiziranih celic.

Figure 11: ATP Stimulation Increases the Fusion-Pore Dwell Time of Reversible Exocytic Events. **A)** The average fusion-pore dwell time of reversible events significantly increased after stimulation (white bar, $P = 0.003$) in comparison with controls (black bar). **B)** The fusion-pore dwell time distributions in controls (black bars) and post ATP (white bars). Note the higher percentage of events with dwell time > 0.5 s post ATP (13 % in controls, 23 % post ATP). **C)** The relationship between vesicle capacitance (C_v) and fusion-pore dwell time for reversible exocytic events in controls (black symbols) and post ATP (white symbols). Insets on the right show the percentages of events in different C_v classes. **D)** The probability of fusion-pore open state slightly increased post ATP in comparison with controls ($P = 0.1$, u-test). However, by taking into account only events with amplitudes < 0.5 fF, the probability of fusion-pore open state increased twofold ($P = 0.006$, u-test), and the probability of fusion-pore open state of events with amplitudes > 0.5 fF decreased threefold ($P = 0.002$, u-test). The numbers above the error bars indicate the number of events recorded; the numbers at the bottom of the bars indicate the number of cells analysed.

4.5 PO STIMULACIJI Z ATP SO FUZIJSKE PORE REVERZIBILNIH DOGODKOV ŠIRŠE

Na sproščanje vsebine mešičkov pri prehodni fuziji vpliva, poleg časa odprte fuzijske pore, tudi njena širina. Zato smo preverili, kako stimulacija z ATP vpliva na prevodnost fuzijske pore (G_p). G_p je parameter, iz katerega lahko ocenimo premer fuzijske pore in ga lahko izračunamo za tiste reverzibilne dogodke, ki imajo preslikavo na signal Re (sl. 8, dogodki označeni z 1). Ti dogodki predstavljajo dogodke prehodne fuzije z ozko fuzijsko poro, ki deluje kot upornik, zaradi česar se del signala s signala Im preslika na signal Re (Lollike in Lindau, 1999). Ireverzibilnim dogodkom, ki nimajo preslikave na signal Re, oziroma je ta manjša od šuma meritve, ne moremo določiti G_p , ker imajo fuzijske pore preširoke, da bi jih lahko izmerili (Debus in Lindau, 2000). Najvišja eksperimentalno izmerjena vrednost G_p v astrocitih je bila 287 pS, kar ustreza premeru 2,6 nm (za izračun glej Materiale in Metode).

V spontanah razmerah je bila približno polovica dogodkov preslikana na signal Re (sl. 12A), po stimulaciji z ATP pa je delež preslikanih dogodkov padel na $15 \pm 4 \%$ ($P < 0,001$, u-test). Posledično se je značilno povečal delež nepreslikanih reverzibilnih dogodkov, ki predstavljajo prehodno fuzijo mešičkov s plazmalemo s širokimi fuzijskimi porami. Povprečna vrednost G_p (sl. 12B) je bila v kontrolah 35 ± 2 pS ($n = 183$ dogodkov), po stimulaciji z ATP pa je bila značilno manjša, 24 ± 2 pS ($n = 33$ dogodkov, $P < 0,001$, u-test). Na sl. 12C in D sta prikazani odvisnosti premera fuzijske pore (izračunan iz G_p) od premera mešička (izračunan iz C_v ; okvirne vrednosti desno oziroma na vrhu) v spontanah razmerah (sl. 12C) in po stimulaciji z ATP (sl. 12D). Po stimulaciji z ATP je bil premer večine mešičkov ~ 200 nm s premerom fuzijske pore $\sim 0,5$ nm. V laktotrofih je bilo pokazano, da imajo večji mešički stabilne fuzijske pore z večjimi premeri (Jorgačevski in sod., 2010). To odvisnost smo potrdili tudi v astrocitih, pri čemer smo opazili tudi, da se poveča delež večjih mešičkov, ki se po stimulaciji popolnoma zlijejo s plazmalemo (sl. 9D).



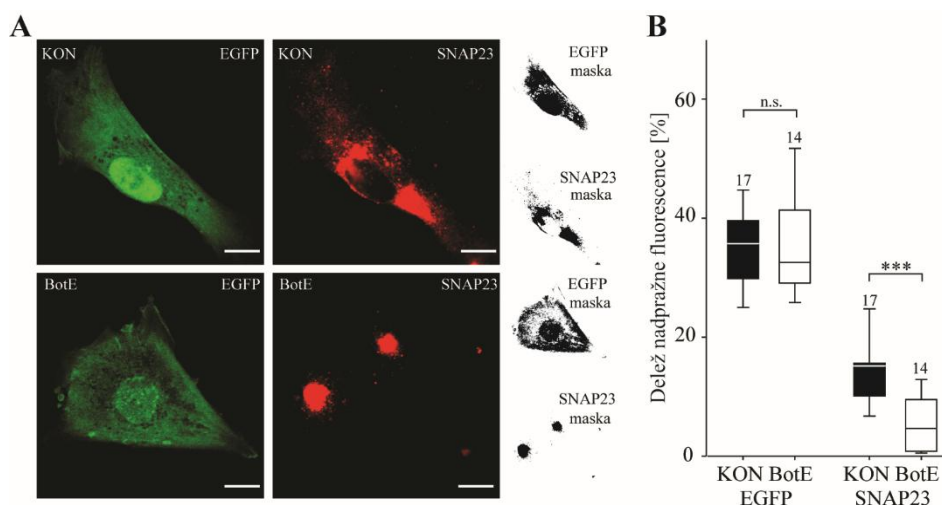
Slika 12: Stimulacija z ATP zmanjša delež preslikanih reverzibilnih dogodkov. **A)** V spontanah razmerah (črna stolpca) je bil delež reverzibilnih dogodkov, ki so bili preslikani na signal Re (pres., $n = 31$ celic), primerljiv deležu dogodkov brez preslikav (nepres., $P = 0,22$, u-test). Po stimulaciji z ATP (bela stolpca) je bil delež preslikanih dogodkov trikrat manjši kot v spontanah razmerah ($P < 0,001$, u-test), značilno pa se je povečal delež nepreslikanih dogodkov ($P = 0,002$, u-test). **B)** Povprečna vrednost prevodnosti fuzijske pore (G_p) preslikanih reverzibilnih dogodkov je bila po stimulaciji z ATP (bel stolpec) značilno manjša v primerjavi s spontanimi razmerami (črn stolpec, $P < 0,001$, u-test). **C)** 2D histogram odvisnosti premera fuzijske pore od premera mešička v spontanah razmerah ($n = 183$, območje sivin 1-15) in **D)** po stimulaciji z ATP ($n = 33$, območje sivin 1-3). Višje frekvence so prikazane s temnejšim odtentkom sive. Zgornja abscisa kaže vrednosti kapacitivnosti mešička (C_v), desna ordinata pa prevodnost fuzijske pore (G_p). V primerjavi s spontanimi razmerami ima po stimulaciji z ATP večina mešičkov premera ~ 200 nm in širino fuzijske pore $\sim 0,5$ nm. Števila nad stolpci predstavljajo število reverzibilnih dogodkov, števila na dnu stolpcev pa število analiziranih celic.

Figure 12: ATP-Mediated Fusion-Pore Widening. **(A)** The percentage of reversible exocytotic events displaying cross-talk between Im and Re (pres., 31 cells) for controls (black bars) is similar to the control events devoid of such projections (nepres., $P = 0.22$, u-test). Stimulation with ATP (white bars) reduced the percentage of projected reversible events threefold compared with controls ($P < 0.001$, u-test), consequently the percentage of non-projected reversible events increased significantly ($P = 0.002$, u-test). **(B)** The average fusion-pore conductance (G_p) of reversible projected exocytotic events was reduced post ATP (white bar, $P < 0.001$, u-test) in comparison with controls (black bar). **(C)** 2D histogram distribution of vesicle diameter (lower abscissa) and fusion-pore diameter (left ordinate) in controls (CON, $n = 183$) and post ATP **(D)**; $n = 33$). Higher frequencies are marked with darker grey. The top abscissa denotes vesicle capacitance (C_v) and the right ordinate denotes G_p . In comparison with **(C)**, note that most of the data are clustered around vesicles with a diameter of ~ 200 nm and a fusion-pore diameter of ~ 0.5 nm. The numbers above the error bars represent the number of events recorded; the numbers at the bottom of the bars indicate the number of cells analysed.

4.6 BOTULINUSNI TOKSINI IN PEPTIDI DNSNARE ZMANJŠAJO POJAVNOST ELEMENTARNIH DOGODKOV

Botulinusni toksini delujejo specifično na posamezne proteine SNARE, ki so povezani s fuzijo membrane mešička in plazmaleme (Schiavo in sod., 2000; Popoff in Poulain, 2010). Fiziološki okvir delovanja je omejen na proteine, ki niso vezani v štirivijačni kompleks SNARE (Popoff in Poulain, 2010). Da bi preverili uspešnost delovanja nevrotoksinov, smo v astrocitate najprej vnesli plazmide z zapisom za EGFP in lahko verigo BotE, po 24 urah pa izvedli označevanje s protitelesi proti SNAP23, ki so označili N-konec in fluorescenčnimi sekundarnimi protitelesi. N-konec, ki ga prepoznajo omenjena protitelesa, pa je BotE odrezal (DRIDIANARAKKLIDS; aa 196-211). Fluorescenco označenih kontrolnih astrocitov (v katere smo vnesli samo pEGFP-N1) in astrocitov, ki smo jih tretirali z BotE, smo zajeli s konfokalnim mikroskopom; rezultati so prikazani na sl. 13.

Iz mikrografij (sl. 13A) je razvidno, da je fluorescenca EGFP enakomerno porazdeljena po celi celici tako v kontrolni kot v celici tretirani z BotE. Fluorescenčni signal označenega SNAP23 je bil bolj lokalni. V kontrolnih celicah je bil skoncentriran v bližini jedra, v nekaterih delih astrocitov pa je bil prisoten tudi na periferiji. V astrocitech, tretiranih z BotE, pa je bil fluorescenčni signal skoncentriran samo na redkih mestih (dve takšni sta prikazani na sl. 13A). Maska predstavlja površino celice, na kateri je označen nadpražni fluorescenčni signal (podrobnosti o analizi so razložene v Materialih in Metodah). Delež površine celice, ki je imela nadpražni fluorescenčni signal (glede na celotno površino celice) za EGFP, se ni razlikoval v kontrolah in v astrocitech, tretiranih z BotE (sl. 13B, $P = 0,79$, u-test). Delež površine celice, ki je imela nadpražni fluorescenčni signal za označeni SNAP23, pa je bil v astrocitech tretiranih z BotE značilno manjši v primerjavi s kontrolo ($P < 0,001$, u-test). Zaključimo lahko, da je bilo cepljenje z BotE uspešno. Sklepamo, da je bilo uspešno tudi cepljenje z BotD, ki je bilo izvedeno po istem postopku in pri enakih pogojih, kot je znano tudi iz literature (Bezzi in sod., 2004; Kreft in sod., 2004).



Slika 13: Kvantifikacija uspešnosti cepljenja BotE v astrocitech, ki so izražali tudi EGFP. A) Reprezentativni mikrografi za kontrolni astrocit (KON) in za astrocit, tretiran z botulinusnim toksinom E

(BotE), ki sta izražala EGFP (zeleno) in smo ju označili s protitelesi proti SNAP-23 (rdeče). Na desni strani so prikazane maske, ki prikazujejo nadpražno fluorescenco. Opazimo lahko, da je rdeče fluorescence po tretiranju astrocitov z BotE manj, najverjetneje zaradi delovanja toksina. Merilo: 10 μm . **B**) Statistična analiza deleža nadpražne fluorescence glede na celo površino celice v kontrolnih astrocitih (KON, črna stolpca, $n = 17$ celic) in astrocitih, tretiranih z BotE (BotE, bela stolpca, $n = 14$ celic). Delež nadpražne površine fluorescence EGFP je bil podoben v kontrolnih astrocitih in astrocitih, tretiranih z BotE ($P = 0.79$, u-test), medtem ko bil delež nadpražne površine fluorescence označenega SNAP23 značilno manjši po tretiranju z BotE ($P < 0,001$, u-test).

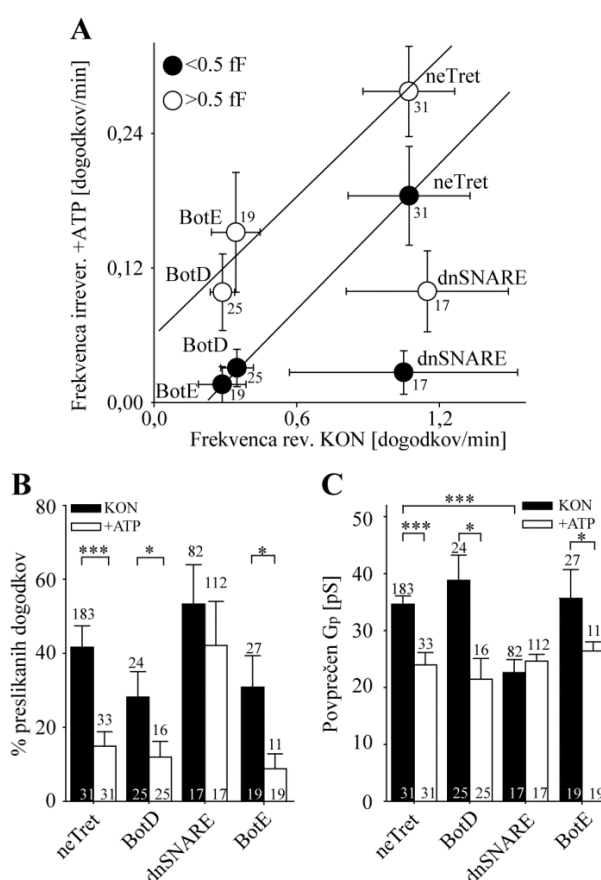
Figure 13: The Quantification of Successful BotE Cleavage in Astrocytes Cotransfected with EGFP. A)

Representative micrographs for controls (KON) and botulinum neurotoxin E (BotE) treated astrocytes transfected with EGFP (green) and immunostained with anti-SNAP23 antibody (red) with masks (right-hand side of the panel). Note a visible decrease in SNAP23 immunostained area for BotE treated cell, due to toxin cleavage. Scale bars: 10 μm . **B**) Statistical analysis of the fluorescence area above the threshold for controls (KON; black bars, $n = 17$) and BotE-treated astrocytes (BotE, white bars, $n = 14$ cells). The fluorescence area above the threshold of EGFP signal was similar in both conditions ($P = 0.79$, u-test), whereas SNAP23 signal exhibited a significant decrease in BotE treated cells ($P < 0.001$, u-test).

