

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Ana JERENKO

KOLOKALIZACIJA PROTEINOV SINKRIP IN
SINAPTOTAGMIN 7 V MOŽGANIH PODGANE

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Ana JERENKO

KOLOKALIZACIJA PROTEINOV SINKRIP IN SINAPTOTAGMIN 7 V
MOŽGANIH PODGANE

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

COLOCALIZATION OF PROTEINS SYNCRIP AND SYNAPTOTAGMIN
7 IN RAT BRAIN

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Univerzitetnega študija II. Bolonjske stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Opravljeno je na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje oz. Senat oddelka je dne 21. 2. 2014 odobrila naslov magistrskega dela. Za mentorja magistrskega dela je bila imenovana doc. dr. Gordana Glavan, za recenzenta pa prof. dr. Marko Kreft.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kristina SEPČIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor: doc. dr. Gordana GLAVAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: prof. dr. Marko KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 3. 3. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga 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.

Ana Jerenko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 591:577(043.2)=163.6
KG	kolokalizacija / SINKRIP / sinaptotagmin 7 / možgani podgane
AV	JERENKO, Ana, diplomirana biologinja (UN)
SA	GLAVAN, Gordana (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI	2015
IN	KOLOKALIZACIJA PROTEINOV SINKRIP IN SINAPTOTAGMIN 7 V MOŽGANIH PODGANE
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XI, 71 str., 5 preg., 37 sl., 1 pril., 91 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI Namen magistrske naloge je bil raziskati kolokalizacijo (pojavljanje na istem mestu) proteinov SINKRIP in sinaptotagmin 7 v nevronih štirih različnih anatomskih področjih možganov laboratorijske podgane (*Rattus norvegicus*): v hipokampusu, striatumu, skorji velikih možganov in skorji malih možganov. Možgane podgan smo transkardialno perfundirali s fiksativom, jih narezali ter pobarvali z metodo dvojne imunofluorescence. Uporabili smo specifična protitelesa proti proteinoma SINKRIP in sinaptotagmin 7. Kolokalizacijo smo analizirali z uporabo fluorescenčnega mikroskopa (Apotom). Stopnja kolokalizacije proteinov je v večini preučevanih področjih zelo nizka. Signal za sinaptotagmin 7 je najmočnejši v nevropilu vseh štirih preučevanih anatomskih področij, za SINKRIP pa v somah celic teh področij. Izjema so le some Purkinjejevih celic, kjer je stopnja kolokalizacije obeh proteinov visoka. Ugotovili smo tudi, da sta oba proteina v dendritih teh celic. Hipotezo o kolokalizaciji lahko samo delno potrdimo. Kolokalizacija v somah ter prisotnost obeh proteinov v dendritih nakazuje na možno vključenost proteina sinaptotagmin 7 pri prenosu mRNA v dendrite Purkinjejevih celic, ki ga uravnava protein SINKRIP. Analizirali smo še prisotnost preučevanih proteinov v različnih anatomskih področjih možganov z metodo imunohistokemije. Potrjujemo hipotezo, da sta proteina SINKRIP in sinaptotagmin 7 prisotna v večini anatomskih področij možganov podgane.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDK 591:577(043.2)=163.6

CX colocalization / SYNCRIP / synaptotagmin 7 / rat brain

AU JERENKO, Ana

AA GLAVAN, Gordana (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programmes in Structural and Functional Biology

PY 2015

TI COLOCALIZATION OF PROTEINS SYNCRIP AND SYNAPTOTAGMIN 7 IN RAT BRAIN

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO XI, 71 p., 5 tbl., 37 fig., 1 ann., 91 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The aim of this study was to investigate colocalization (occurrence at the same location) of proteins SYNCRIP and synaptotagmin 7 in neurons of four anatomical areas in laboratory rat (*Rattus norvegicus*) brain: the hippocampus, striatum, cerebral cortex and cerebellum cortex. We perfused rat brain with fixative, then cut and stained the brain with the method of double immunofluorescence. We used specific antibodies against proteins SYNCRIP and synaptotagmin 7. We analyzed colocalization by fluorescence microscopy (Apotom). Colocalization of proteins in the majority of anatomical areas is low, synaptotagmin 7 is in all anatomical areas expressed mostly in neuropil, on contrary SYNCRIP is expressed predominantly in cell bodies. Exceptions are cell bodies of Purkinje cells, where the colocalization of proteins is relatively high and we conclude that both proteins are present in dendrites of Purkinje cells. We partially confirm the hypothesis about colocalization of proteins SYNCRIP and synaptotagmin 7. It is possible that synaptotagmin 7 may be involved in the transport of mRNA in dendrites of Purkinje cells, which is regulated by protein SYNCRIP. We also analyzed the occurrence of proteins SYNCRIP and synaptotagmin 7 in different anatomical areas of the brain with the method of immunohistochemistry. The results of immunohistochemical staining suggest that both proteins are present in most anatomical areas of the rat brain.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
SLOVARČEK (POJMI IN OKRAJŠAVE).....	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2. 1.1 NEVRONI IN SINAPTIČNI PRENOS	2
2. 1.1.1 Sinaptični vezikli in večji optično gosti vezikli	2
2. 1.1.2 Od kalcija odvisna eksocitoza	3
2. 1.1.3 Endocitoza	4
2. 1.2 SINAPTOTAGMINI.....	5
2. 1.2.1 Zgradba sinaptotagmina	5
2. 1.2.2 Prisotnost sinaptotagmina v možganih	6
2. 1.2.3 Različne izooblike sinaptotagmina	6
2. 1.3 SINAPTOTAGMIN 7	8
2. 1.3.1 Funkcionalna vloga sinaptotagmina 7 pri eksocitozi	8
2. 1.3.2 Izražanje in prisotnost sinaptotagmina 7	10
2. 1.3.3 Pojavljanje sinaptotagmina 7 na sinaptičnih in večjih optično gostih veziklih.....	11
2. 1.3.4 Vloga sinaptotagmina 7 v patoloških procesih.....	12
2. 1.3.4.1 Fagocitoza.....	12
2. 1.3.4.2 Popravilo membrane mišične celice	13
2. 1.3.4.3 Izločanje inzulina iz sekretornih β -celic trebušne slinavke	13
2. 1.3.4.4 Nevrodegenerativne bolezni	13
2. 1.4 SINKRIP	15
2. 1.5. PRENOS mRNA V DENDRITE NEVRONOV.....	16
2. 1.5.1 mRNA.....	16
2. 1.5.2 Prenos granul mRNA v nevronih	17
2. 1.6 ANATOMSKA PODROČJA PODGANJIH MOŽGANOV	21
2. 1.6.1 Možganska skorja	21
2. 1.6.2 Hipokampus.....	22
2. 1.6.3 Mali možgani.....	23
2. 1.6.4 Striatum in druga subkortikalna jedra bazalnih jeder.....	24
3 MATERIALI IN METODE	25
3. 1.1 EKSPERIMENTALNE ŽIVALI	25
3. 1.2 TRANSKARDIALNA PERFUZIJA	25
3. 1.3 PRIPRAVA PROSTO PLAGAJOČIH MOŽGANSKIH REZIN	25
3. 1.4 IMUNOHISTOKEMIČNA LOKALIZACIJA PROTEINOV	26
3. 1.4.1 Analiza in zajem slike imunohistokemičnih preparatov	28
3. 1.5 IMUNOFLUORESCENČNA LOKALIZACIJA PROTEINOV	31
3. 1.5.1 Analiza in zajem slike imunofluorescenčnih preparatov.....	32
3. 1.5.2 Analiza kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP.....	33
3. 1.5.2.1 Pearsonov korelacijski koeficient.....	35

4	REZULTATI.....	37
4. 1.1	LOKACIJA PROTEINOV SINAPTOTAGMIN 7 IN SINKRIP	37
4. 1.1.1	Protein sinaptotagmin 7 je prisoten v večini anatomskih področij.....	37
4. 1.1.2	Protein SINKRIP je prisoten v večini anatomskih področij.....	40
4. 1.1.3	Signal za protein sinaptotagmin 7 je najmočnejši v nevpilulu.....	43
4. 1.1.4	Signal za protein SINKRIP je najmočnejši v somah celic	46
4. 1.2	STOPNJA KOLOKALIZACIJE PROTEINOV SINAPTOTAGMIN 7 IN SINKRIP JE NIZKA, RAZEN V PURKINJEJEVIH CELICAH MALIH MOŽGANOV.....	49
4. 1.2.1	Kolokalizacija v hipokampusu	49
4. 1.2.2	Kolokalizacija v skorji velikih možganov	51
4. 1.2.3	Kolokalizacija v striatumu.....	51
4. 1.2.4	Kolokalizacija v skorji malih možganov	52
5	RAZPRAVA.....	55
5. 1.1	MOREBITNA VLOGA PROTEINOV SINKRIP IN SINAPTOTAGMIN 7 NA PODLAGI UGOTAVLJANJA PRISOTNOSTI V MOŽGANSKIH PODROČJIH ..	55
5. 1.1.1	Hipokampus.....	57
5. 1.1.2	Skorja velikih možganov	57
5. 1.1.3	Striatum	58
5. 1.1.4	Skorja malih možganov	58
5. 1.1.5	Ostala anatomsko področja	59
5. 1.2	NIZKA STOPNJA KOLOKALIZACIJE PROTEINOV.....	60
5. 1.3	UPORABA METODE DVOJNEGA IMUNOFLUORESCENČNEGA OZNAČEVANJA	61
6	SKLEPI	61
7	POVZETEK.....	62
8	VIRI	63

ZAHVALA

PRILOGA

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Primarna in sekundarna protitelesa ter neimuni serumi za imunohistokemično dokazovanje proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v možganskih rezinah.	27
Pregl. 2: Optimizacija razredčitev primarnih protiteles za imunohistokemično dokazovanje proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v možganskih rezinah in optimalne razredčitve primarnih ter sekundarnih protiteles.	28
Pregl. 3: Primarna in sekundarna protitelesa ter neimuni serumi za imunofluorescenčno dokazovanje proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v možganskih rezinah.	32
Pregl. 4: Optimizacija razredčitev primarnih protiteles za imunofluorescenčno dokazovanje proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v možganskih rezinah in optimalne razredčitve primarnih ter sekundarnih protiteles.	32
Pregl. 5: Vrednosti Pearsonovega koeficienta za posamezno področje hipokampusa.	49