V naslednjem koraku smo izvedli meritve C_m na astrocitih, tretiranih z BotD, BotE in dnSNARE. Poskusi so pokazali, da BotD in BotE inhibirata eksocitozo na ravni fuzije posameznih mešičkov s plazmalemo (sl. 14). Frekvenca reverzibilnih dogodkov je bila v astrocitih, tretiranih z BotD in BotE, značilno manjša tako v spontanah razmerah ($P < 0,001$, u-test) kot po stimulaciji z ATP ($P < 0,001$, u-test) v primerjavi s kontrolnimi astrociti. Nadalje smo raziskali, če tretiranje z motilci nastanka kompleksa SNARE različno vpliva na manjše in večje mešičke. Najprej smo preučili razmerje med frekvenco reverzibilnih dogodkov v spontanah razmerah in frekvenco ireverzibilnih dogodkov po stimulaciji z ATP (Sl. 14A). Razmerje med omenjenima frekvencama fuzijskih dogodkov se je za manjše in večje mešičke ohranilo po stimulaciji z ATP in tudi v celicah, tretiranih z BotD ter BotE. Linearna odvisnost med obema frekvencama fuzijskih dogodkov kaže, da je prehod iz prehodne fuzije v spontanah pogojih v popolno fuzijo mešičkov po stimulaciji z ATP ohranjen kljub delovanju toksinov. Nasprotno pa se je razmerje med navedenima frekvencama fuzijskih dogodkov v astrocitih, v katere smo vnesli dnSNARE, spremenilo. Zmanjšanje frekvence ireverzibilnih dogodkov po stimulaciji z ATP je bilo v celicah, v katere smo vnesli dnSNARE, primerljivo z zmanjšanjem po tretiranju z botulinusnima toksinoma ($P > 0,05$ za oba, u-test). V primerjavi z netretiranimi celicami je frekvenca reverzibilnih dogodkov v kontrolnih astrocitih ostala nespremenjena ($P = 0,42$ za spontane razmere, $P = 0,52$ po stimulaciji z ATP, u-test). Astrociti, v katere smo vnesli dnSNARE, so se razlikovali tudi v deležu preslikanih dogodkov (sl. 14B) in v povprečni vrednosti prevodnosti fuzijske pore (sl. 14C). Nasprotno pa smo v astrocitih, tretiranih z botulinusnima toksinoma, opazili pričakovani padec deleža preslikanih dogodkov (sl. 14B) in zmanjšanje G_p (sl. 14C). Delež ozkih fuzijskih por (fuzijske pore, ki so imele merljivo preslikavo na signal Re) se je v astrocitih, v katere smo vnesli dnSNARE (sl. 14B), po stimulaciji z ATP ohranil pri $\sim 50\%$ ($P = 0,45$, u-test). To pomeni, da dnSNARE prepreči razširitev fuzijskih por (premer > 2.6 nm oziroma v popolno fuzijo) (sl. 14A). V

astrocitih, v katere smo vnesli dnSNARE, je bila G_p značilno manjša kot v kontrolnih astrocitih ($P < 0,001$, u-test) in se tudi po stimulaciji z ATP ni spremenila ($P = 0,73$, t-test).

Ti rezultati nakazujejo, da modulacija proteinov SNARE deluje neodvisno od premera mešička, saj se tako manjši kot večji odzivajo podobno. Motilci kompleksa SNARE se med sabo razlikujejo v delovanju: botulinusna toksina zmanjšata frekvenco elementarnih dogodkov neodvisno od premera mešička, medtem ko dnSNARE deluje tako, da stabilizira stanje zelo ozke fuzijske pore s povprečnim premerom $0,65 \pm 0,1$ nm ($n = 17$ celic).



Slika 14: Vpliv BotD, BotE in dnSNARE na fuzijo manjših in večjih mešičkov. **A)** Razmerje med frekvenco reverzibilnih dogodkov (prehodna fuzija) v kontrolnih celicah in ireverzibilnih dogodkov (popolna fuzija) po stimulaciji z ATP za astrocite, ki jih nismo tretirali (neTret; $n = 31$), smo jih tretirali z BotE ($n = 19$) ali z BotD ($n = 25$) lahko opišemo z linearno enačbo za manjše mešičke (črni krogi; $y = (0,21 \pm 0,05) \times x$; $R^2 = 0,95$) in za večje mešičke (beli krogi; $y = (0,21 \pm 0,002) \times x$; $R^2 = 1,0$). Frekvenco reverzibilnih dogodkov je bila po tretiranju z dnSNARE nespremenjena ($n = 17$). Vrednosti v obeh dimenzijah prikazujeta povprečja \pm standardna napaka. Števila ob simbolih predstavljajo število analiziranih celic. **B)** Delež preslikanih reverzibilnih dogodkov po stimulaciji z ATP se je značilno zmanjšal v netretiranih astrocitih (neTret, $P < 0,001$, u-test), v astrocitih, tretiranih z BotD ($P = 0,049$, u-test) in BotE ($P = 0,035$, u-test), ne pa tudi v astrocitih, v katere smo vnesli dnSNARE ($P = 0,45$, u-test). Števila nad stolpci predstavljajo število reverzibilnih dogodkov, števila na dnu stolpcev pa število analiziranih celic. **C)** Povprečna G_p se je po stimulaciji z ATP v astrocitih, tretiranih z BotD ($P = 0,021$, u-test) in BotE ($P = 0,027$, u-test), zmanjšala, podobno kot v kontrolnih astrocitih (neTret, $P < 0,001$, u-test). V astrocitih, v katere smo vnesli dnSNARE, je bila G_p značilno manjša že v spontanem pogojih, v primerjavi s kontrolnimi astrociti ($P < 0,001$, u-test). G_p

se po stimulaciji z ATP v astrocitih, v katere smo vnesli dnSNARE, ni spremenila ($P = 0,73$, t-test). Števila nad stolpci predstavljajo število reverzibilnih dogodkov, števila na dnu stolpcev pa število analiziranih celic.

Figure 14: BotD, BotE and dnSNARE Affect Fusion of Smaller and Larger Vesicles. **A)** Relationship between the frequency of reversible exocytotic events (transient fusion) in controls and irreversible exocytotic events (full fusion) post ATP for non-treated controls ($n = 31$), BotE-treated ($n = 19$) and BotD-treated ($n = 25$) astrocytes exhibited a linear relationship for exocytotic events at < 0.5 fF with the equation $y = (0.21 \pm 0.05) \times x$; $R^2 = 0.95$ and at > 0.5 fF with the equation $y = (0.21 \pm 0.002) \times x$; $R^2 = 1.0$; whereas frequency of reversible events was unchanged with dnSNARE treatment ($n = 17$). Values in both dimensions show the average \pm SEM. Numbers adjacent to the symbols represent the number of patches studied. **B)** The percentage of projected reversible events decreased significantly for astrocytes treated with BotD ($P = 0.049$, u-test), BotE ($P = 0.035$, u-test) but it was unchanged in dnSNARE-treated astrocytes ($P = 0.45$, u-test). The numbers above the error bars indicate the number of events recorded; the numbers at the bottom of the bars indicate the number of cells analysed. **C)** In comparison with control non-treated astrocytes (neTret, $P < 0.001$, u-test), the average fusion-pore conductance (G_p) exhibited a similar decrease post ATP for astrocytes treated with BotD ($P = 0.021$, u-test) and BotE ($P = 0.027$, u-test). However, in dnSNARE-treated astrocytes, G_p was significantly decreased in comparison with non-treated astrocytes ($P < 0.001$, u-test), which was not further reduced post ATP ($P = 0.73$, t-test). The numbers above the error bars represent the number of events recorded; the numbers at the bottom of the bars indicate the number of cells analysed.

4.7 SOČASNA STIMULACIJA Z ATP IN ADRENALINOM VPLIVA NA LASTNOSTI POSAMEZNIH FUZIJSKIH DOGODKOV

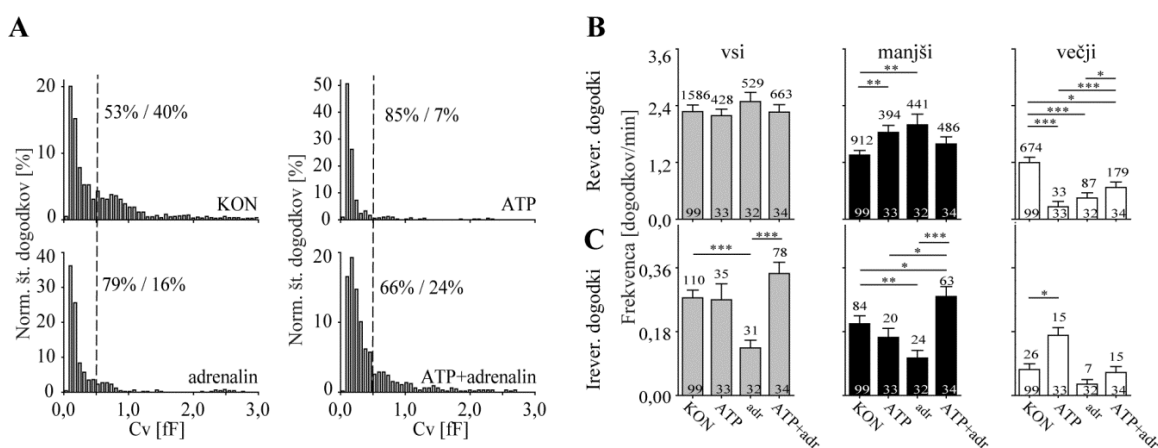
V do sedaj opisanih poskusih smo kot stimulus za dvig $[Ca^{2+}]_i$ uporabljali ATP, ki deluje prek z G-proteini sklopljenih receptorjev (ang. G-protein coupled receptors; GPCR) (Foskett in sod., 2007), ali P2X₇ (Surprenant in sod., 1996). Adrenalin deluje preko β -adrenergičnih GPCR receptorjev tako, da dvigne znotrajcelično koncentracijo cAMP (Woods in sod., 1989), ki kot sekundarni prenašalec aktivira protein kinazo A (PKA). PKA vpliva na številne tarče; med drugim lahko povzroči dvig $[Ca^{2+}]_i$ iz znotrajceličnih rezerv (Taskén in Aandahl, 2004). cAMP verjetno vpliva na fuzijsko poro tudi neposredno (Calejo in sod., 2013).

Da bi preverili, kako na lastnosti uravnavane eksocitoze manjših in večjih mešičkov vpliva tip stimulusa, smo izvedli meritve C_m astrocitev v spontanah razmerah, nato pa smo jih stimulirali z ATP (1 mM), adrenalinom (1 μ M) ali kombinacijo obeh. V teh meritvah astrociti niso izražali EGFP, zato smo meritve v spontanah razmerah in meritve po stimulaciji z ATP uporabili kot negativno kontrolo za meritve C_m astrocitev, ki so izražali EGFP. Razporeditvi manjših in večjih mešičkov (sl. 15A) ter frekvenci reverzibilnih in ireverzibilnih (sl. 15B) fuzijskih dogodkov v astrocitih, ki niso izražali EGFP pred in po stimulacijo z ATP, se ne razlikujejo od meritev na astrocitih, ki so izražali EGFP (sl. 9). Zaključimo lahko, da izražanje proteina EGFP ni vplivalo na verjetnost in velikost mešičkov, ki se zlivajo s plazmalemo.

Stimulacija z adrenalinom je povečala delež reverzibilnih dogodkov fuzije manjših mešičkov (sl. 15A) ter njihovo frekvenco (sl. 15B, $P = 0,007$, u-test). Delež reverzibilnih dogodkov fuzije večjih mešičkov se je po stimulaciji z adrenalinom zmanjšal na 16 %,

prav tako je padla njihova frekvenca (sl. 15B, $P < 0,001$, u-test). Frekvenca ireverzibilnih dogodkov je bila po stimulaciji z adrenalinom dvakrat manjša od frekvence v spontanah razmerah (sl. 15C, $P < 0,001$, u-test), predvsem zaradi dvakrat manjše frekvence ireverzibilnih dogodkov manjših mešičkov (sl. 15C, $P = 0,005$, u-test).

Zanimivo je, da je kombinacija stimulacije z ATP in adrenalinom izničila učinke posameznih stimulusov (sl. 15A). Frekvenca reverzibilnih dogodkov fuzije manjših mešičkov po kombinirani stimulaciji ni bila različna ($P = 0,12$, u-test), prav tako je bila nespremenjena frekvenca ireverzibilnih dogodkov fuzije večjih mešičkov ($P = 0,99$, u-test). V primeru frekvence ireverzibilnih fuzij manjših mešičkov je bil učinek celo nasproten, saj se je ta po kombinirani stimulaciji celo povečal (sl. 15C). Kljub značilno zmanjšani frekvenci reverzibilnih dogodkov večjih mešičkov po kombinirani stimulaciji ($P = 0,02$, u-test) do povečanja frekvence za ireverzibilne dogodke večjih mešičkov in njihovega prehoda v popolno fuzijo ni prišlo ($P = 0,99$, u-test). Ti rezultati kažejo, da kombinacija ATP-ja in adrenalina izniči efekte posameznih stimulusov in da vir dviga kalcija pomembno vpliva na uravnano eksocitozo manjših in večjih mešičkov.