KAZALO SLIK

Sl. 1: Kemična sinapsa.	2
Sl. 2: Eksocitoza.	3
Sl. 3: Tvorba fuzijske pore v štirih korakih in proteini sinaptičnega vezikla ter presinaptične membrane nevrona.	4
Sl. 4: Zgradba sinaptotagmina.	5
Sl. 5: Interakcija med proteini SNARE in SIT 7 med Ca^{2+} odvisno eksocitozo.	8
Sl. 6: SIT 7 je v nevronih prisoten na lizosomih.	11
Sl. 7: SIT 7 je v celicah PC12 prisoten na večjih optično gostih veziklih.	12
Sl. 8: SINKRIP je prisoten v granulah mRNA.	15
Sl. 9: mRNA se v dendrite prenaša s pomočjo granul mRNA.	18
Sl. 10: Možganska skorja.	21
Sl. 11: Hipokampus.	22
Sl. 12: Zgradba malih možganov.	23
Sl. 13: Vzdolžni prerez podganjih možganov, bazalna jedra.	24
Sl. 14: Drsni mikrokriotom in zamrznjeni možgani.	26
Sl. 15: Prikaz anatomskih področij možganov podgane, koronarni prerez možganov -3,24 mm od bregme.	29
Sl. 16: Prikaz anatomskih področij možganov podgane, koronarni prerez možganov 1,56 mm od bregme.	29
Sl. 17: Prikaz anatomskih področij možganov podgane, koronarni prerez možganov -10,32 mm od bregme.	30
Sl. 18: Mikroskop AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome.	33
Sl. 19: Shema anatomskih področij, v katerih smo določali kolokalizacijo proteinov, koronarni prerezi možganov.	34
Sl. 20: Fluorogrami različnih tipov kolokalizacije.	36
Sl. 21: Sinaptotagmin 7 je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov -3,24 mm od bregme.	38
Sl. 22: Sinaptotagmin 7 je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov 1,56 mm od bregme.	38
Sl. 23: Sinaptotagmin 7 je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov -10,32 mm od bregme.	39

Sl. 24: SINKRIP je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov -3,24 mm od bregme.	41
Sl. 25: SINKRIP je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov 1,56 mm od bregme.	41
Sl.26: SINKRIP je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov -10,32 mm od bregme.	42
Sl. 27: Sinaptotagmin 7 je najbolj prisoten v nevpilu vseh področij hipokampusa.	44
Sl. 28: Sinaptotagmin 7 je najbolj prisoten v nevpilu možganske skorje, matriksa striatuma in skorje malih možganov.	45
Sl. 29: SINKRIP je prisoten v večini som celic vseh področij hipokampusa.	47
Sl. 30: SINKRIP je najbolj prisoten v somah celic skorje velikih možganov, matriksa striatuma in skorje malih možganov.	48
Sl. 31: Nizka stopnja kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v CA1, CA3 ter dentatnem girusu hipokampusa.	50
Sl. 32: Nizka stopnja kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v skorji velikih možganov.	51
Sl. 33: Nizka stopnja kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v striatumu .	52
Sl. 34: Sinaptotagmin 7 in SINKRIP sta prisotna v Purkinjejevih celicah.	53
Sl. 35: Stopnja kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v skorji malih možganov.	53
Sl. 36: Visoka stopnja kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v somah Purkinjejevih celic in prisotnost obeh proteinov v dendritih.	54
Sl. 37: Zgradba skorje malih možganov. Dendriti Purkinjejevih celic segajo v molekularno plast.	59

SLOVARČEK (POJMI IN OKRAJŠAVE)

Bleedthrough	fluorescenčna emisija
BSA	goveji serumski albumin
C2A, C2B	Ca ²⁺ vezavni podenoti sinaptotagmina
D1, D2	dopaminska receptorja
DA	dopaminski
DAB	substrat encima hrenove peroksidaze 3'3-diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DTE	dendritični tarčni elementi (<i>angl.</i> "dendritic targeting elements")
EPN	entopedunkularno jedro (<i>angl.</i> "entopeduncular nuclei")
EV	zunajcelični vezikli
Fluorogram	razsevni graf moči sivin slikovnih točk dveh izbranih kanalov
FMRP	protein sindroma lomljivega kromosoma X (<i>angl.</i> "fragile X mental retardation protein")
FXS	sindrom lomljivega kromosoma X (<i>angl.</i> "fragile X syndrome")
GABA	γ-aminomaslena kislina
GPe	eksterni palidum (<i>angl.</i> "globus pallidus external")
JACoP	vmesnik za izračun kolokalizacije (<i>angl.</i> "Just Another Colocalization Plugin")
KA	kainat
KIF	družina motoričnih proteinov kinezina (<i>angl.</i> "kinesin superfamily")
KPBS	kalij-fosfatni pufer
LDCV	veliki mešički z elektronsko gosto notranjostjo oz. večji optično gosti vezikli (<i>angl.</i> "large dense-core vesicles")

L-DOPA	Levodopa
LTP	signal (<i>angl.</i> "long-term potentiation")
6-OHDA	6-hidroksidopamin
M1 in M2	Mandersova koeficienta
‘model 6-OHDA’	model enostranske denervacije striatuma s 6-OHDA
mRNA	obveščevalna ribonukleinska kislina
OT	olfaktorni tuberkul
PBS	natrij-fosfatni pufer
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl.</i> "Polymerase Chain Reaction")
PI	pilokarpin hidroklorid
Pixel	slikovna točka
PK	Pearsonov korelacijski koeficient
RNP	RNA-vezavni proteini (<i>angl.</i> "trans-acting RNA-binding proteins")
ROI	območje analize (<i>angl.</i> "region of interest")
STR	striatum
SINKRIP	citoplazemski RNA-vezavni protein, ki se veže na sinaptotagmin (<i>angl.</i> "Synaptotagmin-binding, Cytoplasmic RNA-Interacting Protein")
SN	črno jedro (<i>lat.</i> "substantia nigra")
SNARE	topni NSF vezavni receptor (<i>angl.</i> "soluble NSF attachment receptor")
SNc	kompaktni del črnega jedra (<i>angl.</i> "substantia nigra pars compacta")
SNr	retikulatni del črnega jedra (<i>angl.</i> "substantia nigra pars reticulate")

1 UVOD

Sinaptotagmin (SIT) je sinaptični protein (poznamo 17 njegovih izooblik), ki sodeluje pri regulaciji izločanja nevrottransmiterjev. Sodeluje pri spremembah nevrottransmisije (prenosu živčnih signalnih molekul, npr. dopamina), pri gibanju, učenju, uporabi drog, patoloških spremembah možganov (npr. parkinsonovi bolezni) ... Sinaptotagmin sproži od kalcija odvisno ali neodvisno interakcijo z molekulami, ki sodelujejo pri membranski fuziji in posledično pri eksocitozi in endocitozi sinaptičnih veziklov. SINKRIP je mRNA-vezavni protein, ki se veže na protein sinaptotagmin. Prenos mRNA v dendrite poteka s pomočjo granul RNA, nekateri raziskovalci dopuščajo možnost, da tak prenos poteka s pomočjo veziklov. Prenos molekul mRNA v dendrite nevronov (v dendrite potujejo tudi encimi, na primer za sintezo nevrottransmiterjev) zagotavlja hitrejše lokalno prepisovanje specifičnih proteinov, ki so potrebni za tvorbo novih sinaps. Pri prenosu mRNA v dendrite verjetno sodeluje protein SINKRIP, vendar je njegova natančna vloga v nevronih nepoznana. Z raziskavami *in vitro* so pokazali, da se protein SINKRIP veže na protein sinaptotagmin 7. Sinaptotagmin 7 je protein, udeležen pri procesih eksocitoze večjih optično gostih veziklov ter lizosomov v nevronih. Pokazali so, da ima sinaptotagmin 7 vlogo v patoloških procesih nevrodegeneracije, za katere je med drugim značilna okvarjena sposobnost tvorbe sinaps. Nekateri raziskovalci domnevajo, da ima sinaptotagmin 7 zaradi sposobnosti vezave s proteinom SINKRIP morebitno vlogo pri prenosu mRNA v dendrite nevronov. Narejena ni bila še nobena raziskava *in vivo*, ki bi raziskala morebitno interakcijo obeh proteinov v nevronih.

Namen magistrske naloge je bil raziskati kolokalizacijo (pojavljanje na istem mestu) proteinov SINKRIP in sinaptotagmin 7 v nevronih v različnih anatomskih področjih možganov laboratorijske podgane (*Rattus norvegicus*). V primeru, da sta oba proteina v nevronih skupaj, obstaja možnost za njuno fiziološko interakcijo. Možgane podgan smo transkardialno perfundirali s fiksativom, jih narezali ter pobarvali z metodo dvojne imunofluorescence z uporabo specifičnih protiteles proti preučevanima proteinoma. Z uporabo fluorescenčnega mikroskopa Apotom smo analizirali kolokalizacijo obeh proteinov v različnih anatomskih področjih možganov. Prav tako smo preučili prisotnost proteinov SINKRIP in sinaptotagmin 7 v različnih anatomskih področjih možganov z metodo imunohistokemije.

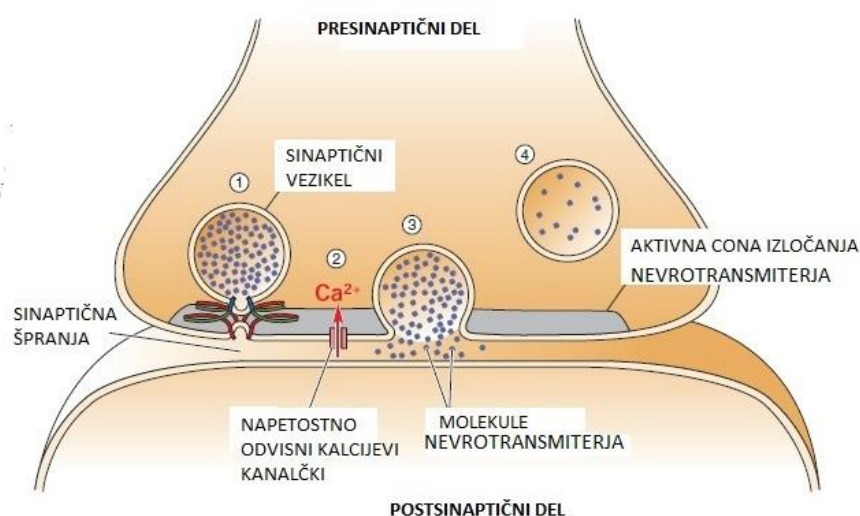
Hipoteze:

1. Protein SINKRIP je kolokaliziran s proteinom sinaptotagmin 7 v nevronih možganov podgane.
2. Proteina SINKRIP in sinaptotagmin 7 sta prisotna v večini anatomskih področij možganov podgane.

2 PREGLED OBJAV

2. 1.1 NEVRONI IN SINAPTIČNI PRENOS

Nevroni spadajo med polarizirane celice, njihova membrana je napetostno odvisna. Zgrajeni so iz some (celičnega telesa), jedra, aksona in dendritov. Dendriti so specializirani za sprejemanje in izločanje signalnih molekul, na svoji membrani imajo številne receptorje. Proteini se izločijo iz celice skozi membrano, tako celice med seboj komunicirajo (Alberts in sod., 1994). Obstajata dva tipa povezav med celicami, kemične in električne sinaptične špranje (Pollard in Earnshaw, 2004). Presinaptična membrana enega nevrona in postsinaptična membrana drugega nevrona sta ločeni s kemično sinaptično špranjo (v nadaljevanju sinapsa), široko od 20 do 50 nm (sl. 1). Sinapsa je napolnjena s sinaptičnimi vezikli, ki vsebujejo živčni prenašalec (v nadaljevanju neurotransmitter), kemično snov, s katero informacija potuje do postsinaptične membrane. Izločanje neurotransmitterja sproži akcijski potencial aksona. Depolarizacija sproži odprtje napetostno odvisnih kalcijevih kanalčkov. Kalcijevi ioni (Ca^{2+}) začnejo skozi vdirati v nevrone. Povečana koncentracija kalcijevih ionov je signal za izločanje neurotransmitterja iz sinaptičnih veziklov. To imenujemo eksocitoza (Bear in sod., 2006). Eksocitoza poteka izredno hitro, v 1 ms (Kandel in sod., 2000).



Slika 1: Kemična sinapsa (prilagojeno po Bear in sod., 2006: 114)

2. 1.1.1 Sinaptični vezikli in večji optično gosti vezikli

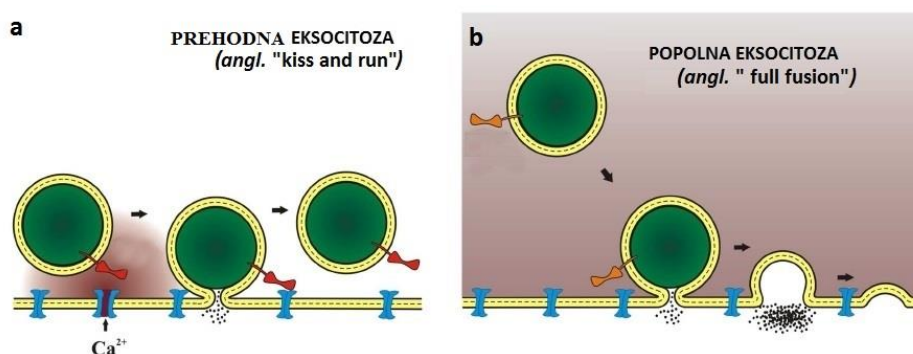
Sinaptični vezikli so samostojni celični organeli, veliki okoli 40 nm, ključni za prenos neurotransmiterjev v nevronih. Vsak presinaptični del nevrona vsebuje na stotine sinaptičnih veziklov z neurotransmitterji, ki se iz njih sprostijo z od Ca^{2+} odvisno eksocitozo (Südhof in Rizo, 2011). Neurotransmitterji so snovi, ki se prenašajo preko sinapse in nanjo vplivajo. Poznamo več vrst neurotransmiterjev: aminokisljine, biogeni amini in peptidi (Kandel in sod.,

2000). Na membrani sinaptičnih veziklov najdemo proteine s specifično vlogo. Njihova vloga je, da prevzemajo neurotransmitterje iz citosola ter sodelujejo pri zlivanju membrane vezikla in membrane celice (Pollard in Earnshaw, 2004).

Peptidni neurotransmitterji so v velikih mešičkih z elektronsko gosto notranjostjo (LDCV, *angl.* "large dense-core vesicles", v nadaljevanju večji optično gosti vezikli). Ti so veliki okoli 100 nm (Bear in sod., 2006) in so vrsta sekretornih zrn, ki jih najdemo v različnih vrstah celic, npr. nevronih, eksokrinih in endokrinih celicah, krvnih celicah, endotelijskih celicah. Tudi eksocitoza večjih optično gostih veziklov poteka v odvisnosti od kalcijevih ionov, njihova sinteza pa se razlikuje od sinteze sinaptičnih veziklov (Burgoyne in Morgan, 2003).

2. 1.1.2 Od kalcija odvisna eksocitoza

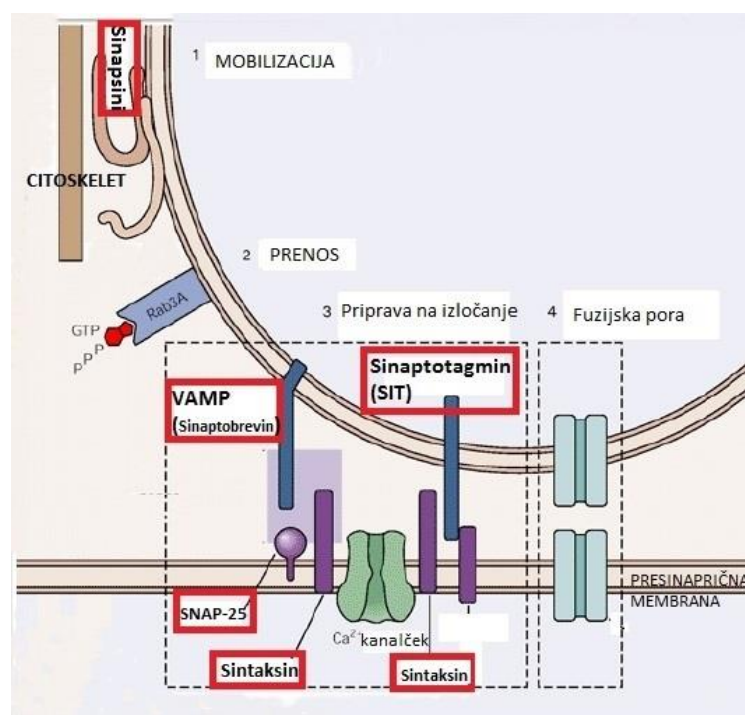
Ločimo prehodno in popolno od kalcija odvisno eksocitozo. V primeru, da celica dobi nekaj milisekund dolg signal in je koncentracija kalcijevih ionov visoka, poteče prehodna (*angl.* "kiss and run") eksocitoza (sl. 2a). Pri tem se vezikel in celica ne zlijeta popolnoma, nastane fuzijska pora. Ko je signal dolg nekaj sekund in koncentracija kalcijevih ionov manjša (okoli 50 μM), poteče popolna (*angl.* "full fusion") eksocitoza. Pri tem se vezikel in celica popolnoma zlijeta (sl. 2b) (Moghadam in Jackson, 2013).



Slika 2: Eksocitoza. (a) Prehodna eksocitoza (b) Popolna eksocitoza (prilagojeno po Moghadam in Jackson, 2013: 4)

Tvorba fuzijske pore se začne z enim samim kanalčkom, ki poveže membrano sinaptičnega vezikla in membrano nevrona. Zlivanje membrane vezikla in membrane nevrona se začne že 5 ms po začetku dražljaja, vse skupaj pa traja le 2 ms (Kandel in sod., 2000). Tvorba fuzijske pore poteka v štirih korakih in je prikazana na sl. 3. Najprej pride do pritrditve sinaptičnega vezikla s citoskeletom končiča nevrona, torej mobilizacije (1). Sledi prenos (2) sinaptičnega vezikla na aktivno cono izločanja neurotransmitterja. Naslednja je priprava za izločanje oz. razširitev fuzijske pore (3) in nato izločanje sinaptičnega vezikla skozi fuzijsko poro (4) (Kandel in sod., 2000).

Sinapsini so proteini sinaptičnega vezikla, ki so ključni pri mobilizaciji. Pri prenosu sinaptičnega vezikla na aktivno cono sodelujejo proteini Rab. VAMP (sinaptobrevin), SNAP-25, sinaptotagmin (v nadaljevanju SIT) na membrani sinaptičnega vezikla in sintaksin na presinaptični membrani nevrona pa so proteini, ki sodelujejo pri pripravi na izločanje in pri izločanju nevrottransmitterjev. VAMP (sinaptobrevin), SNAP-25 in sintaksin so tarče nekaterih živčnih strupov, kot sta tetanus in botulinum toksin, ki preko teh proteinov lahko vplivajo na izločanje nevrottransmitterja (Kandel in sod., 2000). Nekateri proteini sinaptičnega vezikla in presinaptične membrane nevrona so prikazani na sl. 3.