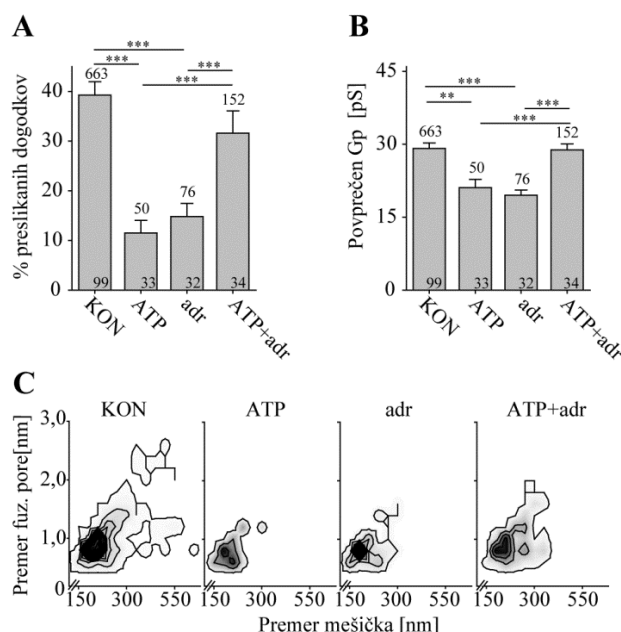
Slika 15: Vpliv kombinirane stimulacije z ATP in adrenalinom na lastnosti fuzije. **A)** Razporeditve amplitud C_v reverzibilnih dogodkov fuzije v spontanah razmerah (KON, $n = 1586$), po stimulaciji z ATP (ATP, $n = 428$), po stimulaciji z adrenalinom (adr., $n = 529$) in po kombinirani stimulaciji z ATP in adrenalinom (ATP+adr., $n = 663$). V vseh razporeditvah smo razdelili dogodke po velikosti na manjše in večje dogodke (mešičke; meja $0,5$ fF, črtkana črta). Populaciji sta bili v spontanah razmerah enakovredno zastopani (53 % proti. 40 %), po stimulaciji z ATP ali z adrenalinom smo opazili več manjših mešičkov (85 % oziroma 79 %) in manj večjih mešičkov (7 % oziroma 16 %). Kombinirana stimulacija je povzročila manjšo spremembo v primerjavi z ločenima stimulacijama (66 % manjših mešičkov in 24 % večjih mešičkov). Deleže smo izračunali glede na število vseh dogodkov fuzije, reverzibilnih in ireverzibilnih skupaj. **B)** Frekvenca vseh reverzibilnih dogodkov (sivi stolpci) se po vseh stimulacijah ni spremenila (ATP: $P = 0,92$, adrenalin: $P = 0,29$, ATP+adr.: $P = 0,65$, u-test). Frekvenca reverzibilnih dogodkov fuzije manjših mešičkov (črni stolpci) je značilno narasla po stimulaciji z ATP ($P = 0,003$, u-test) in po stimulaciji z adrenalinom ($P = 0,007$, u-test), ne pa po kombinirani stimulaciji ($P = 0,12$, u-test). Frekvenca reverzibilnih dogodkov fuzije večjih mešičkov se je po vseh stimulacijah zmanjšala (ATP: $P < 0,001$, adrenalin: $P < 0,001$ in ATP+adr.: $P = 0,02$, u-test). **C)** Frekvenca vseh ireverzibilnih dogodkov fuzije (sivi stolpci) je po stimulaciji z ATP in po kombinirani stimulaciji ostala nespremenjena (ATP: $P = 0,32$ in ATP+adr.: $P = 0,09$,

u-test), po stimulaciji z adrenalinom pa se je znižala ($P < 0,001$, u-test). Vzrok za nižje frekvence vseh ireverzibilnih dogodkov fuzije je bila nižja frekvenca ireverzibilnih dogodkov fuzije manjših mešičkov ($P = 0,005$, u-test). Stimulacija z ATP ni vplivala na frekvence ireverzibilnih dogodkov manjših mešičkov ($P = 0,16$, u-test), je pa kombinirana stimulacija značilno povišala to frekvenco ($P = 0,04$ proti KON, $P = 0,04$ proti ATP, $P < 0,001$ proti adrenalinu, u-test). Frekvenca ireverzibilnih dogodkov fuzije večjih mešičkov je bila značilno višja po stimulaciji z ATP ($P = 0,03$, u-test), vendar ne po stimulaciji z adrenalinom ($P = 0,09$, u-test) ali po kombinirani stimulaciji ($P = 0,99$, u-test). Števila nad stolpci predstavljajo število reverzibilnih dogodkov, števila na dnu stolpcev pa število analiziranih celic.

Figure 15: Effect of Adrenaline and ATP Stimulation on Fusion-Pore properties. **A)** The amplitude (C_v) distributions of reversible exocytotic events in controls (KON, $n = 1586$) and following stimulation with ATP (ATP, $n = 428$), adrenaline (adr, $n = 529$) or a combination of both (ATP+adr, $n = 663$). Note the different occurrence of events with amplitudes < 0.5 fF (small vesicles) and > 0.5 fF (large vesicles), marked by the vertical line. Both populations are equally present in controls (53 % vs. 40 %), whereas stimulation with ATP or adrenaline increases the occurrence of smaller vesicles (to 85 % or 79 %, respectively) and decreases the percentage of larger vesicles (to 7 % or 16 %, respectively). When ATP and adrenaline are added simultaneously, the response of both populations is milder (increase of smaller vesicles to 66 % and decrease of larger vesicles to 24 %). The percentages were calculated by taking all reversible and irreversible events recorded into account. **B)** The frequency of all reversible exocytotic events (grey bars) was unchanged following stimulations ($P = 0.92$ for ATP, $P = 0.29$ for adrenaline and $P = 0.65$ for ATP+adrenaline, u-test). The frequency of smaller vesicles (black bars) significantly increased following stimulation with ATP ($P = 0.003$, u-test) or adrenaline ($P = 0.007$, u-test), but not following the combination of ATP and adrenaline ($P = 0.12$, u-test). The frequency of reversible events with amplitudes > 0.5 fF significantly decreased following stimulation with ATP or adrenaline ($P < 0.001$, u-test) and a combination of both ($P = 0.02$). However, ATP and adrenaline applied together increased the frequency of large reversible events compared to ATP ($P < 0.001$, u-test) or adrenaline ($P = 0.03$, u-test) only. **C)** The frequency of all irreversible exocytotic events (grey bars) was unchanged following stimulation with ATP ($P = 0.32$, u-test) or ATP and adrenaline together ($P = 0.09$, u-test). Interestingly, adrenaline alone significantly decreased the frequency of irreversible events ($P < 0.001$, u-test), due to a decrease in the frequency of smaller vesicles (black bars, $P = 0.005$, u-test). The frequency of irreversible events of smaller vesicles (black bars) was unchanged after stimulation with ATP ($P = 0.16$, u-test), but significantly increased when ATP and adrenaline were applied together ($P = 0.04$ compared to controls, $P = 0.01$ compared to ATP and $P < 0.001$ compared to adrenaline, u-test). The frequency of irreversible events of larger vesicles (white bars) was significantly increased after stimulation with ATP ($P = 0.03$, u-test) but not after adrenaline ($P = 0.09$, u-test) or after the combination of ATP and adrenaline ($P = 0.99$, u-test). The numbers adjacent to columns represent the number of recorded events.

Ker so stimulacije različno vplivale na verjetnost fuzije manjših in večjih mešičkov, nas je nadalje zanimalo, če vplivajo različno tudi na lastnosti fuzijske pore. Tudi tu smo opazili, da je kombinacija ATP in adrenalina izničila delovanje posameznih stimulusov (sl. 16). Delež preslikanih dogodkov (sl. 16A) se je v primerjavi s spontanimi pogoji značilno zmanjšal po stimulaciji z ATP ali z adrenalinom ($P < 0,001$, u-test), vendar ne ob kombinirani stimulaciji ($P = 0,18$, u-test). Enak trend smo opazili pri prevodnosti fuzijske pore (sl. 16B). Ta se je zmanjšala po stimulaciji z ATP ($P = 0,006$, u-test) ali z adrenalinom ($P < 0,001$, u-test), vendar ne po kombinirani stimulaciji ($P = 0,67$, u-test). Na sl. 16C so prikazane odvisnosti premera fuzijske pore (izračunan iz G_p) od premera mešička (izračunan iz C_v) za spontane razmere, po stimulaciji z ATP, z adrenalinom ali po kombinirani stimulaciji. Po stimulaciji z ATP in po stimulaciji z adrenalinom je bil premer večine mešičkov ~ 200 nm in premer večine fuzijskih por $\sim 0,5$ nm. Po kombinirani

stimulaciji smo opazili večje mešičke s širšimi fuzijskimi porami, podobno kot v spontanih razmerah.



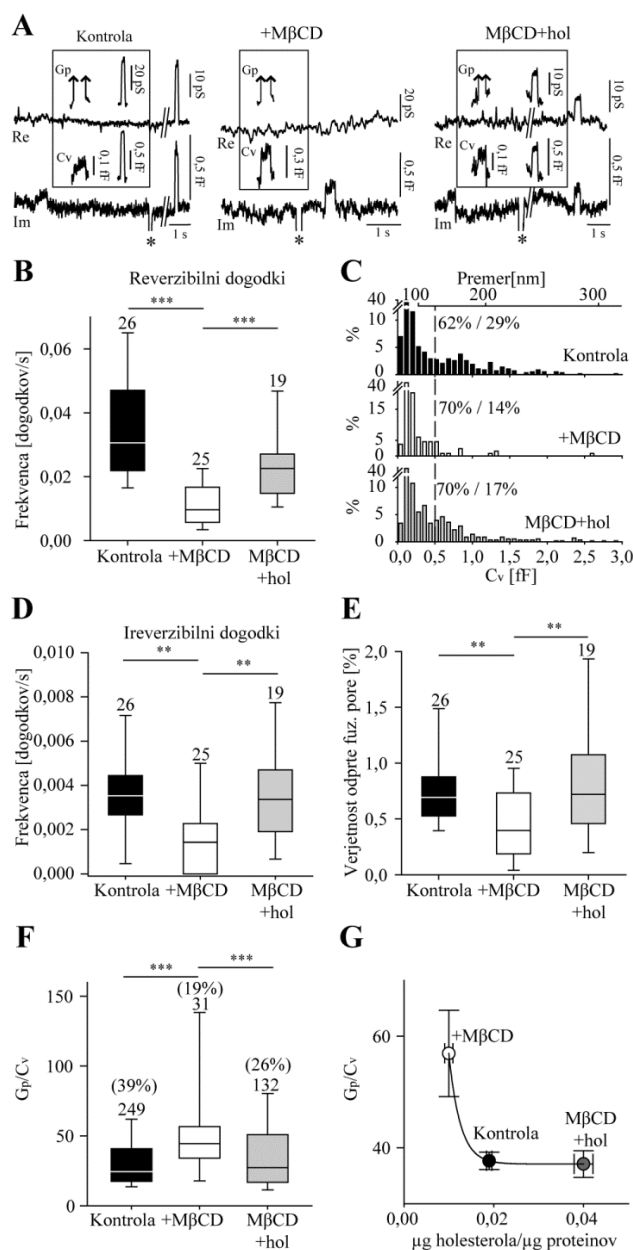
Slika 16: Ločeni stimulaciji z ATP in adrenalinom vplivata na lastnosti fuzijske pore. **A)** Delež reverzibilnih dogodkov z ozko fuzijsko poro (preslikavo na signal Re) je bil, v primerjavi s spontanimi razmerami (KON), značilno manjši po stimulaciji z ATP (ATP, $P < 0,001$, u-test) in po stimulaciji z adrenalinom (adr; $P < 0,001$, u-test), vendar ne po kombinirani stimulaciji ($P = 0,18$, u-test). **B)** Povprečna prevodnost fuzijske pore (G_p) preslikanih reverzibilnih dogodkov je bila, v primerjavi s spontanimi razmerami, značilno manjša po stimulaciji z ATP ($P = 0,006$, u-test) in po stimulaciji z adrenalinom ($P < 0,001$, u-test). Po kombinirani stimulaciji je bila povprečna G_p , v primerjavi s spontanimi razmerami, nespremenjena, v primerjavi s posameznim stimulusom pa je bila značilno višja ($P < 0,001$, u-test). **C)** 2D histogrami, ki prikazujejo odvisnost premera fuzijske pore od premera mešička v spontanih razmerah (območje sivin 1-121), po stimulaciji z ATP (območje sivin 1-8), z adrenalinom (adr; območje sivin 1-22) in s kombinirano stimulacijo (ATP+adr; območje sivin 1-15). Višje frekvence so prikazane s temnejšim odtinkom sive. Po stimulaciji z ATP in po stimulaciji z adrenalinom je imela večina mešičkov premer ~ 200 nm in premer fuzijske pore $\sim 0,5$ nm. V spontanih razmerah in po stimulaciji z ATP+adr pa je bila razporeditev premera mešičkov širša (zastopani so bili tudi večji mešički), širši pa so bili tudi premeri fuzijske pore. Števila nad stolpci predstavljajo število reverzibilnih dogodkov, števila na dnu stolpcev pa število analiziranih celic.

Figure 16: Separate, but not Combined ATP and Adrenaline Stimulation Alter Fusion-Pore Properties of Isolated Astrocytes. **A)** The percentage of reversible exocytotic events, displaying a cross-talk between Im and Re in controls (CON) is significantly decreased after stimulation with ATP (ATP, $P < 0.001$, u-test) or adrenaline (adr, $P < 0.001$, u-test). Stimulation with ATP and adrenaline (ATP+adr) exhibits the percentage similar to controls ($P = 0.18$, u-test) which is significantly higher compared to stimulation with ATP or adrenaline only ($P < 0.001$, u-test). **B)** The average pore conductance (G_p) of reversible exocytotic events, exhibiting a cross-talk between the Im and Re part of admittance signals, was reduced following stimulation with ATP (ATP, $P = 0.006$, u-test) or adrenaline (adr, $P < 0.001$, u-test) in comparison to controls (CON). When ATP and adrenaline were added simultaneously, the average G_p was significantly increased compared to each stimulus separately (ATP+adr, $P < 0.001$, u-test). **C)** 2D histogram distribution for vesicle diameter and fusion pore diameter in controls and after stimulation with ATP, adrenaline (adr) or ATP and adrenaline (ATP+adr). Higher frequencies are marked with darker grey. Note peak values for ~ 200 nm vesicles with ~ 0.5 nm fusion pores in all conditions. However, only in controls and after stimulation with

ATP+adrenaline larger vesicles are present with wider fusion pores. The numbers adjacent to columns represent the number of recorded events, the numbers at the bottom represent the number of analysed patches.