Slika 3: Tvorba fuzijske pore v štirih korakih in proteini sinaptičnega vezikla ter presinaptične membrane nevrona (prilagojeno po Kandel in sod., 2000: 245)

2. 1.1.3 Endocitoza

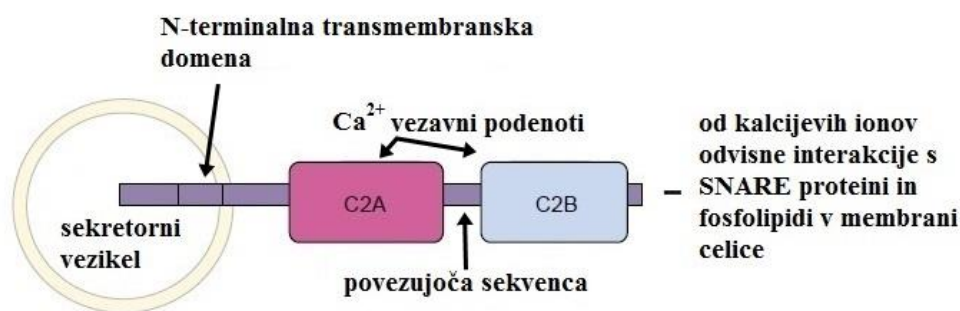
Z endocitozo celica privzema makromolekule, med drugim tudi nevrottransmitterje. Poteka na enak način kot eksocitoza. Makromolekule še pred privzemom v celico obda manjši del plazmaleme, ki se nato uviha in se nato kot vezikel odcepi v notranjost celice. Obstajata dve vrsti endocitoze. Prvega imenujemo pinocitoza ali celično pitje. Gre za privzemanje tekočine z raztopljenimi snovmi iz zunajceličnega prostora. Drugi je receptorsko uravnavana endocitoza, s katero celica privzema specifične makromolekule (Pollard in Earnshaw, 2004). Endocitozo omogočajo prevlečene jamice na površini veziklov, ki vsebujejo klatrin (*angl.* "coated pit"). Te prevlečene jamice sestavljata dve komponenti: klatrinski del in AP-2 kompleks (*angl.* "adaptor protein complex") (von Poser in sod., 2000).

2. 1.2 SINAPTOTAGMINI

Sinaptotagmin (SIT) je transmembranski protein (Kandel in sod., 2000), pomemben pri tvorbi fuzijske pore pri eksocitozi, odvisni od kalcija. Deluje kot senzor za povečano koncentracijo kalcijevih ionov. Odkrili so ga pred več kot dvajsetimi leti, prva je bila odkrita izooblika SIT 1 (Burgoyne in Morgan, 2003). Pri vretenčarjih je poznanih 17 izooblik SIT, pri metazojih 3 (SIT 1, 4 in 7). To nakazuje, da so te 3 izooblike evolucijsko najbolj ohranjene (Liu in sod., 2014). Naprej so izooblike razdeljene na poddružine, ki so si po zgradbi bolj podobne: SIT 1, 2 in 9 tvorijo eno poddružino, SIT 3, 5, 6, 10 drugo ter SIT 4, 11 tretjo poddružino. Ostale izooblike niso razdeljene v poddružine (Fukuda, 2006).

2. 1.2.1 Zgradba sinaptotagmina

Sinaptotagmin je zgrajen iz dveh delov, kratkega znotrajceličnega (okoli 70 aminokislin (Fukuda, 2006)) ter daljšega zunajceličnega oz. citoplazemskega dela. Znotrajcelični del imenujemo tudi N-terminalna transmembranska domena (NTD). Citoplazemski del ima dve Ca^{2+} vezavni podenoti C2, C2A in C2B (Andrews in Chakrabarti, 2005). Ti sta homologni C2 podenoti različnih protein kinaz C in fosfolipaz A2 (Burgoyne in Morgan, 2003). C2A in C2B sta povezani s kratko povezujočo sekvenco. Obe podenoti C2 imata sendvič zgradbo dveh štirislojnih β -ravnin (*angl.* " β -sheet"). Pri usmerjanju kalcijevih ionov je najpomembnejši del Asp (*angl.* "conserved acidic residues") v zanki C2B podenote. Mesto vezave ionov na C2 področji se med izooblikami SIT razlikuje, oblika vezave pa je vedno ista - v obliki žepka (Andrews in Chakrabarti, 2005).



Slika 4: Zgradba sinaptotagmina (prilagojeno po Andrews in Chakrabarti, 2005: 2)

Obe C2 podenoti se vežeta na fosfolipide v membrani nevrona. SIT je negativni in pozitivni regulator izločanja neurotransmiterja. Kot negativni preprečuje tvorbo fuzijske pore in izločanje, če ni povečanja koncentracije kalcijevih ionov. Kot pozitivni sodeluje pri tvorbi fuzijske pore, če je koncentracija kalcijevih ionov povečana (Kandel in sod., 2000).

2. 1.2.2 Prisotnost sinaptotagmina v možganih

SIT 1, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 13 so prisotni v večini možganskih področij, medtem ko so SIT 2, 6, 9, 10 specifični, prisotni le v določenih možganskih anatomskih področjih. Prepisovanje mRNA SIT 1-5, 10, 11, 13 je vezano predvsem na nevrone. SIT 1 je najpogostejša izooblika, najbolj specifična za določena področja pa je izooblika SIT 2. Ti izoobliki sta delno komplementarni, SIT 1 je pogostejši v rostralnem področju, SIT 2 v kaudalnem področju možganov. Vzorca izražanja mRNA SIT 11 in 4 v možganih se prekrivata. V CA1 področju hipokampusa so v nevronih najpogostejše izooblike SIT 1, 4, 5 in 11, v astrocitih tega področja pa sta bolj izraženi izoobliki SIT 4, 7. Na sinaptičnih veziklih so zaznali največ SIT 1, 2, 9, 12, na plazemski membrani pa SIT 3, 6, 7. Znotrajcelična prisotnost SIT 10 in 11 za zdaj še ni znana (Glavan in sod., 2009).

2. 1.2.3 Različne izooblike sinaptotagmina

SIT 1 je najbolj raziskana ter v živčnem in endokrinem sistemu najpogostejša (Moghadam in Jackson, 2013) izooblika SIT. Veže tri kalcijeve ione na C2A podenoti, dva na C2B podenoti. Je na površju sinaptičnih veziklov (Andrews in Chakrabarti, 2005) in na večjih optično gostih veziklih neuroendokrinih celic ter ob pojavu Ca^{2+} odvisnega signala sproži zlitje sinaptičnega vezikla v procesu hitre eksocitoze (Moghadam in Jackson, 2013) s sinaptično membrano nevrona preko aktivacije proteinov SNARE (sintaksin-1a, SNAP-25 in VAMP-2/sinaptobrevin-2 ali PIP2 (fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat)) (Fukuda, 2006). Brez vezave na Ca^{2+} odvisne ligande, kot so fosfolipidi, je verjetnost vezave Ca^{2+} na SIT 1 zelo majhna (Andrews in Chakrabarti, 2005). SIT 2 je bil zaznan v hipotalamusu, najverjetneje deluje kot Ca^{2+} senzor (Moghadam in Jackson, 2013).

SIT 3, 5 in 6 so prisotni samo pri vretenčarjih. SIT 5 in 6 sta večinoma prisotna na sekretornih veziklih, SIT 3 bolj na presinaptični membrani. Slednji deluje kot Ca^{2+} senzor za eksocitozo neurotransmiterjev, SIT 5 deluje kot Ca^{2+} senzor za eksocitozo specifičnih večjih optično gostih veziklov v možganih, SIT 6 pa ima pomembno vlogo pri akrosomski reakciji. To je specifična reakcija od Ca^{2+} odvisne eksocitoze pri moški spolni celici (Andrews in Chakrabarti, 2005).

SIT 4 je v največji meri zaznan v Golgijevem aparatu ter končičih aksonov in dendritov na novo rastočih nevronov. Pri zrelih nevronih njegova prisotnost v aksonih in dendritih skoraj izgine (Andrews in Chakrabarti, 2005). Najdemo ga predvsem na membrani še nezrelih sekretornih veziklov, ni pa prisoten na membrani večjih optično gostih veziklov. Vpliva na dozorevanje nezrelih sekretorenih veziklov, količina SIT 4 pa vpliva tudi na njihovo velikost (Moghadam in Jackson, 2013).

SIT 9 je soroden SIT 1, najdemo ga na večjih optično gostih veziklih neuroendokrinih celic PC12 ter inzulin sekretornih β -celicah trebušne slinavke (Moghadam in Jackson, 2013).

SIT 10 se izraža po epileptičnih napadih, induciranih s kainatom, kje točno je, še ni znano (Andrews in Chakrabarti, 2005).

SIT 11 je soroden SIT 9. O njem je znano, da interagira s proteinom Parkin, to je avtosomalni recesivni juvenilni produkt gena za parkinsonovo bolezen (Andrews in Chakrabarti, 2005). Ugotovili so (Duque in sod., 2014) tudi, da je vpleten v fagocitozo pri makrofagih.