4.8 HOLESTEROL VPLIVA NA URAVNAVANO EKSOCITOZO V ASTROCITIH

Proteocentrični pogled na uravnavanje eksocitoze se vedno bolj umika, saj prihaja v ospredje proteo-lipidni pogled, ki obravnava strukturo in vrsto lipidov kot pomemben regulator v uravnavani eksocitozi (Rituper in sod., 2010). Vpliv holesterola kot najbolj zastopanega lipida v plazmalemi (Rituper in sod., 2012) smo preučili z elektrofiziološkimi meritvami C_m astrocitov, ki smo jim najprej odvzeli holesterol (10 mM M β CD), nato pa jih ponovno nasičili s holesterolom (nasičen raztopina holesterola v 10 mM M β CD). Ker so bile meritve v teh treh pogojih medsebojno odvisne, smo statistične značilnosti ocenili s testom ANOVA, ki ne predvideva normalno razporejenih podatkov (in ji sledi Dunnov test). Reprezentativni posnetki v primarni celični kulturi astrocitov so prikazani na sl. 17A. Po odvzemu holesterola z M β CD sta se zmanjšali frekvenci tako reverzibilnih (sl. 17B; $P < 0,001$) kot ireverzibilnih dogodkov (sl. 17D; $P < 0,001$). Po ponovnem nasičenju astrocitov s holesterolom pa sta se frekvenci povišali na približno začetne vrednosti ($P < 0,001$, v primerjavi z M β CD). Odvzem holesterola je imel bolj izrazit vpliv na večje mešičke. Delež teh se je po tretiranju z M β CD zmanjšal iz 29 % na 14 % (sl. 17C) in se po replaciji holesterola ni povečal na prvotno vrednost (17 %). Zaradi manjše frekvence reverzibilnih dogodkov je odvzem holesterola zmanjšal tudi verjetnost odprte fuzijske pore (sl. 17E, $P = 0,003$), ki pa se je povečala po replaciji holesterola. Odvzem holesterola je zmanjšal delež preslikanih dogodkov (sl. 17F) iz 39 % na 19 %, po replaciji pa je delež preslikanih dogodkov narasel na 26 %. Odvzem holesterola je povečal razmerje med G_p in C_v (sl. 17F, $P < 0,001$). Razmerje med G_p in C_v smo opisali z eksponentno padajočo krivuljo v odvisnosti od koncentracije holesterola. Meritve koncentracije holesterola smo opravili z reagenti Amplex red, umeritvene krivulje, ki smo jih izvedli na koncentracijo proteinov v astrocitih, pa z reagenti BCA (sl. 17G).



Slika 17: Holesterol vpliva na razmerje med širino fuzijske pore in premerom mešička. A)

Reprezentivni del signalov Re in Im z reverzibilnimi diskretnimi skoki v Im v spontanah razmerah, po odvzemanu holesterola (+MβCD) in po ponovnem nasičenju celic s holesterolom (MβCD+hol). Prikazani so dogodki s preslikavo na signal Re, katerim smo določili prevodnost fuzijske pore G_p (dogodki, katerim G_p nismo mogli določiti, so označeni s puščicami). Kapacitivnost mešička je označena s C_v . Zvezdice označujejo kalibracijske pulze. **B)** Frekvenca reverzibilnih dogodkov fuzije se je po odvzemu holesterola (beli stolpec) v primerjavi s spontanimi razmerami (črni stolpec) značilno zmanjšala. Ponovno nasičenje s holesterolom (sivi stolpec) je značilno povečalo frekvenco reverzibilnih dogodkov v primerjavi z odvzemanom holesterola ($P < 0,001$, ANOVA). **C)** Razporeditev amplitud C_v v spontanah razmerah (črni stolpci) je bila različna od razporeditve po odvzemu holesterola (beli stolpci) in od razporeditve po ponovnem nasičenju astrocitov s holesterolom (sivi stolpci; $P < 0,001$, Kolmogorov-Smirnov test; MβCD proti nasičenemu holesterolu: $P = 0,375$). Delež reverzibilnih dogodkov večjih mešičkov se je po odvzemu holesterola zmanjšal iz 29 % na 14 %. Po ponovnem nasičenju astrocitov s holesterolom se je delež reverzibilnih dogodkov večjih mešičkov povzpela na 17 %. Deleže smo določili iz reverzibilnih in ireverzibilnih dogodkov

skupaj. **D**) Frekvence ireverzibilnih dogodkov (beli stolpec) so se v primerjavi s spontanimi razmerami (črni stolpec) po odvzemu holesterola zmanjšale. Po ponovnem nasičenju s holesterola (sivi stolpec) pa so se vrstile na vrednosti, ki so primerljive s spontanimi vrednostmi. ($P = 0,005$, ANOVA). **E**) Verjetnost odprte fuzijske pore je bila po odvzemu holesterola (beli stolpec) manjša v primerjavi s kontrolo (črni stolpec) in se je po ponovnem nasičenju s holesterolom vrnila na spontane vrednosti (sivi stolpec, $P = 0,003$, ANOVA). **F**) Odvzem holesterola (beli stolpec) je povečal razmerje G_p/C_v v primerjavi s spontanimi razmerami (črni stolpec), medtem ko se je razmerje G_p/C_v po ponovnem nasičenju astrocitov s holesterolom ponovno zmanjšalo ($P < 0,001$, ANOVA). **G**) Razmerje G_p/C_v kot funkcija koncentracije holesterola, normalizirane na koncentracijo proteinov, smo opisali z eksponentno padajočo krivuljo: $(60 \pm 15) \times e^{-(14 \pm 12) \times x}$; $R^2 = 0,61$.

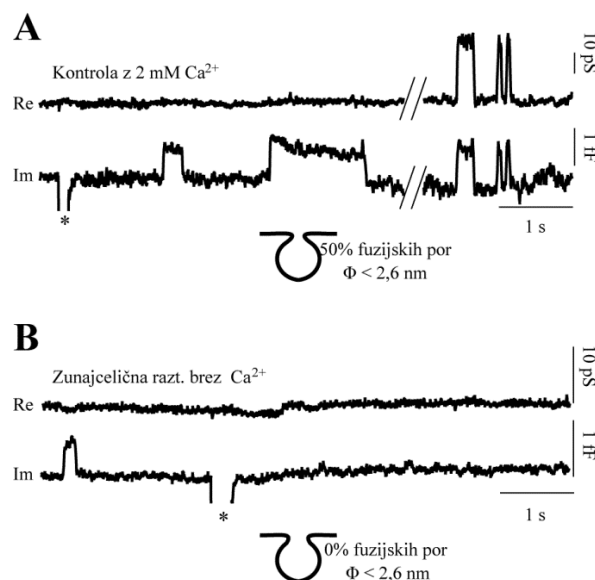
Odvzem holesterola je pomaknil razmerje G_p/C_v k višjim vrednostim.

Figure 17: Cholesterol Depletion Results in Wider Fusion-Pores. **A**) Representative Re and Im traces showing reversible discrete steps on Im trace for controls, cholesterol-depleted and cholesterol-repleted conditions in cultured astrocytes. Note events with projections on Re trace, for which fusion pore conductance G_p can be calculated (indeterminable G_p values are marked with arrows). C_v denotes recalculated vesicle capacitance. Asterisks denote calibration pulses. **B**) Frequency of reversible exocytic events was significantly decreased after astrocytes were treated with 10 mM M β CD (white bar) compared to controls (black bar). Cholesterol reload (grey bar) significantly increased the frequency of reversible exocytic events (compared to D). Statistics: ANOVA on ranks ($P < 0.001$) with Dunn's multiple comparison test. **C**) The vesicle capacitance (C_v) amplitude distributions of reversible exocytic events in controls ($n = 576$, black bars) and in cholesterol depleted ($n = 130$, white bars) or repleted ($n = 461$, grey bars) conditions were significantly different ($P < 0.001$; Kolmogorov-Smirnov-test; depleted vs. repleted: $P = 0.375$). Note the decrease for > 0.5 fF events (29 % to 14 %) after depletion. The percentages were calculated by taking into account all reversible and irreversible events recorded **D**) The frequencies of irreversible exocytic events decreased after cholesterol depletion (white bar) compared to controls (black bar) but were rescued in repleted cells (grey bar). Statistics: ANOVA on ranks ($P = 0.005$) with Dunn's multiple comparison test. **E**) The probability of fusion-pore open state decreased after cholesterol depletion (white bar) in comparison with controls (black bar), but was rescued after repletion (grey bar). Statistics: ANOVA on ranks ($P = 0.003$) with Dunn's multiple comparison test. **F**) Cholesterol depleted astrocytes exhibited increased G_p/C_v ratio (white bar) compared to controls (black bar), whereas repletion rescued the ratio (grey bar). Statistics: ANOVA on ranks ($P < 0.001$) with Dunn's multiple comparison test. Numbers above the error bars represent the number of recorded events. **G**) G_p/C_v ratio as a function of total cholesterol content, normalized to proteins exhibited exponential decay function $(60 \pm 15) \times e^{-(14 \pm 12) \times x}$; $R^2 = 0.61$. Cholesterol depletion shifted the G_p/C_v ratio to higher values.

4.9 VPLIV ELEKTROSTATSKIH INTERAKCIJ NA URAVNAVANO EKSOCITOZA V ASTROCITIH

V naslednjem koraku smo preverili vpliv elektrostatskih interakcij na uravnavanje fuzijske pore v astrocitih. Pokazano je bilo, da tok kationov skozi neselektivne kationske kanalčke, ki se aktivirajo ob hiperpolarizaciji (HCN, ang. Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated) in so blizu fuzijskih por, v hipofiznih laktotrofičnih vpliva na premer fuzijske pore (Calejo in sod., 2014). Preverili smo, če elektrostatske interakcije vplivajo na lastnosti fuzijske pore neposredno in ne prek povišanja $[Ca^{2+}]_i$. Zato smo zasnovali poskus, kjer smo namesto povečanja kationov znotrajcelično odstranili dvovalentne katione zunajcelično. Poskusi brez Ca^{2+} v zunajcelični raztopini so poleg značilnega zmanjšanja frekvence, predstavljenega na sl. 10B, pokazali, da so fuzijske pore pri reverzibilnih dogodkih fuzije relativno široke (sl. 18B) v primerjavi s kontrolnimi poskusi z 2 mM Ca^{2+}

v zunajcelični raztopini (sl. 18A). Delež preslikanih dogodkov v kontrolnih meritvah z 2 mM Ca^{2+} je bil $43 \pm 2\%$ ($n = 31$ celic), medtem ko so bili v pogojih brez Ca^{2+} vsi dogodki brez preslikav ($n = 12$ celic).

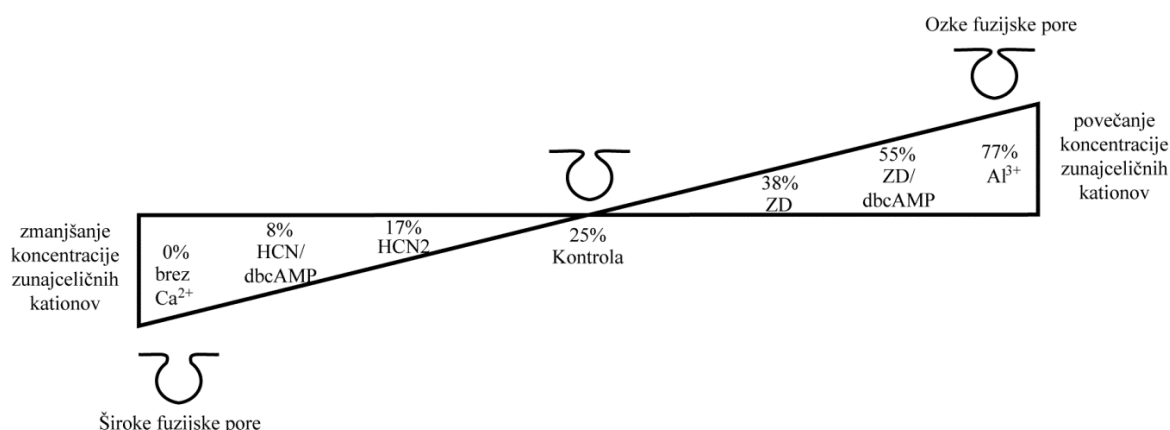


Slika 18: Fuzijske pore v astrocitih, izmerjene v zunajcelični raztopini brez Ca^{2+} . **A)** Reprezentativni diskretni skoki v membranski kapacitivnosti z dogodki prehodne fuzije v kontrolnih razmerah z 2 mM Ca^{2+} v zunajcelični raztopini. Zgornji del prikazuje izsek signala Re, spodnji pa pripadajoči izsek signala Im. Na signalu Im so vidni reverzibilni dogodki brez preslikav na signal Re (leva dva dogodka) in reverzibilni dogodki s preslikavo na signal Re (trije desni dogodki). **B)** Reprezentativni diskretni skok v pogojih, kjer je bila zunajcelična raztopina brez Ca^{2+} . V teh pogojih so bili vsi dogodki brez preslikave na signal Re.

Zvezdice označujejo kalibracijske pulze.

Figure 18: Calcium Removal from ECS Results in Wide Fusion-Pores in Astrocytes. **A)** Representative discrete steps in membrane capacitance (C_m) denote transient fusion exocytotic events. The top trace shows the real (Re) part and the bottom one the imaginary (Im) part of the admittance signal in controls bathed in extracellular solution (ECS) containing 2mM Ca^{2+} . The Im trace exhibits two types of reversible exocytotic events: those without projections (left) and those with projections to the Re trace (right). **B)** Representative discrete steps in C_m from astrocytes bathed in Ca^{2+} -free ECS. Asterisks denote truncated calibration pulses.

Združene rezultate, pridobljene na laktotrofih v različnih eksperimentalnih pogojih, kjer smo povečali koncentracijo znotrajceličnih kationov (povečano izražanje HCN2 in stimulirani z dbcAMP), jo zmanjšali s farmakološko inhibicijo kanalov HCN2 z ZD7288 ter stimulirali z dbcAMP (Calejo in sod., 2014) in povečali zunajcelično koncentracijo ionov z dodatkom trivalentnih kationov (Calejo in sod., 2012), z rezultati, pridobljenimi na astrocitih brez zunajceličnega Ca^{2+} , smo uporabili za model, predstavljen na sl. 19. Model prikazuje odvisnost deleža preslikanih dogodkov od lokalne spremembe zunajcelične in znotrajcelične koncentracije kationov. Zmanjšana koncentracija dvovalentnih kationov zunajcelično se odraža v širših premerih fuzijskih por (padajoč delež preslikanih dogodkov), medtem ko povečanje zunajcelične koncentracije dvo ali trovalentnih kationov vodi v fuzijsko poro z ožjim premerom (višji delež preslikanih dogodkov).