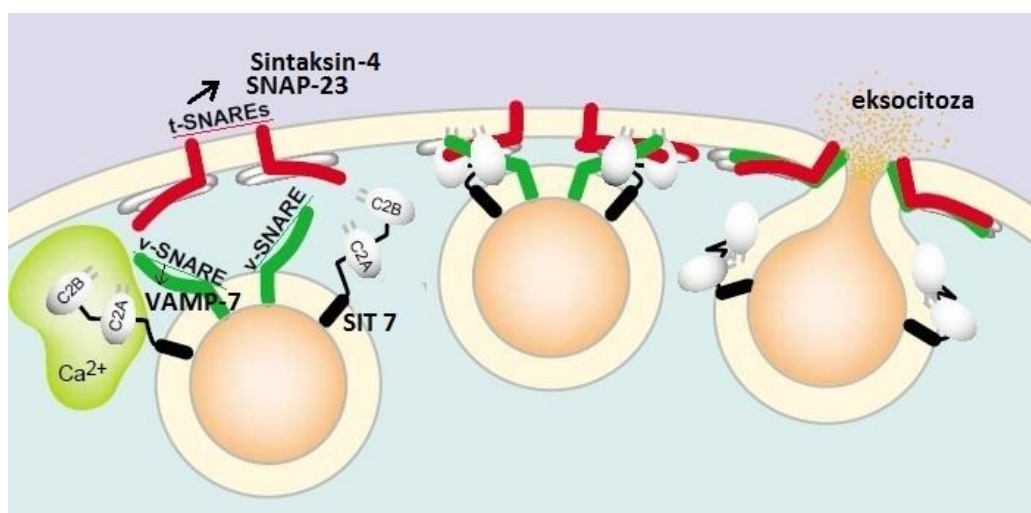
SIT 8, 12, 13, 14, 15 nimajo Ca^{2+} odvisne vezave na fosfolipide v celični membrani. SIT 12 je najbolj izražen v možganih, njegova koncentracija pa je odvisna od tiroidnih hormonov. Pomemben je za nastanek LTP (*angl.* "long-term potentiation") v hipokampusu (Kaeser-Woo in sod., 2013). SIT 8 ima tako kot SIT 6 pomembno vlogo pri akrosomski reakciji, saj v odvisnosti od Ca^{2+} interagira s sintaksin-2. Druge izooblike SIT še niso dobro raziskane (Fukuda, 2006).

Izooblika, ki se pojavi na sekretornem veziklu, določa, kakšen Ca^{2+} odvisen signal bo sprožil fuzijo vezikla z membrano, ali bo eksocitoza prehodna ali popolna ter količino molekul, ki se sprosti iz vezikla (Moghadam in Jackson, 2013).

2. 1.3 SINAPTOTAGMIN 7

2. 1.3.1 Funkcionalna vloga sinaptotagmina 7 pri eksocitozi

SIT 7 je vpleten v evolucijsko ohranjene dogodke vzpostavljanja fuzijskih por. Lokalizirali so ga na membranah določenih sekretornih veziklov. SIT 7 ima specifično, in povsod kjer je, enako vlogo eksocitoze sekretornih veziklov v odvisnosti od Ca^{2+} . Citoplazemski kalcijevi ioni se vežejo na C2 podenoti SIT 7 v membrani sekretornega vezikla. To povzroči vezavo SIT 7 na fosfolipide in proteine SNARE v sinaptični membrani nevrona. C2 podenoti predreta lipidni dvosloj in s proteini SNARE vijačne oblike oblikujeta fuzijsko poro. Na sl. 5 sta prikazani dve molekuli SIT 7, lahko pa tvorijo oligomere. V tem primeru lahko omejijo širjenje fuzijske pore. SIT 7, ki je večinoma vključen v eksocitozo lizosomov, interagira z v-SNARE (VAMP-7), t-SNARE (sintaksin-4 in SNAP-23). Interakcija je prikazana na sl. 5 (Andrews in Chakrabarti, 2005).



Slika 5: Interakcija med proteini SNARE in SIT 7 med Ca^{2+} odvisno eksocitozo (prilagojeno po Andrews in Chakrabarti, 2005: 2)

SIT 7 sodeluje pri počasni in nesinhroni eksocitozi (Bacaj in sod., 2013). Če bo potekla prehodna ali popolna eksocitoza, je odvisno od izooblike SIT. Afiniteta SIT 7 do Ca^{2+} je ob vezavi na Ca^{2+} odvisne ligande, kot so fosfolipidi, večja kot pri SIT 1, tako je SIT 7 aktiviran ob manjši koncentraciji kalcijevih ionov kakor SIT 1. SIT 7 prej sproži popolno eksocitozo, kar je pomembno za eksocitozo od membrane oddaljenih sekretornih veziklov. SIT 1 pa prej sproži prehodno eksocitozo, pomembno za eksocitozo veziklov blizu membrane. Kinetika kalcijev ion - SIT 7 kompleksa je počasnejša kot kinetika kompleksa kalcijev ion - SIT 1 (Moghadam in Jackson, 2013).

Na klatrinski prilagojevalni protein AP-2 se preko podenote C2B SIT 7 močno veže in je glede na to vključen ne samo v proces eksocitoze, ampak tudi v proces endocitoze. Njegova vloga pri endocitozi je podobna kot pri eksocitozi (von Poser in sod., 2000).

Izražanje SIT 7 je odvisno od vezave Ca^{2+} . Če je onemogočena vezava Ca^{2+} na obe C2 podenoti SIT 7, se izražanje SIT 7 izrazito zmanjša. V kolikor je onemogočena vezava Ca^{2+} na C2B podenoto, se izražanje SIT ne spremeni (Maximov in sod., 2007). Pri vezavi Ca^{2+} na SIT 7 je C2B podenota pomembnejša ob C2A (Schonn in sod., 2008). Od SIT 7 je odvisno širjenje fuzijske pore v procesu eksocitoze. Pri prehodni eksocitozi v celicah, kjer je prisoten, se pora razširi do 30 nm, pri celicah, ki ga ne izražajo, pa se sekretorni vezikli popolnoma zlijejo z membrano (Andrews in Chakrabarti, 2005). C2 podenoti SIT 7 različno vplivata na širjenje fuzijske pore. Obe podenoti vzpostavita odprte fuzijske pore, C2B pa je tista, zaradi katere je fuzijska pora stabilna in široka. Tudi brez C2B podenote C2A podenota sproži vzpostavitev, vendar so v tem primeru fuzijske pore ozke in labilne. Največ raziskav SIT 7 je bilo narejenih na sinapsah, fuzijske pore pa je tam težko natančno študirati, zato so raziskave (Segovia in sod., 2010) vpletenosti SIT 7 v fuzijskih porah potekale na neuroendokrinih celicah in v večini na celičnih kulturah.

Za Ca^{2+} odvisno endocitozo in eksocitozo sekretornih veziklov in vzpostavitev fuzijske pore je potreben fosfatidilinozitol bifosfat (PtdIns(4,5)P₂). SIT 7 se ob odsotnosti Ca^{2+} nanj veže s C2B podenoto, če je Ca^{2+} prisoten, pa z obema C2 podenotama. Brez vezave na fosfatidilinozitol bifosfat hitra in učinkovita vzpostavitev fuzijske pore ne bi bila mogoča (Osborne in sod., 2007).

Obnovitev sinaptičnega vezikla po eksocitozi in endocitozi vpliva na učinkovitost prenašanja neurotransmiterjev v primeru zaporednih dražljajev. Obnovitev sinaptičnega vezikla poteka v odvisnosti od SIT 7. Alternativno izrezovanje mRNA SIT 7 lahko bodisi pospeši ali upočasni obnovitev. Na celični kulturi hipokampusnih nevronov so ugotovili (Virmani in sod., 2003), da krajša oblika SIT 7 brez C2 podenot pospeši obnovitev, daljša oblika pa jo upočasni. V obnovitev je vključen tudi kalmodulin. Kalmodulin veže Ca^{2+} in skupaj s SIT 7 tvori Ca^{2+} vezavni kompleks. Ta kompleks sodeluje pri ponovni obnovitvi sinaptičnega vezikla po eksocitozi. Pri obnovitvi sinaptičnega vezikla se s kalmodulinom veže tudi Munc 13-1. Če se Munc 13-1 veže istočasno s SIT 7, še ni raziskano. SIT 1, 2, 4, 9 in 10 izooblike tega kompleksa niso tvorile (Liu in sod., 2014).

Eksocitoza večjih optično gostih veziklov neuroendokrinih celic PC12, ki vsebujejo SIT 7, tako kot eksocitoza sinaptičnih veziklov, poteka v odvisnosti od Ca^{2+} (Fukuda in sod., 2004). Raziskave (Tsuboi in Fukuda, 2007) so potrdile, da SIT 7 ne usmerja prenosa (*angl.* "docking step") in razporeditve večjih optično gostih veziklov v teh celicah, ampak sodeluje pri kinetiki (vzpostavljanju, razširjanju in trajanju odprtja) fuzijske pore ter posledično pri izločanju hormonov iz neuroendokrinih celic PC12. Membrani večjega optično gostega vezikla in celice PC12 se pri tem popolnoma zlijeta.

Uravnavanje usmerjanja veziklov v različne endocitotzne oz. eksocitotzne poti naj bi bilo po enem od teoretičnih modelov odvisno od razmerja med oblikami SIT 7 z različno dolgo povezujočo sekvenco. Kratke spojivne oblike SIT 7 npr. zavrnejo od klatrina odvisno endocitozo (von Poser in sod., 2000).

2. 1.3.2 Izražanje in prisotnost sinaptotagmina 7

Izražanje in prepisovanje gena za SIT 7 in drugih proteinov sinaptičnih veziklov je odvisno od metilacije aminokislinske lizina na tretjem histonu. Tretiranje z retinoično kislino zavira izražanje tega gena (Ekici in sod., 2008).

SIT 7 se pri podgani izraža v malih koncentracijah v črevesju, ledvicah, trebušni slinavki, srcu, pljučih, hrbtenjači. V višjih koncentracijah kakor pri teh neživčnih tkivih pa je bila koncentracija mRNA SIT 7 zaznana v velikih in malih možganih ter v vohalnem bulbusu. V možganih je bila zaznana že obdelana mRNA SIT 7, v ostalih pa 65 kDa velika, še neobdelana oblika mRNA SIT 7a (Andrews in Chakrabarti, 2005). V mišjih možganih se oblike SIT 7 z večjo molekularno maso pričnejo izražati šele v postnatalnem obdobju, v 3. tednu pa postanejo v prednjem delu možganov najpogostejše oblike SIT 7 (Fukuda in sod., 2002). Različna anatomsko področja v možganih podgane izražajo različni profil oblik SIT 7 (Sugita in sod., 2001).