Slika 19: Povzetek vpliva odsotnosti zunajceličnih kationov na premer fuzijske pore. Iz podatkov, združenih iz prej objavljenih poskusov na laktotrofi (Calejo in sod., 2012; Calejo in sod., 2014) in novih poskusov, lahko zaključimo, da je prevodnost fuzijske pore (parameter povezan z morfologijo pore) uravnavana tudi s prisotnostjo kationov v bližini fuzijske pore. Zmanjšanje zunajcelične koncentracije dvovalentih kationov (ali povečanje znotrajcelične koncentracije) stabilizira fuzijsko poro v bolj prevodnem stanju s širšim premerom. (Kontrola; HCN2, celice s povečanim izražanjem HCN kanalčkov; HCN/dbcAMP celice s povečanim izražanjem HCN kanalčkov stimulirane z dbcAMP; brez Ca^{2+} ; astrociti brez Ca^{2+} v zunajcelični raztopini; ZD, celice tretirane z ZD7288; ZD/dbcAMP, celice tretirane z ZD7288 in dbcAMP).

Procenti označujejo deleže preslikanih dogodkov.

Figure 19: The Model Summarizing Effects of Local Cations on Fusion-Pore Diameter. From the previously published data (Calejo in sod., 2012; Calejo in sod., 2014) and from the newly acquired data, we conclude that fusion pore conductance (a parameter related to the pore morphology) is modulated by cations adjacent to the fusion pore. A reduction of extracellular cation concentration (or an increase of intracellular cation concentration) stabilizes fusion pore in more conductive, wider configuration. (Control; HCN2, HCN2 transfected cells; HCN/dbcAMP, HCN2 transfected dbcAMP treated cells; no Ca^{2+} , ECS without Ca^{2+} ; ZD, ZD7288 treated cells; ZD/dbcAMP, ZD7288 and dbcAMP treated cells). Numbers indicate the fraction of exocytotic events (in %) with narrow fusion pores compared to all observed events.

5 RAZPRAVA

Namen našega dela je bilo določiti elementarne lastnosti fuzije mešičkov s plazmalemo v procesu uravnavane eksocitoze v astrocitih. Uravnavana eksocitoza, ki sestoji iz več stopenj in z izločanjem sekrecijskih molekul iz mešičkov omogoča natančno in hitro komunikacijo med celicami (Jahn in Fasshauer, 2012), še vedno ni popolnoma pojasnjena. Glavno omejitev pri preučevanju eksocitoze predstavljajo omejitve v časovni in prostorski ločljivosti merilnih tehnik. Preučevanje eksocitoze namreč vključuje sledenje nanometerskim strukturam (začetni premer fuzijske pore je manj kot nanometer, premer manjših mešičkov s signalnimi molekulami pa nekaj deset nanometrov) v časovnem okviru milisekund. Dodatno težavo predstavlja kompleksnost posameznih stopenj eksocitoze. Za fuzijo mešičkov s plazmalemo so na primer potrebni številni proteini SNARE (Jahn in Scheller, 2006), lipidi (Rituper in sod., 2013b) in ostali proteini. Meritve membranske kapacitivnosti omogočajo neposredno spremljanje fuzije mešičkov s plazmalemo v realnem času z milisekundno in nanometersko ločljivostjo (Neher in Marty, 1982; Rituper in sod., 2013a) in so bile v tem raziskovalnem delu v konfiguraciji pritrjene celice prvič uporabljene na astrocitih.

V astrocitih so prisotni številni glijotransmiterji, ki se nahajajo v sekrecijskih mešičkih (Montana in sod., 2006). Njihovi objavljeni premeri se v literaturi močno razlikujejo (Guček in sod., 2012), verjetno zaradi uporabe različnih merilnih tehnik. Da bi uniformno določili premere sekrecijskih mešičkov v astrocitih, smo uporabili superločljivostni mikroskopiji STED in SIM. Skladno z raziskavama Coco in sod. (2003) ter Verderio in sod. (2012) smo pokazali (sl. 5), da se aminokislina in peptidi skladiščijo v mešičkih s premerom ~70 nm, ATP pa se nahaja v mešičkih s premerom ~200 nm. Premer mešičkov, označenih s protitelesi proti VGLUT1, ki poleg glutamata najverjetneje vsebujejo tudi D-serin (Martineau in sod., 2013), je bil v primerjavi z ostalimi tremi tipi (mešički z D-serinom, ANP ali BDNF) rahlo večji. Razlog je verjetno v tem, da so se protitelesa vezala na citosolni epitop membranskih molekul VGLUT1 (Ormel in sod., 2012), medtem ko so se protitelesa proti D-serinu, ANP-ju in BDNF-u vezala na omenjene molekule, ki so v lumnu mešičkov. Orientacija vezave primarnih in sekundarnih teles je naključna, zato lahko znatno prispeva k variabilnosti meritve premera (Singh in sod., 2014). Če izmerjenim premerom odštejemo velikosti protiteles, ki so med 14 in 19 nm (Ban in sod., 1994), dobimo vrednosti, ki so primerljive s premeri, določenimi z elektronsko mikroskopijo (Bezzi in sod., 2004; Bergersen in sod., 2011). Tudi elektronska mikroskopija je podvržena določenim merilnim negotovostim, ki so lahko posledica agresivne kemične fiksacije, prereza mešička v ne-ekvatorialni ravnini in relativno majhnega števila označenih struktur (Bezzi in sod., 2004). Barvilo Lysotracker je pobarvalo dva velikostna razreda mešičkov: prva populacija najverjetneje predstavlja

peptidergične mešičke s premeri ~70 nm, druga populacija verjetno predstavlja kisle endosome s premeri ~200 nm (Zhang in sod., 2007) oz. večje kisle predelke.

V elektrofizioloških meritvah smo opazili dogodke prehodne in popolne fuzije (sl. 8). Pogostejši (90 %) so bili dogodki prehodne fuzije (sl. 9), kar ni v skladu z literaturo (Bowser in Khakh, 2007; Malarkey in Parpura, 2011). Razloga sta verjetno dva: boljša časovna ločljivost našega merilnega sistema (5 ms proti 16 ms (Malarkey in Parpura, 2011) in 83 nm (Bowser in Khakh, 2007)), ki omogoča zaznavo zelo hitrih dogodkov prehodne fuzije, in večkratno odpiranje in zapiranje fuzijske pore istega mešička. Koliko različnih mešičkov je v kontaktu s plazmalemo znotraj posamezne krpice membrane? Analiza je pokazala, da v ~50 % krpic k dogodkom prehodne fuzije prispeva en manjši mešiček (s premerom manjšim od 120 nm) in en večji mešiček (s premerom večjim kot 120 nm). Visoka frekvenca prehodne fuzije je torej deloma posledica odpiranja in zapiranja istih fuzijskih por. Po stimulaciji z ATP so se lastnosti zlivanja mešičkov s plazmalemo spremenile: v 84 % krpic se je odpirala in zapirala fuzijska pora enega samega manjšega mešička, medtem ko sta se v več kot polovici krpic s plazmalemo popolnoma zlila dva ali več večjih mešičkov. Prehodna fuzija je prevladujoč tip fuzije v celicah nadledvične žleze (Elhamdani in sod., 2006) in v hipofiznih laktotrofih (Jorgačevski in sod., 2008). V nevronih je prevladujoč tip fuzije odvisen od tipa nevrona (He in Wu, 2007): v nevrohipofizi prevladuje prehodna fuzija (Klyachko in Jackson, 2002), v sinapsah slušnega centra pa popolna fuzija (He in sod., 2006).

Kateri glijotransmiterji so shranjeni v dveh populacijah mešičkov, določenih elektrofiziološko? Premeri mešičkov obeh populacij se ujemajo z optično določenimi premeri. Populacija manjših mešičkov najverjetneje vključuje mešičke, ki vsebujejo glutamat, D-serin, ANP in BDNF. Populacija večjih mešičkov pa najverjetneje predstavlja mešičke z ATP-jem in/ali endolizosome, kot je bilo pokazano (Coco in sod., 2003; Verderio in sod., 2012). Natančen pregled razporeditev premerov mešičkov z ANP in BDNF (sl. 5) je razkril premere mešičkov okoli 200 nm, ki bi lahko vsebovali tudi ATP. Iz optičnih poskusov lahko torej zaključimo, da sta vsebina mešička in njegov premer povezana. Iz elektrofizioloških poskusov pa, da je tip fuzije po stimulaciji odvisen od premera in torej posledično od vsebine mešičkov.

Izločanje vsebine sekretornega mešička je najhitrejše, če se fuzijska pora razširi do popolne fuzije. V stanju prehodne fuzije je izločanje vsebine med drugim odvisno od premera fuzijske pore in časa, kako dolgo je odprta. Frekvenca pojavljanja dogodkov prehodne fuzije (sl. 9A), čas odprte fuzijske pore (sl. 11A) in verjetnost odprte fuzijske pore (sl. 11D) so bili za manjše mešičke povečani po stimulaciji z ATP. Manjši mešički so po stimulaciji z ATP imeli premer fuzijske pore večji od ~2 nm (za izračun glej Materiale in metode), ki najverjetneje omogoča hitrejše izločanje aminokislin in manjših peptidov. Po stimulaciji z ATP je samo 15 % dogodkov prehodne fuzije večjih mešičkov imelo ozke

fuzijske pore (sl. 12D, premer mešičkov ~200 nm, premer fuzijskih por ~0,5 nm), ostali pa so najverjetneje prešli v popolno fuzijo (sl. 9C).

V spontanah razmerah so imeli večji mešički v stanju prehodne fuzije povprečni premer fuzijske pore 0.76 ± 0.02 nm ($n = 183$), ki je preozek za izločanje večjih molekul, saj je premer molekule ANP 1,3 nm, premer molekule BDNF 4,3 nm in premer molekule ATP 1,1 nm v najširšem delu (izračunano s programom Jmol iz datotek 1anp.pdb, 1B8M.pdb in atp.pdb, prosto dostopnih v bazi PDB). Po stimulaciji z ATP je večina večjih mešičkov prešla v popolno fuzijo (sl. 9D). Podoben prehod je bil že opisan v laktotrofih, stimuliranih s sfingozinom (Flaşker in sod., 2013) in v stimuliranih celicah sredice nadledvične žleze (Elhamdani in sod., 2006). Ker imajo relativno večji mešički stabilnejše širše fuzijske pore (Jorgačevski in sod., 2010), je prehod v popolno fuzijo verjetnejši pri večjih mešičkih.

Lastnosti fuzijske pore se torej razlikujejo za večje in manjše mešičke. Razlogov je lahko več: lahko so v fuziji mešičkov z različnimi premeri udeleženi različni proteini oziroma je lahko različna občutljivost mešičkov z različnimi premeri na tip stimulacije, podobno kot je bilo opaženo v sinapsah (Klyachko in Jackson, 2002). Naši rezultati kažejo, da funkcionalna integriteta proteinov SNARE ne določa različnih fuzijskih lastnosti za manjše in večje mešičke (sl. 14A). Manjši in večji mešički pa se razlikujejo v velikostih sproščenih paketov vsebine: pokazano je bilo, da se aminokislina in peptidi iz astrocitov sproščajo postopoma in v majhnih kvantih (Stenovc in sod., 2004). Če upoštevamo prej omenjene premere molekul, se ATP v spontanah pogojih ne more izločiti skozi ozke fuzijske pore, lahko pa se sprost celotna vsebina mešička hkrati v popolni fuziji po stimulaciji. Fiziološko to verjetno vpliva na naslednje procese: 1) širjenje Ca^{2+} valov, ki je oblika medcelične komunikacije med astrociti, odvisna večinoma od sproščanja ATP-ja (Zhang in sod., 2007); 2) modulacijo sinaptičnega prenosa, ki jo lahko povzroča sproščanje ATP-ja iz astrocitov (Pascual in sod., 2005) in homeostazo spanja, ki je odvisna od sproščanja ATP-ja (Halassa in sod., 2009).

Gojenje astrocitov v primarni celični kulturi ni vplivalo na lastnosti fuzije mešičkov, saj smo enakovredno prisotnost manjših in večjih mešičkov, vključenih v prehodno fuzijo, opazili tudi v akutno izoliranih astrocitih (sl. 10A) in astrocitih v tkivnih rezinah (sl. 10C). V poskusih, kjer smo zunajcelični raztopini odvzeli Ca^{2+} , smo opazili (skoraj) popolno inhibicijo eksocitotske aktivnosti (sl. 10B). Podobne rezultate smo dobili tudi pri poskusih z znotrajceličnim kelatorjem prostega kalcija BAPTA. Ti rezultati potrjujejo pomembno vlogo kalcija pri fuziji manjših in večjih mešičkov.

Da bi določili, kako gostota proteinov SNARE v mešičku vpliva na lastnosti fuzije manjših in večjih mešičkov s plazmalemo, smo astrocitate tretirali z BotD, ki cepi VAMP2 in VAMP3 (Davletov in sod., 2012). Na posameznem astrocitnem mešičku je do 25 molekul VAMP2 in njihova gostota je manjša pri večjih mešičkih (Singh in sod., 2014). Tretiranje z BotD je zmanjšalo frekvence elementarnih dogodkov fuzije neodvisno od premera mešička

(sl. 14A), kljub temu da je na BotD odporen VAMP7 prisoten na poznih endosomih (Verderio in sod., 2012), ki imajo premere okrog 200 nm (sl. 5B). Možno je, da so lahko molekule VAMP2 oziroma VAMP3 na istih mešičkih kot VAMP7, ali pa da mešički z VAMP7 vsebujejo peptide BDNF ali ANP (sl. 5A).

Vlogo proteina SNAP23 pri fuziji mešičkov s plazmalemo smo določili z BotE, ki cepi SNAP23 glodavcev, ne pa tudi ljudi (Vaidyanathan in sod., 1999), in inhibira fuzijo mešičkov v astrocitih (Bowser in Khakh, 2007). V celicah, tretiranih z BotE, smo opazili nižje frekvence elementarnih dogodkov fuzije manjših in večjih mešičkov, podobno kot v celicah, tretiranih z BotD. Nadalje smo opazili, da je po tretiranju celic z BotD ali BotE 30 % elementarnih dogodkov neobčutljivih na toksina. Ti dogodki so lahko posledica predhodno zlitih mešičkov na plazmalemi, ker lahka veriga toksina cepi posamezne proteine SNARE, ne pa tudi kompleksa SNARE (Popoff in Poulain, 2010). Po drugi strani pa so opaženi elementarni dogodki lahko posledica delne proteolize ali relativne kratke dobe inhibicije eksocitoze, kot je bilo poročano za BotE v nevronih podganjih malih možganov (Popoff in Poulain, 2010). V tem primeru so bili izmerjeni dogodki posledica fuzije svežih mešičkov s plazmalemo.