SIT 7 se na začetku razvoja organizma izraža drugače, kot kasneje v življenju. Vedno je prisoten v vseh deležih se celicah, med njimi so npr. trajne linije rakavih celic (Maximov in sod., 2007). Znotrajcelično je bilo njegovo pojavljanje zaznano v sinaptičnih veziklih in presinaptični membrani nevronov in neuroendokrinih celic, na večjih optično gostih veziklih endokrinih celic, na membrani lizosomov in večjih optično gostih veziklih (Andrews in Chakrabarti, 2005) fibroblasta (Fukuda, 2006).

SIT 7 najdemo med molekulami, ki sestavljajo tesne stike¹ (Tang, 2006).

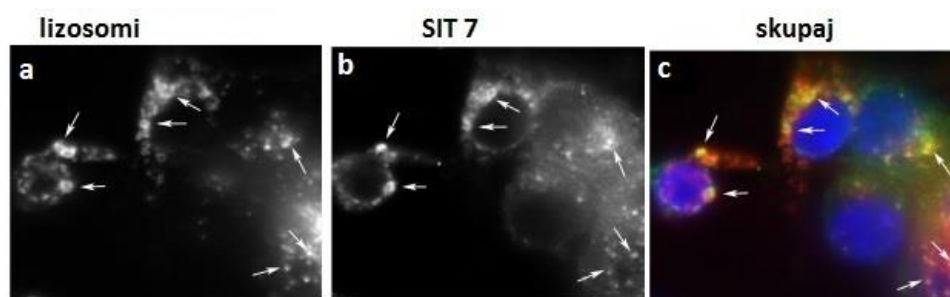
SIT 7 ni prisoten pri mušicah, kar je v nasprotju s tem, da bi naj imel pomembno vlogo pri eksocitozi (Andrews in Chakrabarti, 2005). To je razložljivo s tem, da ne sodeluje pri hitri in sinhroni, temveč pri počasni in nesinhroni eksocitozi (Moghadam in Jackson, 2013).

¹ **Tesni stiki** (*angl.* "tight junction") so specializirana vrsta interakcije membran dveh epiteljskih celic (Tang, 2006).

2. 1.3.3 Pojavljanje sinaptotagmina 7 na sinaptičnih in večjih optično gostih veziklih

Da je SIT 7 prisoten na sekretornih veziklih, je bilo raziskano na podganjih celicah ter potrjeno še na mišjih, človeških in celicah hrčka (Andrews in Chakrabarti, 2005).

SIT 7 ima pomembno vlogo v kromafinskih celicah², kje je eksocitoza ob njegovi odsotnosti signifikantno zmanjšana (Schonn in sod., 2008). Pri nevronih je SIT 7 najbolj prisoten v dendritih presinaptičnih celic oz. presinaptični aktivni coni (Andrews in Chakrabarti, 2005). V teh celicah interagira z glikoproteinom 1 (Lamp1)/VAMP7 na membrani lizosoma, kar je prikazano na sl. 6 (Arantes in Andrews, 2006).

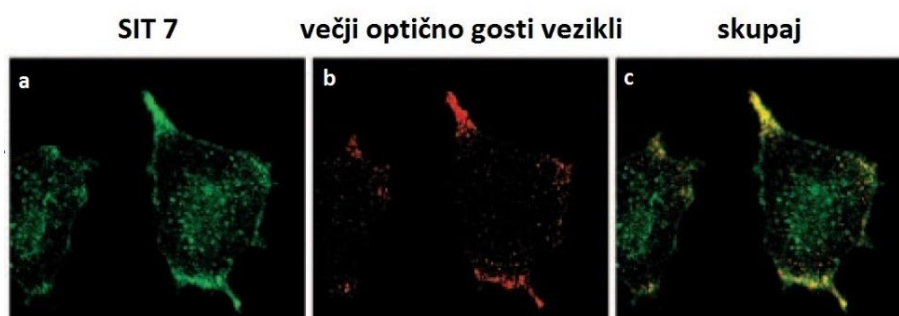


Slika 6: SIT 7 je v nevronih prisoten na lizosomih. (a) Označen glikoprotein 1(Lamp1)/VAMP7 prisoten na lizosomih (b) Z green fluorescenčnim proteinom označen SIT 7 (c) Lamp1/VAMP7 in SIT 7 označena skupaj (prilagojeno po Arantes in Andrews, 2006: 5)

Njegovo znotrajcelično pojavljanje kaže tudi na njegovo vlogo pri prenosu sinaptičnih veziklov v dendrite (Montserrat in sod., 2007), kajti prisotnost SIT 7 na plazemski membrani je bila dokazana z elektronsko mikroskopijo (Sugita in sod., 2001). Vloga SIT 7 pri prenosu sinaptičnih veziklov z nevrottransmitterji iz some v dendrite je bila dokazana na primeru prenosa dopamina. Ko pride do znižanega izražanja SIT 7, se zmanjša koncentracija dopamina v somi in dendritih celice. Za izločanje nevrottransmitterja iz sinaptičnih veziklov je SIT 7 nujno potreben (Mendez in sod., 2011).

Prisotnost SIT 7 je bila dokazana (Fukuda in sod., 2004) tudi na večjih optično gostih veziklih celic PC12, kar je prikazano na sl. 7.

² **Kromafinske celice** (*angl.* "Cromaffin cells") so neuroendokrine celice sredice nadledvične žleze, ki so pod nadzorom simpatičnega živčnega sistema. Ko jih ta spodbudi, izločijo skozi fuzijske pore v večjih optično gostih veziklih kateholemine in neuropeptide (Fulop in sod., 2005).



Slika 7: SIT 7 je v celicah PC12 prisoten na večjih optično gostih veziklih. (a) Z green fluorescenčnim proteinom označen SIT 7 (b) Označen Rab3A, prisoten na večjih optično gostih veziklih (c) Rab3A in SIT 7 označena skupaj (prilagojeno po Fukuda in sod., 2004: 2)

Dokazali so (Fukuda in sod., 2004), da je SIT 7 prisoten na nekaterih znotrajceličnih strukturah, kot je membrana Golgijevega aparata in je kolokaliziran s SIT 1 in 9, ne pa s SIT 4. Povezan je z endokrinimi inzulinskim sekretornimi β -celicami trebušne slinavke podgan. Izločanje inzulina iz teh celic poteka v odvisnosti od Ca^{2+} , vloga SIT 7 je pri tem ključna (Gao in sod., 2000). Zraven SIT 5 in 8 je SIT 7 najbolj prisotna izooblika SIT pri Ca^{2+} odvisni eksocitozi inzulina in je prisotna na večjih optično gostih veziklih teh celic, ki vsebujejo inzulinske vezikle (Gut in sod., 2001). Pojavlja se tudi skupaj z Rab7 na endosomih in drugih celičnih strukturah blizu celične membrane. Druge raziskave (Monterrat in sod., 2007) nakazujejo, da SIT 7 ni prisoten na večjih optično gostih veziklih celic PC12 in inzulinskim sekretornih β -celicah trebušne slinavke. Na inzulinskim sekretornih β -celicah trebušne slinavke (INS-1E) je vidno, da pri eksocitozi iz teh celic najbolj sodeluje α , β in γ spojitelna oblika mRNA SIT 7 (Gauthier in sod., 2007). To so druge spojitelne oblike, kakor v nevronih (Monterrat in sod., 2007).

2. 1.3.4 Vloga sinaptotagmina 7 v patoloških procesih

2. 1.3.4.1 Fagocitoza

SIT 7 sodeluje pri fagocitozi. To je proces, kjer makrofag vnese v svojo notranjost delce večje od $0,5 \mu\text{m}$ v premeru. Miši brez SIT 7 nimajo fagocitotskega procesa, odvisnega od SIT 7, ki vključuje vezavo membrane lizosoma na membrano makrofaga (Czibener in sod., 2006). V raziskavi (Flannery in sod., 2010) na makrofagih je bilo ugotovljeno, da so za vezavo potrebne specifične mikrodomene oziroma t.i. palmitoilacijska mesta, kjer se zgodi palmitoilacija (vezava lizosoma in membrano makrofaga) v območju Golgijevega aparata. Po vezavi na te domene poteče prenos SIT 7 v celici in njegova vezava makrofaga na lizosom.

2. 1.3.4.2 Popravilo membrane mišične celice

V mišični celici SIT 7 sodeluje pri uravnavanju eksocitoze lizosomov kot Ca^{2+} senzor in pripomore k popravilu celične membrane. Miši, ki nimajo gena za SIT 7, razvijejo vnetno miopatijo, v mišične celice vdrejo levkociti in začne se odlagati kolagen. Pri miših se pojavijo tudi značilnosti nekaterih avtoimunih bolezni, kot je odziv s protitelesi (Chakrabarti in sod., 2003).

2. 1.3.4.3 Izločanje inzulina iz sekretornih β -celic trebušne slinavke

V endokrinih inzulinske sekretorne β -celice trebušne slinavke je SIT 7 najpogostejša SIT izooblika. Povezana je s pojavom glukozne občutljivosti in od glukoze odvisnega izločanja inzulina iz teh celic. Miši brez SIT 7 kažejo normalno glukozno občutljivost, normalno količino izdelanega inzulina, vendar zaradi odsotnosti SIT 7 ne pride do sekrecije inzulina, kar posledično vodi v pojav sladkorne bolezni. Te miši kažejo zmanjšano količino maščob (vsebnost lipidov v mišičnih celicah in koncentracija prostih maščobnih kislin) in imajo manjšo telesno težo kakor miši s SIT 7 (Gustavsson in sod., 2008).