Dominantno negativen peptid dnSNARE inhibira sproščanje glutamata iz astrocitov (Zhang in sod., 2004) in prepreči od adenozina odvisno heterosinaptično inhibicijo (Pascual in sod., 2005). V naših poskusih je izražanje dnSNARE močno inhibiralo samo popolno fuzijo, ne pa tudi prehodne (sl. 14A). Iz razmerja med frekvencama prehodnih in popolnih fuzij lahko izračunamo, da je v netretiranih celicah vsak peti mešiček prešel iz prehodne v popolno fuzijo. V astrocitih z izraženim dnSNARE konstruktom je bila verjetnost za prehod v popolno fuzijo zmanjšana štirikrat (vsak dvajseti mešiček je prešel v popolno fuzijo). Za razliko od netretiranih celic in celic, tretiranih z botulinusnima toksinomoma, kjer se je delež preslikanih dogodkov z ozkimi fuzijskimi porami po stimulaciji z ATP zmanjšal, je ta delež v celicah, tretiranih z dnSNARE, ostal nespremenjen (~50 %) tudi po stimulaciji. Poleg tega je bila v celicah, tretiranih z dnSNARE, že v spontanah pogojih povprečna G_p 30 % nižja kot v netretiranih celicah, kar odraža ožje fuzijske pore pri istem premeru mešička. Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da je dnSNARE preprečil razširitev fuzijskih por mešičkov, ki so bili že zlit s plazmalemo, ali pa je preprečil popolno fuzijo novih mešičkov ne glede na njihov premer. Ti rezultati so v nasprotju s pričakovanim zmanjšanjem frekvence elementarnih dogodkov fuzije (Zhang in sod., 2004). Naše meritve kažejo, da se mešički zlijejo s plazmalemo in tvorijo fuzijske pore, vendar dnSNARE prepreči njihovo razširitev. Ozke fuzijske pore (0,65 nm) ne omogočajo izločanja glijotransmiterjev verjetno zato, ker se peptid dnSNARE veže na že formiran kompleks SNARE. S tem se fizično podaljša fuzijska pora, kar prepreči popolno zapiranje zadrge na C-koncu in posledično destabilizira fuzijsko poro (Fang in sod., 2008) ter njeno periodično odpiranje in zapiranje (Vardjan in sod., 2007).

Da bi raziskali, kako različne stimulacije vplivajo na lastnosti uravnane eksocitoze za manjše in večje mešičke, smo poleg stimulacije z ATP, ki deluje kot agonist na P2X₇ in P2Y receptorje (Surprenant in sod., 1996) in povzroči povišanje $[Ca^{2+}]_i$ v astrocitih prek vstopa Ca^{2+} iz zunajceličnega prostora (Ballerini in sod., 1996), uporabili kot stimulus tudi adrenalin. Adrenalin deluje na β_2 adrenergične receptorje (Aoki, 1992), prisotne v astrocitih (Vardjan in sod., 2014), in prek adenilat ciklaze poveča znotrajcelično koncentracijo cAMP (Sutherland in Rall, 1960). Razpon delovanja cAMP je zelo širok (Phillis, 1977), v astrocitih pa pokazano deluje tudi na napetostno odvisne Ca^{2+} kanalčke tipa L (Barres in sod., 1989) ali pa povzroči sprostitvev Ca^{2+} iz znotrajceličnih rezerv (Taskén in Aandahl, 2004). Stimulacija z adrenalinom je imela podobne posledice kot stimulacija z ATP, razlika je bila le v manjši frekvenci dogodkov popolne fuzije (sl. 15), ki bi lahko bile posledice drugačnega odziva kalcija. Adrenalin namreč povzroči oscilacije v Ca^{2+} , medtem ko ATP povzroči hipen dvig Ca^{2+} (Horvat in sod., v pripravi). Naši rezultati kažejo, da cAMP stabilizira široko fuzijsko poro in prepreči popolno fuzijo mešičkov (sl. 19), kar je v skladu z rezultati poskusov na laktotrofih (Calejo in sod., 2013). Zanimivo je, da kombinacija adrenalina in ATP-ja izniči delovanje posameznih stimulusov, vzrok pa zaenkrat še ni znan.

Lipid, ki ima vidno vlogo v uravnavanju eksocitoze, je holesterol, katerega koncentracija je v celičnih membranah natančno regulirana (Pfrieger in Ungerer, 2011). Rezultati kažejo, da se ob zmanjšani koncentraciji holesterola frekvence pojavnosti prehodnih in popolnih dogodkov uravnane eksocitoze značilno zmanjšajo, kar je skladno s podatki za laktotrofe (Rituper in sod., 2012). Odvzemanje holesterola vpliva na uravnano eksocitozo najverjetneje na dva načina: 1) podre membranske splave in s tem prepreči sidranje proteinov SNARE (Rituper in sod., 2013b) ter 2) z odstranitvijo negativno intrinzično ukrivljenih molekul prepreči nastanek (ozke) fuzijske pore ali njeno stabilizacijo (Rituper in sod., 2012). V astrocitih (sl. 17) odvzemanje holesterola značilno zmanjša delež preslikanih dogodkov prehodne fuzije in značilno poveča razmerje G_p/C_v , kar kaže na večji delež širokih fuzijskih por. Zmanjšan delež prehodnih dogodkov večjih mešičkov nakazuje na njihovo večjo občutljivost na odvzemanje holesterola. Večji mešički so verjetno bolj občutljivi na lipidne spremembe v membrani, saj imajo zaradi manjše ukrivljenosti nižjo gostoto anizotropnih lipidov na membrani.

Sprememba lokalne koncentracije kationov ob fuzijski pori vpliva na delež ozkih fuzijskih por v laktotrofih s povečanim izražanjem HCN2 (Calejo in sod., 2014). Gradniki membran (lipidi, gliko-proteini, gliko-lipidi) so pogosto nabite molekule (McLaughlin, 1989), zaradi česar lahko nanje vplivajo lokalne elektrostatske interakcije (Yang in sod., 2010). Glavni kandidati so številčni anizotropni anionski lipidi, npr. fosfoinozidi, fosfatidna kislina in fosfatidil-serin (van Meer in sod., 2008). Interakcija anionskih lipidov s kationi (predvsem Ca^{2+}) lahko dehidrira lipidne glave in posledično spremeni lokalno membransko ukrivljenost in razporejanje lipidnih molekul v določenih delih membrane (npr. v fuzijski pori) (Yang in sod., 2010), kar lahko vodi v fazno ločitev membranskih komponent

(Coorssen in Rand, 1995). Te spremembe lahko posledično vplivajo na nevtralne anizotropne molekule (npr. holesterol) in zwitterionske lipide (npr. fosfatidiletanolamin) (van Meer in sod., 2008), ki so vključeni v fuzijo membran (Salaun in sod., 2004). Fuzijske pore v astrocitih so bile široke v razmerah, kjer je bila zunajcelična koncentracija dvovalentnih kationov nizka (meritve brez Ca^{2+}) (sl. 18), v skladu z modelom, predstavljenim na sl. 19. V teh razmerah je koncentracija kationov glede na zunajcelični prostor znotrajcelično povečana, kar verjetno poveča vezavo kationov na negativno nabite membranske komponente. S tem se spremeni lokalna ukrivljenost fuzijske pore (Yang in sod., 2010), ki favorizira široke fuzijske pore.

Uravnavana eksocitoza je bila v celicah glije opisana že v Muellerjevih celicah (Slezak in sod., 2012), Schwannovih celicah (Chen in sod., 2012) in mikrogliji (Imura in sod., 2013). V tem delu pa smo sistematično preučili velikosti glijotransmiterskih mešičkov in predstavili elementarne lastnosti fuzije posameznih mešičkov s plazmalemo astrocita. Nadalje smo preučili vlogo proteinov SNARE, različnih stimulacij, lipidov in elektrostatičnih interakcij pri fuziji mešičkov s plazmalemo. Zaključimo lahko, da sta v astrocitih prisotni dve velikostni populaciji mešičkov, ki se razlikujeta po vsebini in načinu interakcije z membrano.

6 SKLEPI

Namen naše raziskave je bil preučiti elementarne lastnosti zlivanja mešičkov s plazmalemo v izoliranih podganjih astrocitih. Specifično so nas zanimali premeri mešičkov z glijotransmiterji in vpliv nekaterih, s fuzijo povezanih proteinov, holesterola, stimulacije z ATP in adrenalinom ter elektrostatskih interakcij na tip fuzije in fuzijsko poro posameznih mešičkov. Naši sklepi so:

- s protelesi označeni mešički, ki vsebujejo aminokislino glutamat ali D-serin oziroma peptida ANP ali BDNF, imajo premere približno 70 nm. S protitelesi označeni mešički, ki vsebujejo ATP, in lizosomi ali pozni endosomi, imajo premere približno 200 nm.
- Elektrofiziološka metoda vpete napetosti krpice membrane v konfiguraciji pritrjene celice omogoča meritve elementarnih dogodkov fuzije v primarni celični kulturi astrocitov.
- Stimulacija astrocitov z ATP (1 mM) vpliva na pojavnost elementarnih dogodkov fuzije mešičkov s plazmalemo. Sprememba pojavnosti je odvisna od velikosti mešičkov.
- Večina manjših mešičkov (mediana pri 70 nm) v spontanah vstopa v prehodno fuzijo. Stimulacija z ATP poveča verjetnost za sproščanje glijotransmiterjev iz mešičkov, ker se poveča frekvenca pojavljanja, podaljša čas odprte fuzijske pore, poveča verjetnost za odprto fuzijsko poro in razširi fuzijska pora.
- Večina večjih mešičkov (mediana pri 200 nm) v spontanah vstopa v prehodno fuzijo z ozkimi fuzijskimi porami. Stimulacija z ATP spremeni tip fuzije večjih mešičkov v popolno fuzijo.
- Elementarni dogodki uravnavane eksocitoze v astrocitih so odvisni od kalcija.
- Lastnosti elementarnih dogodkov zlivanja mešičkov s plazmalemo so primerljive v akutno izoliranih astrocitih, astrocitih tkivnih rezin in v primarni celični kulturi.

- Botulinusna nevrotoksina D in E vplivata na pojavnost elementarnih dogodkov zlivanja mešičkov s plazmalemo v astrocitih tako, da zmanjšata pojavnosti dogodkov neodvisno od premera mešička.
- Izražanje peptida dnSNARE vpliva na elementarne dogodke zlivanja mešičkov s plazmalemo tako, da prepreči razširitev fuzijskih por.
- Lastnosti fuzijske pore so odvisne od tipa stimulacije: adrenalin zmanjša frekvenco dogodkov popolne fuzije, medtem ko kombinacija stimulusov adrenalina in ATP izniči delovanje posameznega stimulusa.
- Odvzem holesterola z M β CD zmanjša frekvenco spontanin in stimuliranih dogodkov zlivanja mešičkov s plazmalemo in verjetnost odprte fuzijske pore v astrocitih. Po odvzemu holesterola iz astrocitev se razmerje med širino fuzijskih por in premerom mešička premakne v smer širših fuzijskih por pri istem premeru mešičkov.
- Elektrostatske interakcije vplivajo na prehode med diskretnimi stanji fuzijske pore. Manjša zunajcelična koncentracija dvovalentnih kationov zmanjša delež ozkih fuzijskih por.

7 POVZETEK

7.1 POVZETEK

Iz astrocitov se z uravnavano eksocitozo sproščajo številni glijotransmiterji, ki lahko modulirajo sinaptični prenos. Po zlitju mešička s plazmalemo nastane fuzijska pora, ki se lahko reverzibilno odpira in zapira (prehodna fuzija), ali pa se mešiček popolnoma zlije z membrano (popolna fuzija). Glijotransmiterji se v astrocitih skladiščijo v sekretorne mešičke z različnimi premeri. Z mikroskopijo STED smo pokazali, da se aminokislinski glutamat in D-serin ter peptida ANP in BDNF nahajajo v mešičkih s premerom ~ 70 nm. Z mikroskopijo SIM smo pokazali, da se ATP skladišči v poznih endosomih oziroma lizosomih ali skupaj s peptidi, in sicer v mešičkih s premerom ~ 200 nm. Obe velikostni populaciji manjših (~ 70 nm) in večjih (~ 200 nm) mešičkov sta prisotni tudi v akutno izoliranih astrocitih in astrocitih odraslih podgan. Elementarne lastnosti mešičkov, ki se zlivajo s plazmalemo, smo določili z visoko ločljivostno tehniko spremljanja membranske kapacitivnosti C_m . C_m meritve kažejo, da posamezna velikostna razreda mešičkov vstopata v uravnavano eksocitozo različno. Manjši, 70 nm mešički se v spontanah razmerah zlivajo s plazmalemo prehodno, kjer se fuzijska pora reverzibilno odpira in zapira. Če astrocite stimuliramo z ATP, ki poveča znotrajcelično koncentracijo prostih Ca^{2+} ionov, se poveča frekvenca odpiranja fuzijskih por, podaljša se čas njihove odprtosti, razširi se fuzijska pora in poveča se verjetnost odprte fuzijske pore, kar poveča verjetnost sproščanja glijotransmiterjev. Nasprotno se večji mešički v spontanah razmerah zlivajo s plazmalemo prehodno z ozkimi fuzijskimi porami s premerom $0,76 \pm 0,2$ nm ($n = 183$), ki ovirajo sproščanje glijotransmiterjev. Po stimulaciji z ATP se frekvenca ireverzibilnih dogodkov večjih mešičkov poveča trikrat in zmanjša delež preslikanih dogodkov iz 43 ± 2 % ($n = 31$ celic) na 15 ± 4 % ($n = 31$ celic, $P < 0,001$, u-test). To kaže, da se fuzijska pora ireverzibilno razširi do stanja popolne fuzije, ki omogoči hkraten izstop celotne vsebine mešička. Odziv manjših in večjih mešičkov ni vezan na kulturo astrocitov, saj so bili rezultati poskusov na akutno izoliranih astrocitih in astrocitih v tkivnih rezinah primerljivi. Meritve C_m v zunajcelični raztopini brez Ca^{2+} so pokazale, da se frekvenca reverzibilnih dogodkov zmanjša na 7 % frekvence v kontrolah. Elementarni dogodki zlivanja mešičkov s plazmalemo v astrocitih so torej odvisni od Ca^{2+} . Značilno zmanjšanje frekvence reverzibilnih in ireverzibilnih dogodkov smo opazili tudi po tretiranju z botulinusnima nevrotoksinoma D in E, ki na manjšo in večjo populacijo mešičkov vplivata enako. Zaključimo lahko, da proteini SNARE ne vplivajo na tip fuzije. V astrocitih, ki so izražali dnSNARE, peptidni del kompleksa SNARE proteina VAMP2, so povprečne vrednosti prevodnosti fuzijskih por za 30 % manjše kot v netretiranih celicah. Tudi delež preslikanih dogodkov se ne spremeni po stimulaciji z ATP in tako ne pride do razširitve fuzijskih por. Če astrocite stimuliramo z adrenalinom, je odziv podoben kot po stimulaciji z ATP, dvakratno pa se zniža frekvenca dogodkov popolne fuzije. Kombinirana stimulacija z ATP

in adrenalinom izniči učinek posameznih stimulantov in ohrani lastnosti fuzijske pore identične tistim, ki so izmerjene v spontanah razmerah. Da bi preverili vpliv holesterola na elementarne dogodke uravnavane eksocitoze v astrocitih, smo izvedli poskuse, kjer smo z M β CD odvezali holesterol ali ga z nasičenim holesterolom v M β CD vračali nazaj v celice. Meritve C_m so pokazale, da odvzem holesterola značilno zmanjša frekvence reverzibilnih in ireverzibilnih dogodkov ter verjetnost odprte fuzijske pore, medtem ko ponovno nasičenje celic s holesterolom vzpostavi prvotno stanje. Na M β CD so bolj občutljivi večji mešički, ki se jim po odvzemanju poveča razmerje G_p/C_v in zmanjša delež preslikanih dogodkov, kar pomeni, da mešički preferenčno preidejo v stanje široke fuzijske pore. Pokazali smo, da je razmerje G_p/C_v odvisno od koncentracije holesterola v celici, in sicer sledi odvisnost eksponentno padajoči krivulji. Na elementarne dogodke fuzije mešičkov s plazmalemo v astrocitih vpliva tudi koncentracija dvovalentnih kationov v bližini fuzijske pore. Manjša zunajcelična koncentracija se odraža v širših fuzijskih porah, medtem ko višje zunajcelične koncentracije dvovalentnih kationov povečajo delež dogodkov prehodne fuzije z ozkimi fuzijskimi porami. Uravnavana eksocitoza v astrocitih vključuje dve velikostni populaciji mešičkov, ki se na stimulacije odzivata različno. Uravnavana eksocitoza je odvisna od Ca^{2+} , proteinov SNARE in holesterola, na fuzijsko poro pa dodatno vplivajo tudi elektrostatske interakcije.

7.2 SUMMARY

Astrocytes utilise regulated exocytosis for release of numerous gliotransmitters, which can modulate synaptic transmission. When a vesicle fuses with the plasma membrane, a fusion pore is formed. It can fluctuate between open and closed state (transient fusion) or a vesicle merges with the plasma membrane completely (full fusion). Gliotransmitters in astrocytes are stored in two distinct vesicle populations. By using STED microscopy we have shown that the amino acids glutamate and D-serine and the peptides ANP and BDNF are stored in vesicles with diameters of ~ 70 nm. ATP, stored in late endosomes, lysosomes or big peptidergic vesicles is inside vesicles with diameters of ~ 200 nm, as shown with SIM. Observed populations of small (~ 70 nm) and big (~ 200 nm) vesicles are present also in acutely isolated astrocytes and astrocytes from old rats. To determine unitary properties of vesicles fusing with the plasma membrane, we used the high resolution patch clamp technique for monitoring membrane capacitance C_m . The results show that small and big vesicles enter regulated exocytosis differently. Small, 70 nm vesicles are in spontaneous conditions in the stage of transient fusion, where a fusion pore opens and closes reversibly, allowing graduate release of gliotransmitters. If astrocytes are stimulated with ATP, which increases intracellular concentration of calcium ions, the frequency of reversible events is increased, and so are dwell time, the probability for open fusion pores and the fusion pores are expanded. Big vesicles in spontaneous conditions are in the stage of a narrow fusion pore with an average diameter of 0.76 ± 0.2 (n = 183), which prevents gliotransmitter discharge. After stimulation, the frequency of irreversible events is increased threefold and the ratio of projected events is decreased from 43 ± 2 % (n = 31 cells) in controls to

$15 \pm 4 \%$ ($n = 31$ cells, $P < 0.001$, u-test), which suggests a fusion pore irreversibly expands to full fusion, which enables momentary release of gliotransmitters. The observed response of small and big vesicle populations is not an artefact of primary culture, since similar responses are also observed in acutely isolated astrocytes and astrocytes in acute brain slices. Experiments where Ca^{2+} was removed from the extracellular medium show a decrease in frequency of reversible events to 7 % of control frequency, suggesting Ca^{2+} is necessary for regulated exocytosis in astrocytes. A significant decrease in frequencies of reversible and irreversible events is also present in astrocytes treated with botulinum neurotoxins D and E. Small and big vesicle populations are affected similarly, suggesting SNARE proteins do not determine the mode of fusion. In astrocytes transfected with dnSNARE, a truncated VAMP2 peptide, the average fusion pore conductance is decreased by 30 % in controls compared to non-treated cells and the ratio of projected events is set at 50 % even after stimulation with ATP, suggesting dnSNARE prevents fusion pore expansion. When astrocytes were stimulated with adrenaline, we got a similar response to ATP-stimulated astrocytes, but the frequency of irreversible events was decreased twofold. The stimulation with a combination of ATP and adrenaline nullified the effect of separate stimuli and kept fusion pore properties similar to controls. To check how cholesterol affects unitary exocytotic events in astrocytes, we depleted cholesterol with M β CD or repleted it with saturated cholesterol in M β CD. C_m experiments have shown that cholesterol depletion significantly decreases frequencies of reversible and irreversible events, whereas cholesterol repletion returns it to a normal state. Big vesicles are more sensitive to M β CD-treatment, since their G_p/C_v is increased after depletion and the ratio of projected events is decreased. This suggests stable wide fusion pores after depletion. The G_p/C_v ratio compared to the total cholesterol concentration exhibits exponential decay dependence. Lastly, unitary exocytotic events depend also on local cation concentrations in the vicinity of fusion pores. Lower extracellular cation concentrations result in wide fusion pores, whereas high cation concentrations extracellularly result in higher ratios of events with narrow fusion pores. The process of regulated exocytosis in astrocytes is accomplished by two vesicle populations, which respond differently to stimulations. Regulated exocytosis depends on Ca^{2+} , SNARE proteins and cholesterol. Additionally electrostatic interactions affect discrete states of a fusion pore.

8 VIRI

- Alvarez de Toledo G, Fernández-Chacón R, Fernández JM. 1993. Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature*, 363, 6429: 554-558
- Aoki C. 1992. Beta-adrenergic receptors: astrocytic localization in the adult visual cortex and their relation to catecholamine axon terminals as revealed by electron microscopic immunocytochemistry. *Journal of Neuroscience*, 12, 3: 781-792
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1998. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 10, 6: 2129-2142
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neuroscience*, 22, 5: 208-215
- Bajohrs M, Rickman C, Binz T, Davletov B. 2004. A molecular basis underlying differences in the toxicity of botulinum serotypes A and E. *EMBO Reports*, 5, 11: 1090-1095
- Bal-Price A, Moneer Z, Brown GC. 2002. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia*, 40, 3: 312-323
- Ballerini P, Rathbone MP, Di Iorio P, Renzetti A, Giuliani P, D'Alimonte I, Trubiani O, Caciagli F, Ciccarelli R. 1996. Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport*, 7, 15-17: 2533-2537
- Ban N, Escobar C, Garcia R, Hasel K, Day J, Greenwood A, McPherson A. 1994. Crystal structure of an idiotype-anti-idiotype Fab complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 5: 1604-1608
- Banerjee A, Kowalchuk JA, DasGupta BR, Martin TFJ. 1996. SNAP-25 is required for a late postdocking step in Ca²⁺-dependent exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 34: 20227-20230
- Barres BA, Chun LL, Corey DP. 1989. Calcium current in cortical astrocytes: induction by cAMP and neurotransmitters and permissive effect of serum factors. *Journal of Neuroscience*, 9, 9: 3169-3175
- Ben Achour S, Pascual O. 2012. Astrocyte-Neuron Communication: Functional Consequences. *Neurochemical Research*, 37, 11: 2464-2473
- Bergami M, Santi S, Formaggio E, Cagnoli C, Verderio C, Blum R, Berninger B, Matteoli M, Canossa M. 2008. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *Journal of Cell Biology*, 183, 2: 213-221

- Bergersen LH, Morland C, Ormel L, Rinholm JE, Larsson M, Wold JF, Røe AT, Stranna A, Santello M, Bouvier D, Ottersen OP, Volterra A, Gundersen V. 2012. Immunogold Detection of L-glutamate and D-serine in Small Synaptic-Like Microvesicles in Adult Hippocampal Astrocytes. *Cerebral Cortex*, 22, 7: 1690-1697
- Berginc-Dolenšek A, Ožek B, Starič F, Kapš R, Petkovič-Colarič J. 2004. Botulizem. *Zdravniški vestnik*, 73: 877-883
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nature Neuroscience*, 7, 6: 613-620
- Bowser DN, Khakh BS. 2007. Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 10: 4212-4217
- Bückers J, Wildanger D, Vicidomini G, Kastrup L, Hell SW. 2011. Simultaneous multi-lifetime multi-color STED imaging for colocalization analyses. *Optics Express*, 19, 4: 3130-3143
- Burgess TL, Kelly RB. 1987. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annual Reviews in Cell Biology*, 3, 243-293
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *Journal of Neuroscience*, 22, 1: 183-192
- Calejo AI, Jorgačevski J, Silva VS, Stenovec M, Kreft M, Gonçalves PP, Zorec R. 2012. Aluminium-induced changes of fusion pore properties attenuate prolactin secretion in rat pituitary lactotrophs. *Neuroscience*, 201, 57-66
- Calejo AI, Jorgačevski J, Kucka M, Kreft M, Gonçalves PP, Stojilkovic SS, Zorec R. 2013. cAMP-mediated stabilization of fusion pores in cultured rat pituitary lactotrophs. *Journal of Neuroscience*, 33, 18: 8068-8078
- Calejo AI, Jorgačevski J, Rituper B, Guček A, Pereira PM, Santos MA, Potokar M, Vardjan N, Kreft M, Gonçalves PP, Zorec R. 2014. Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels and cAMP-Dependent Modulation of Exocytosis in Cultured Rat Lactotrophs. *Journal of Neuroscience*, 34, 47: 15638-15647
- Chen G, Zhang Z, Wei Z, Cheng Q, Li X, Li W, Duan S, Gu X. 2012. Lysosomal exocytosis in Schwann cells contributes to axon remyelination. *Glia*, 60, 2: 295-305
- Chen X, Wang L, Zhou Y, Zheng LH, Zhou Z. 2005. "Kiss-and-run" glutamate secretion in cultured and freshly isolated rat hippocampal astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 25, 40: 9236-9243

- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C. 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 2: 1354-1362
- Coorssen JR, Rand RP. 1995. Structural effects of neutral lipids on divalent cation-induced interactions of phosphatidylserine-containing bilayers. *Biophysical Journal*, 68, 3: 1009-1018
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, 247, 4941: 470-473
- Crippa D, Schenk U, Francolini M, Rosa P, Verderio C, Zonta M, Pozzan T, Matteoli M, Carmignoto G. 2006. Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *Journal of Physiology*, 570, Pt 3: 567-582
- Davletov B, Ferrari E, Ushkaryov Y. 2012. Presynaptic neurotoxins: An expanding array of natural and modified molecules. *Cell Calcium*, 52, 3-4: 234-240
- Debus K, Lindau M. 2000. Resolution of patch capacitance recordings and of fusion pore conductances in small vesicles. *Biophysical Journal*, 78, 6: 2983-2997
- Eleopra R, Tugnoli V, Rossetto O, De Grandis D, Montecucco C. 1998. Different time courses of recovery after poisoning with botulinum neurotoxin serotypes A and E in humans. *Neuroscience Letters*, 256, 3: 135-138
- Elhamdani A, Azizi F, Artalejo CR. 2006. Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *Journal of Neuroscience*, 26, 11: 3030-3036
- Fang Q, Berberian K, Gong LW, Hafez I, Sørensen JB, Lindau M. 2008. The role of the C terminus of the SNARE protein SNAP-25 in fusion pore opening and a model for fusion pore mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 40: 15388-15392
- Flašker A, Jorgačevski J, Calejo AI, Kreft M, Zorec R. 2013. Vesicle size determines unitary exocytic properties and their sensitivity to sphingosine. *Molecular Cell Endocrinology*, 376, 1: 136-147
- Fölling J, Bossi M, Bock H, Medda R, Wurm CA, Hein B, Jakobs S, Eggeling C, Hell SW. 2008. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nature Methods*, 5, 11: 943-945
- Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiological Reviews*, 87, 2: 593-658

- Fujita T, Chen MJ, Li B, Smith NA, Peng W, Sun W, Toner MJ, Kress BT, Wang L, Benraiss A, Takano T, Wang S, Nedergaard M. 2014. Neuronal Transgene Expression in Dominant-Negative SNARE Mice. *Journal of Neuroscience*, 34, 50: 16594-16604
- Gentet LJ, Stuart GJ, Clements JD. 2000. Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophysical Journal*, 79, 1: 314-320
- Guček A, Vardjan N, Zorec R. 2012. Exocytosis in Astrocytes: Transmitter Release and Membrane Signal Regulation. *Neurochemical Research*, 37, 11: 2351-2363
- Gustafsson MG. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198, Pt 2: 82-87
- Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, Haydon PG, Frank MG. 2009. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron*, 61, 2: 213-219
- Hamilton NB, Attwell D. 2010. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature Reviews in Neuroscience*, 11, 4: 227-238
- Haydon PG. 2000. Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other. *Current Biology*, 10, 19: R712-714
- He L, Wu LG. 2007. The debate on the kiss-and-run fusion at synapses. *Trends in Neuroscience*, 30, 9: 447-455
- He L, Wu XS, Mohan R, Wu LG. 2006. Two modes of fusion pore opening revealed by cell-attached recordings at a synapse. *Nature*, 444, 7115: 102-105
- Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G. 1994. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature*, 371, 6497: 513-515
- Hell SW, Wichmann J. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19, 11: 780-782
- Hepp R, Perraut M, Chasserot-Golaz S, Galli T, Aunis D, Langley K, Grant NJ. 1999. Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23. *Glia*, 27, 2: 181-187
- Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, Shibata K, Shinozaki Y, Kasai H, Moriishi K, Moriyama Y, Koizumi S. 2013. Microglia release ATP by exocytosis. *Glia*, 61, 8: 1320-1330
- Jahn R, Scheller RH. 2006. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 7, 9: 631-643