2. 1.3.4.4 Nevrodegenerativne bolezni

Pri nevrodegenerativnih boleznih (huntingtonova, parkinsonova, alzheimerjeva bolezen) je težava v degeneraciji nevronov ali sinaptičnih medceličnih povezavah. Pride do patofizioloških procesov, kakor je pomanjkanje energije, porušenje ionske homeostaze, pojav reaktivnega kisika, ki poškoduje membrane ... Vse to pa vodi v apoptozo, nekrozo nevronov. SIT 7 ima vlogo popravljanja teh degeneriranih nevronov in prilagajanja pri njihovi izgubi (nevroplastičnost) (Glavan in sod., 2009). Nevroni v superiornih cervikalnih ganglijih miši brez SIT 7 ne kažejo normalne rasti in razvejanja, kar kaže na vlogo SIT 7 pri nastanku novih membran in razširjanju nevronov (Arantes in Andrews, 2006). V raziskavi (Glavan in Živin, 2005) vloge SIT 7 in drugih izooblik SIT pri parkinsonovi bolezni so bile uporabljene podgane z lezijami v levi polovici striatuma (poškodovani dopaminski (DA) nevroni), narejenimi s toksinom 6-OHDA. Hemiparkinsonske zaradi tega, da druga polovica možganov z nepoškodovanimi DA nevroni služi kot kontrola. Podgane so razvile močna stereotipna vedenja, vrtenje v krogu, kar je bil znak poškodbe. Pri parkinsonovi bolezni se izločanje dopamina v striatumu (STR) zmanjša zaradi poškodb v črnem jedru (SN), kjer pride do degeneracije DA nevronov. Receptorji za dopamin v STR t.j. postsinaptično, postanejo preobčutljivi - temu rečemo DA hipersenzitivizacija. Slednje se zgodi zaradi spremenjenega izražanja proteinov DA receptorjev ali pa proteinov, ki sodelujejo pri znotrajcelični signalizaciji. Levodopa (L-DOPA), prekursor za dopamin, se lahko pri zdravljenju parkinsonove bolezni uporablja za izboljšanje bolezenskega stanja. Izražanje mRNA SIT 7 se v denerviranem STR poveča po dajanju učinkovine L-DOPA poskusnim hemiparkinsonskim podganam. Raziskovalci (Glavan in Živin, 2005) domnevajo, da je SIT 7 vključen v patofiziološke spremembe sinaptičnega prenosa pri parkinsonovi bolezni.

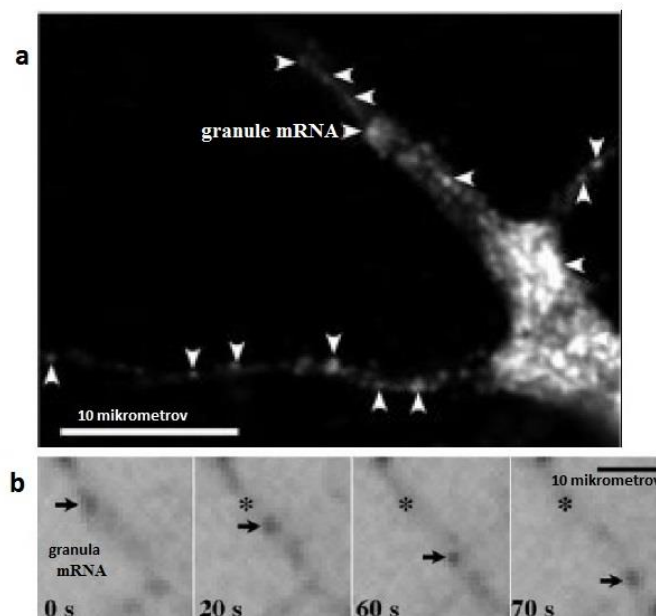
Spremembe se zgodijo ob stimulaciji DA receptorjev D1, ne pa tudi D2. Izražanje mRNA SIT 7 se torej spremeni v nevronih direktne striatne poti. Stimulacija D2 receptorjev zavira adenilil ciklaze³ in na izražanje mRNA SIT 7 nima vpliva (Pal in sod., 2007). Pomanjkanje dopamina so v drugi raziskavi (Pal in sod., 2007) simulirali z rezepinom (RES), da bi ugotovili, če je DA hipersenzitivizacija (povečano izražanje mRNA SIT 7) vezana le na STR, ali tudi na druga anatomsko področja možganov. RES blokira monoaminski transporter, ki je potreben za prenos dopamina v vezikle, zaradi česar dopamin ostaja v citoplazmi in ga encimi metabolizirajo. S tem se zmanjša ali prepreči sproščanje dopamina v sinapsah in se pojavijo učinki podobni uničenju nevronov s 6-OHDA. Rezultati kažejo na to, da za razliko od STR, v prilagoditvah v nevronih z DA sinapsami v drugih območjih možganov, po depleciji dopamina, SIT 7 ne sodeluje (Pal in sod., 2007).

SIT 7 je udeležen pri pojavu epileptičnih napadov. Kainat (KA) in pilokarpin hidroklorid (PI) sta snovi, ki epileptične napade sprožita umetno, s hiperekscitacijo nevronov, ta pa potem povzroči nevrodegeneracijo, patološke spremembe hipokampusnih nevronov in celic glije. PI je antagonist muskarinskih acetilholinskih receptorjev, napade sproži indirektno, s preveliko stimulacijo glutamatnih receptorjev nevronov korteksa. Ta se po prenehanju draženja s PI ne preneha. KA je antagonist specifičnega podtipa glutamatnih receptorjev, zato epileptične napade sproži kar direktno (Glavan in sod., 2012). V raziskavi (Glavan in sod., 2012) so ugotovili, da se po epileptičnih napadih, izzvanih s PI, izražanje mRNA SIT 7 v striatumu poveča dolgotrajneje kot po napadih, izzvanih s kainatom, a le v ventromedialnem delu striatuma. Povečanje pa je verjetno posledica povečane koncentracije dopamina med epileptičnimi napadi. Epileptični napadi, sproženi s KA in PI, se razlikujejo glede na izražanje SIT 7 zaradi zapletenih mehanizmov uravnavanja izražanja SIT 7 v možganih med napadi.

³ **Adenilil ciklaze** (*angl.* "adenylyl cyclase") so družina membranskih proteinov z desetimi izooblikami. Omogočajo nastanek molekul ciklični AMP, ki so vpletene v delovanje kompleksnih poti prenosa signala med nevroni (Sunahara in sod., 1996).

2. 1.4 SINKRIP

SINKRIP (*angl.* "Synaptotagmin-binding, Cytoplasmic RNA-Interacting Protein") je citoplazemski RNA-vezavni protein, ki naj bi se vezal na SIT 7. Z metodo koimunoprecipitacije so pokazali, da s proteinom SINKRIP interagirata tudi izoobliki SIT 8 in SIT 10. SINKRIP se s SIT poveže preko podenote C2B. Sodeluje pri znotrajceličnem prenosu mRNA v dendrite celic. Ker je vezan tako na granule mRNA kot na SIT 7, interakcija med njima nakazuje vključenost SIT 7 pri prenosu mRNA v dendrite nevronov. Velikost molekule proteina SINKRIP je 66 kDa (Mizutani in sod., 2000). SINKRIP so odkrili pri miših, obstaja pa tudi človeški homologni protein. Ta protein je prisoten v granularni obliki, neenakomerno. Granule mRNA potujejo proti dendritom z različno hitrostjo. Tiste, v katerih je prisoten SINKRIP, potujejo proti dendritom s hitrostjo okoli 0,05 $\mu\text{m/s}$. Raziskave (Bannai in sod., 2004) nakazujejo, da SINKRIP ni prisoten v tistih granulah mRNA, ki se prenašajo hitreje. Natančna vezava proteina SINKRIP v granule mRNA še ni znana, prav tako tudi ni dobro poznana njegova fiziološka vloga. Znano je le, da stabilizira mRNA pri prenosu v dendrite. Na njegovo vezavo na mRNA močno vpliva fosforilacija tirozina, ki jo lahko povzročijo inzulin ali drugi faktorji (npr. fibroblast rastni faktor). V poli-A repu 3' mRNA molekule, kjer je SINKRIP najverjetneje vezan, je veliko adenin in uracil nukleotidov. Prisotnosti proteina SINKRIP v mitohondrijih do sedaj še niso potrdili, so pa jo (Bannai in sod., 2004) v dendritih cerebelarnih Purkinjejevih celic in drugih nevronov možganske skorje ter somah hipokampusnih nevronov podgane.



Slika 8: SINKRIP je prisoten v granulah mRNA. **(a)** SINKRIP v granulah mRNA (glave puščic) **(b)** Prenos proteina SINKRIP skupaj z granulami mRNA iz some v dendrite nevronov glede na časoven potek (prilagojeno po Bannai in sod., 2004: 4)

SINKRIP je eden izmed dejavnikov, ki pozitivno uravnavajo sintezo RNA mišjega virusa hepatitisa (*angl.* "mouse hepatitis virus"). Veže se na 3' in 5' konec virusne RNA z receptorjem za poglobitni histokompatibilnostni kompleks (Choi in sod., 2004).

2. 1.5. PRENOS mRNA V DENDRITE NEVRONOV

2. 1.5.1 mRNA

Biokemično sintezo proteinov imenujemo translacija, zapis za sintezo pa nosijo nukleotidi⁴ na obveščevalni ribonukleinski kislini (mRNA). Zaporedje nukleotidov, ki je zapisano na mRNA, se na ribosomih prevede v zaporedje aminokislin (AK), ki gradijo proteine. Obveščevalna mRNA ima tri dele: 5' konec z nukleotidi za vezavo na ribosome, osrednji del z nukleotidi, ki kodirajo zaporedje za AK, ter 3' konec, ki uravnava in od katerega je odvisna obstojnost mRNA. Nukleotidi se držijo skupaj po tri, urejeni so v triplete, imenovane kodoni (Pollard in Earnshaw, 2004). Nukleotidi so podobni kakor v DNA: adenin (A), citozin (C), guanin (G). Namesto timina (T) je v mRNA prisoten uracil (U) (Nelson in Cox, 2005).