- Jahn R, Fasshauer D. 2012. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, 490, 7419: 201-207
- Jean YY, Lercher LD, Dreyfus CF. 2008. Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. *Neuron Glia Biology*, 4, 1: 35-42
- Jorgačevski J, Fosnaric M, Vardjan N, Stenovec M, Potokar M, Kreft M, Kralj-Iglic V, Iglic A, Zorec R. 2010. Fusion pore stability of peptidergic vesicles. *Molecular Membranes Biology*, 27, 2-3: 65-80
- Jorgačevski J, Stenovec M, Kreft M, Bajić A, Rituper B, Vardjan N, Stojilkovic S, Zorec R. 2008. Hypotonicity and peptide discharge from a single vesicle. *American Journal of Physiology and Cellular Physiology*, 295, 3: C624-631
- Klyachko VA, Jackson MB. 2002. Capacitance steps and fusion pores of small and large-dense-core vesicles in nerve terminals. *Nature*, 418, 6893: 89-92
- Kreft M, Zorec R. 1997. Cell-attached measurements of attofarad capacitance steps in rat melanotrophs. *Pflugers Archiv*, 434, 2: 212-214
- Kreft M, Stenovec M, Rupnik M, Grilc S, Krzan M, Potokar M, Pangrsic T, Haydon PG, Zorec R. 2004. Properties of Ca(2+)-dependent exocytosis in cultured astrocytes. *Glia*, 46, 4: 437-445
- Krzan M, Stenovec M, Kreft M, Pangrsic T, Grilc S, Haydon PG, Zorec R. 2003. Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 23, 5: 1580-1583
- Larsson M, Sawada K, Morland C, Hiasa M, Ormel L, Moriyama Y, Gundersen V. 2011. Functional and Anatomical Identification of a Vesicular Transporter Mediating Neuronal ATP Release. *Cerebral Cortex*, 22, 5: 1203-1214
- Lindau M. 1991. Time-resolved capacitance measurements: monitoring exocytosis in single cells. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 24, 1: 75-101
- Lindau M, Neher E. 1988. Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Archiv*, 411, 2: 137-146
- Liu T, Sun L, Xiong Y, Shang S, Guo N, Teng S, Wang Y, Liu B, Wang C, Wang L, Zheng L, Zhang CX, Han W, Zhou Z. 2011. Calcium triggers exocytosis from two types of organelles in a single astrocyte. *Journal of Neuroscience*, 31, 29: 10593-10601
- Lollike K, Lindau M. 1999. Membrane capacitance techniques to monitor granule exocytosis in neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, 232, 1-2: 111-120

- Malarkey EB, Parpura V. 2011. Temporal characteristics of vesicular fusion in astrocytes: examination of synaptobrevin 2-laden vesicles at single vesicle resolution. *Journal of Physiology*, 589, 17: 4271-4300
- Martineau M, Baux G, Mothet JP. 2006. D-serine signalling in the brain: friend and foe. *Trends in Neuroscience*, 29, 8: 481-491
- Martineau M, Shi T, Puyal J, Knolhoff AM, Dulong J, Gasnier B, Klingauf J, Sweedler JV, Jahn R, Mothet JP. 2013. Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *Journal of Neuroscience*, 33, 8: 3413-3423
- McLaughlin S. 1989. The electrostatic properties of membranes. *Annual Reviews in Biophysics and Biophysical Chemistry*, 18, 113-136
- Montana V, Malarkey EB, Verderio C, Matteoli M, Parpura V. 2006. Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia*, 54, 7: 700-715
- Mukherjee S, Zha X, Tabas I, Maxfield FR. 1998. Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophysical Journal*, 75, 4: 1915-1925
- Neher E. 1992. Ion channels for communication between and within cells. *Bioscience Reports*, 12, 1: 1-14
- Neher E, Marty A. 1982. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79, 21: 6712-6716
- Neher E, Sakmann B. 1992. The patch clamp technique. *Scientific American*, 266, 3: 44-51
- Ni Y, Parpura V. 2009. Dual regulation of Ca²⁺-dependent glutamate release from astrocytes: vesicular glutamate transporters and cytosolic glutamate levels. *Glia*, 57, 12: 1296-1305
- Ormel L, Stensrud MJ, Bergersen LH, Gundersen V. 2012. VGLUT1 is localized in astrocytic processes in several brain regions. *Glia*, 60, 2: 229-238
- Pangrsic T, Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Fabbretti E, Nistri A, Pryazhnikov E, Khiroug L, Giniatullin R, Zorec R. 2007. Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 39: 28749-28758
- Pangršič T, Potokar M, Haydon PG, Zorec R, Kreft M. 2006. Astrocyte swelling leads to membrane unfolding, not membrane insertion. *Journal Neurochemistry*, 99, 2: 514-523
- Parpura V, Zorec R. 2010. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews*, 63, 1-2: 83-92

- Parpura V, Fang Y, Basarsky T, Jahn R, Haydon PG. 1995. Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Letters*, 377, 3: 489-492
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG. 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, 369, 6483: 744-747
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*, 310, 5745: 113-116
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G. 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *Journal of Neuroscience*, 17, 20: 7817-7830
- Perea G, Araque A. 2005. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 25, 9: 2192-2203
- Pfriegeer FW, Barres BA. 1997. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science*, 277, 5332: 1684-1687
- Pfriegeer FW, Ungerer N. 2011. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Progress in Lipid Research*, 50, 4: 357-371
- Phillis JW. 1977. The role of cyclic nucleotides in the CNS. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 4, 3: 151-195
- Popoff MR, Poulain B. 2010. Bacterial toxins and the nervous system: neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells. *Toxins*, 2, 4: 683-737
- Porter JT, McCarthy KD. 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Progress in Neurobiology*, 51, 4: 439-455
- Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Kreft ME, Zorec R. 2008. Stimulation inhibits the mobility of recycling peptidergic vesicles in astrocytes. *Glia*, 56, 2: 135-144
- Potokar M, Kreft M, Li L, Daniel Andersson J, Pangrsic T, Chowdhury HH, Pekny M, Zorec R. 2007. Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. *Traffic*, 8, 1: 12-20
- Potokar M, Stenovec M, Gabrijel M, Li L, Kreft M, Grilc S, Pekny M, Zorec R. 2010. Intermediate filaments attenuate stimulation-dependent mobility of endosomes/lysosomes in astrocytes. *Glia*, 58, 10: 1208-1219
- Proux-Gillardeaux V, Gavard J, Irinopoulou T, Mège RM, Galli T. 2005. Tetanus neurotoxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs epithelial cell migration and

- integrin-dependent cell adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 18: 6362-6367
- Ramamoorthy P, Whim MD. 2008. Trafficking and fusion of neuropeptide Y-containing dense-core granules in astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 28, 51: 13815-13827
- Ramirez DM, Kavalali ET. 2012. The role of non-canonical SNAREs in synaptic vesicle recycling. *Cell Logistics*, 2, 1: 20-27
- Ransom B, Behar T, Nedergaard M. 2003. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends in Neuroscience*, 26, 10: 520-522
- Rituper B, Davletov B, Zorec R. 2010. Lipid-protein interactions in exocytotic release of hormones and neurotransmitters. *Clinical Lipidology*, 5, 5: 747-761
- Rituper B, Flašker A, Guček A, Chowdhury HH, Zorec R. 2012. Cholesterol and regulated exocytosis: A requirement for unitary exocytotic events. *Cell Calcium*, 52, 3-4: 250-258
- Rituper B, Guček A, Jorgačevski J, Flašker A, Kreft M, Zorec R. 2013a. High-resolution membrane capacitance measurements for the study of exocytosis and endocytosis. *Nature Protocols*, 8, 6: 1169-1183
- Rituper B, Chowdhury HH, Jorgačevski J, Coorssen JR, Kreft M, Zorec R. 2013b. Cholesterol-mediated membrane surface area dynamics in neuroendocrine cells. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1831, 7: 1228-1238
- Rupnik M, Kreft M, Sikdar SK, Grilc S, Romih R, Zupancic G, Martin TF, Zorec R. 2000. Rapid regulated dense-core vesicle exocytosis requires the CAPS protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 10: 5627-5632
- Salaun C, James DJ, Chamberlain LH. 2004. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*, 5, 4: 255-264
- Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. 2008. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 15: 5683-5686
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. 2000. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiological Reviews*, 80, 2: 717-766
- Schiavo G, Rossetto O, Catsicas S, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Benfenati F, Montecucco C. 1993. Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 32: 23784-23787

- Schubert V, Bouvier D, Volterra A. 2011. SNARE protein expression in synaptic terminals and astrocytes in the adult hippocampus: a comparative analysis. *Glia*, 59, 10: 1472-1488
- Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 6633: 569-572
- Singh P, Jorgačevski J, Kreft M, Grubišić V, Stout RF, Potokar M, Parpura V, Zorec R. 2014. Single-vesicle architecture of synaptobrevin2 in astrocytes. *Nature Communications*, 7, 5: 3780
- Slezak M, Grosche A, Niemiec A, Tanimoto N, Pannicke T, Münch TA, Crocker B, Isope P, Härtig W, Beck SC, Huber G, Ferracci G, Perraut M, Reber M, Mieke M, Demais V, Lévêque C, Metzger D, Szklarczyk K, Przewlocki R, Seeliger MW, Sage-Ciocca D, Hirrlinger J, Reichenbach A, Reibel S, Pfrieder FW. 2012. Relevance of exocytotic glutamate release from retinal glia. *Neuron*, 74, 3: 504-516
- Sloan SA, Barres BA. 2014. Looks can be deceiving: reconsidering the evidence for gliotransmission. *Neuron*, 84, 6: 1112-1115
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119, 1: 7-35
- Spruce AE, Breckenridge LJ, Lee AK, Almers W. 1990. Properties of the fusion pore that forms during exocytosis of a mast cell secretory vesicle. *Neuron*, 4, 5: 643-654
- Stenovec M, Kreft M, Poberaj I, Betz WJ, Zorec R. 2004. Slow spontaneous secretion from single large dense-core vesicles monitored in neuroendocrine cells. *Faseb Journal*, 18, 11: 1270-1272
- Stenovec M, Kreft M, Grilc S, Potokar M, Kreft ME, Pangrsic T, Zorec R. 2007. Ca²⁺-dependent mobility of vesicles capturing anti-VGLUT1 antibodies. *Experimental Cell Research*, 313, 18: 3809-3818
- Südhof TC, Rizo J. 2011. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*, 3, 12: 1-14
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 272, 5262: 735-738
- Sutherland EW, Rall TW. 1960. Formation of adenosine-3,5-phosphate (cyclic adenylylate) and its relation to the action of several neurohormones or hormones. *Acta Endocrinologica*, 34, 50: 171-174
- Taskén K, Aandahl EM. 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase. *American Physiological Society Reviews*, 84, 1: 137-167

- Vaidyanathan VV, Yoshino K, Jahnz M, Dörries C, Bade S, Nauenburg S, Niemann H, Binz T. 1999. Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *Journal of Neurochemistry*, 72, 1: 327-337
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 9, 2: 112-124
- Vardjan N, Kreft M, Zorec R. 2014. Dynamics of β -adrenergic/cAMP signaling and morphological changes in cultured astrocytes. *Glia*, 62, 4: 566-579
- Vardjan N, Stenovec M, Jorgacevski J, Kreft M, Zorec R. 2007. Subnanometer fusion pores in spontaneous exocytosis of peptidergic vesicles. *Journal of Neuroscience*, 27, 17: 4737-4746
- Verderio C, Cagnoli C, Bergami M, Francolini M, Schenk U, Colombo A, Riganti L, Frassoni C, Zuccaro E, Danglot L, Wilhelm C, Galli T, Canossa M, Matteoli M. 2012. TI-VAMP/VAMP7 is the SNARE of secretory lysosomes contributing to ATP secretion from astrocytes. *Biology of the Cell*, 104, 4: 213-228
- Wilson DW, Wilcox CA, Flynn GC, Chen E, Kuang WJ, Henzel WJ, Block MR, Ullrich A, Rothman JE. 1989. A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature*, 339, 6223: 355-359
- Woods MD, Freshney RI, Ball SG, Vaughan PF. 1989. Regulation of cyclic AMP formation in cultures of human foetal astrocytes by beta 2-adrenergic and adenosine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 53, 3: 864-869
- Yang HY, Xu YC, Gao ZB, Mao YY, Du Y, Jiang HL. 2010. Effects of Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ on the Structures of Anionic Lipid Bilayers and Biological Implication. *Journal of Physical Chemistry Biology*, 114, 50: 16978-16988
- Zhang Q, Pangrsic T, Kreft M, Krzan M, Li N, Sul JY, Halassa M, Van Bockstaele E, Zorec R, Haydon PG. 2004. Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 13: 12724-12733
- Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S. 2007. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nature Cell Biology*, 9, 8: 945-953
- Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Verkhratsky A, Parpura V. 2012. Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro*, 4, 2: 103-119

ZAHVALA

Spoštovanemu mentorju, akad. prof. dr. Robertu Zorcu se zahvaljujem za priložnost, da mi je omogočil izdelavo doktorskega dela, za njegove nasvete in vodenje.

Somentorju dr. Jerneju Jorgačevskemu se zahvaljujem za pomoč pri izvedbi poskusov, za vse strokovne nasvete in številne komentarje na račun doktorske disertacije.

Članom komisije za oceno in zagovor doktorske disertacije, še posebej pa viš. znan. sod. dr. Matjažu Stenovcu se zahvaljujem za natančen pregled disertacije in številne komentarje, ki so izboljšali kvaliteto dela.

Več glav več ve, zato se za prijetno timsko delo in mnoge konstruktivne razgovore zahvaljujem dr. Ani I. Calejo, dr. Ajdi Flašker, dr. Priyanki Singh, dr. Saši Trkov Bobnar, dr. Claudiji Geisler in dr. Boštjanu Rituperju. Hvala tudi ostalim sodelavcem.

Iskrena hvala dragi Vanji, ki je popravila vse manjkajoče in odvečne vejice.

Velika zahvala gre moji družini in prijateljem, ki so mi stali ob strani in me spodbujali v dneh, ko je sinusna krivulja navdušenosti in motivacije dosegala minimum. Hvala Bojanu za vso spodbudo, podporo in ljubezen.