Obdelava mRNA pred prenosom do ribosomov pri evkariontih je zelo zahtevna in se razlikuje od prokariotskega. V nadaljevanju je opisan primer evkariontov. mRNA se najprej sintetizira v jedru. Po prepisovanju (transkripciji), dobimo pre-mRNA, ki se dodatno obdela v jedru. Na 5' koncu se doda metilguanozin kapa, da se mRNA stabilizira za prenos do ribosomov v citoplazmi ter za lažjo vezavo na ribosome. Na 3' koncu mRNA se doda poli-A-rep. Poli-A-rep vpliva na potek translacije in poveča obstojnost mRNA (Cooper in Hausman, 2004). mRNA je sestavljena iz AK kodirajočih in AK nekodirajočih sekvenc nukleotidov. Deli, ki imajo zapis za AK so eksoni, tisti ki jih nimajo, pa introni. Introni se med procesiranjem mRNA izrežejo. mRNA v citoplazmi niso zelo obstojne in preživijo od nekaj minut do nekaj dni (Pollard in Earnshaw, 2004).

Po prepisovanju gena za SIT 7 nastane okoli 20 spojivnih oblik mRNA SIT 7. Gen je na 11. kromosomu q12.2, njegova sekvenca nukleotidov je velika okoli 114 kb (Sugita in sod., 2001). Primer sekvence za mRNA SIT 7 je: mRNA SIT 7 = 5' - CCG AGU CUG GCG UGC CCA CCG UCU CCA AGG AGU UCU UGU AGC GUU - 3' (Glavan in sod., 2012) Večina genov za SIT ima okoli 14 eksonov (Gauthier in sod., 2007). Metoda za prenos northern je pokazala, da je mRNA SIT 7 velika približno 4,4 do 7,5 kb (Marqueze in sod., 2000) protein SIT 7 pa 45 kDa (Osborne in sod., 2007).

⁴ **Nukleotid** je spojina, sestavljena iz org. dušikove baze (pirimidinska ali purinska baza), ogljikovega hidrata (pentoza) in fosfatne skupine (Strgar, 2002).

2. 1.5.2 Prenos granul mRNA v nevronih

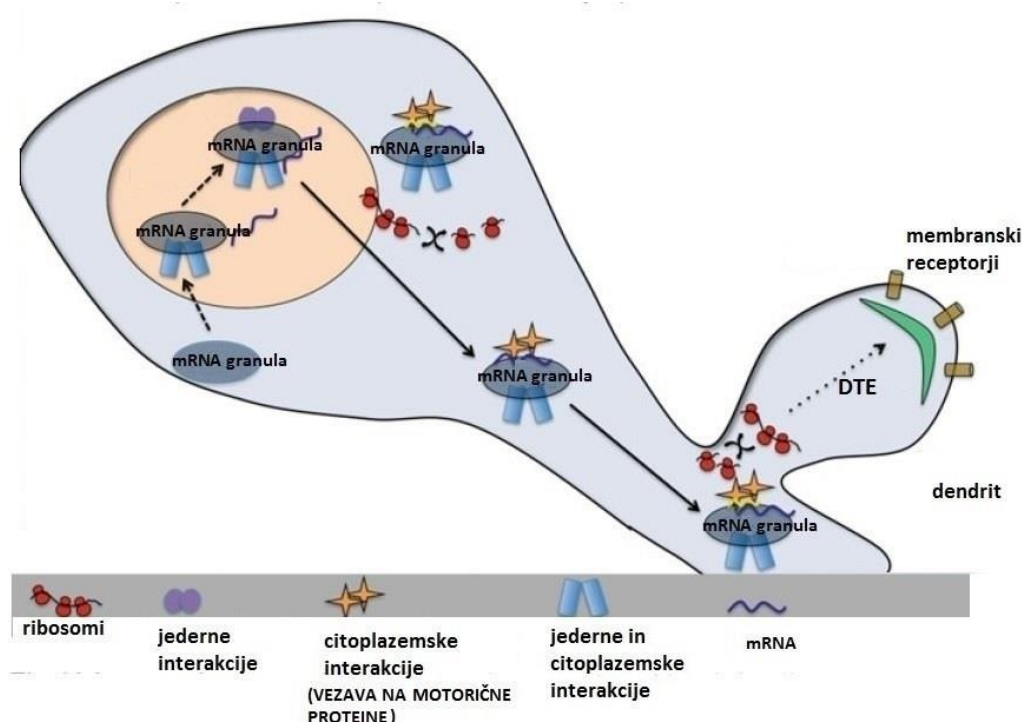
Največje koncentracije mRNA so v dendritih celice. Tam se celo sintetizirajo nekateri proteini in so tako podaljšek some nevrona (Kandel in sod., 2000). mRNA se prenašajo iz some v dendrite predvsem v obliki granul mRNA. Granule mRNA so velike od 100 do 700 nm (Batish in sod., 2012). Vsebujejo okoli 42 proteinov, od katerih je bolje opisanih le 12 (Hirokawa, 2006). Večinoma so ti proteini ribosomi in drugi elementi translacijskega aparata ter razni RNA-vezavni proteini (Anderson in Kedersha, 2006). Vloga vezavnih proteinov RNA, kot je SINKRIP, je stabilizacija molekul mRNA (Bannai in sod., 2004), imajo pa tudi druge pomembne vloge pri prenosu granul mRNA.

Prenos granul mRNA in drugega sinaptičnega tovora je v kar največji meri odvisen od dveh tipov citoskeleta, aktinskih filamentov in mikrotubulov. Mikrotubuli so polimeri α in β tubulinskih dimernih molekul in imajo premer okoli 25 nm. Aktinski filamentni so zgrajeni iz tubulinskih monomernih molekul, dolgih okoli 8 nm, in imajo v začetku aksona predvsem vlogo selektivne pregrade za prenos granul mRNA ter vzdržujejo polarnost nevrona (vzdržujejo stabilnost kanalčkov za natrijeve ione). Mikrotubuli so polarni, imajo plus in minus konec. Polarnost citoskeleta je ključna pri prenosu in potovanju granul mRNA na pravo mesto. Tako mikrotubuli kot aktinski filamentni so izredno dinamične strukture, kar igra ključno vlogo pri sinaptični plastičnosti in samem razvoju nevronov. Dinamičnost (odvzemanje in dodajanje dimernih molekul tubulina) mikrotubulov se dogaja na plus koncu, na katerem se tudi prenaša največ granul mRNA. Oba citoskeletna elementa sta prisotna tako v somi kot v aksonih in dendritih nevronov (Kreutz in Sala, 2012).

Granule mRNA po mikrotubulih prenašata motorična proteina kinezin in dinein. Pri miših in ljudeh obstaja kar 45 vrst kinezina, ki so del večje družine motoričnih proteinov kinezina (KIF, *angl.* "kinesin superfamily"). KIF1A in KIF1B β sta tista, ki prenašata sinaptične vezikle s sinaptotagminom. Sam način, kako prenos točno poteka, še ni dobro znan. Pri prenosu granul mRNA sodeluje tudi motorični protein miozin, ki prenaša granule mRNA po aktinskih filamentih (Hirokawa, 2006). V aksonu dinein običajno prenaša granule mRNA proti somi nevrona, medtem ko jih kinezin prenaša proti sinapsi. V dendritih je prenos kompleksnejši, oba lahko prenašata granule v obe smeri, odvisno od orientacije mikrotubula, na katerega sta pritrjena. V primeru trnov na dendritih je kot motorični protein vključen miozin (Kreutz in Sala, 2012). Molekule mRNA se na motorične proteine vežejo na točno določen način. Vežejo se na molekule ribonukleoproteinov, natančneje na RNA-vezavne proteine (RNP, *angl.* "trans-acting RNA-binding proteins"). Šele RNP potem vežejo mRNA na motorične proteine ter nadalje omogočajo prenos v dendrite. Obstaja več vrst RNP, med njimi tudi protein sindroma lomljivega kromosoma X (FMRP, *angl.* "fragile X mental retardation protein"). Če pride do nepravilnosti nadzora translacije in do vezave mRNA na FMRP, pride do sindroma lomljivega kromosoma X (FXS, *angl.* "fragile X syndrome"), avtizma, težav s kognicijo, ... (Kreutz in Sala, 2012).

Pred kratkim so ugotovili (Jansen in sod., 2014), da obstaja povezava med prenosom molekul mRNA in membranami celičnih organelov. RNA-vezavni proteini prepoznajo ukrivljenost membrane. Dokazali so, da je od mikrotubulov odvisni prenos granul mRNA povezan z endoplazmatskim retikulumom (ER) in endosomi (Jansen in sod., 2014).

Za prenos v samih dendritih so odgovorni dendritični tarčni elementi (DTE, *angl.* "dendritic targeting elements"). Dokazano je, da granule mRNA prepoznajo in se vežejo na točno določene DTE in so tako pomemben faktor pri prenosu granul mRNA v dendritih (Kreutz in Sala, 2012). Za prepoznavo DTE elementov so pomembni RNA-vezavni proteini v granulah (Jansen in sod., 2014). Molekule mRNA, ki se vežejo na enake DTE, se ne združujejo v iste granule mRNA. Vedno se prenaša le ena molekula mRNA (Batish in sod., 2012).



Slika 9: mRNA se v dendrite prenaša s pomočjo granul mRNA (prilagojeno po Kreutz in Sala, 2012: 528)

Katere molekule mRNA se prenašajo na ta način in katere so pomembne za sintezo proteinov v možganih (ključnih za spremembe sinaptičnega delovanja) ni dobro znano. PCR (*angl.* "Polymerase Chain Reaction") tehnika je pokazala več kot 400 različnih mRNA, vendar so prisotne v različnih koncentracijah in so različno pomembne (Kreutz in Sala, 2012).

Porušenje homeostaze v živčnih celicah vodi v nastanek nevrodegenerativnih bolezni (huntingtonova, alzheimerjeva, creutzfeldt-jacobova bolezen, bolezen motoričnih nevronov, lizosomalne bolezni shranjevanja (*angl.* "lysosomal storage disease") in druge). Zaradi degeneracije ali slabega delovanja sinaps pri pojavu teh bolezni sklepajo (Wishart in sod., 2006), da gre pri vseh za isti celični in molekularni mehanizem - osredotočen na sinapse -

nastanka bolezni. Število sinaps se zmanjša, poslabša se njihovo delovanje v živčnih celicah različnih delov možganov. Zakaj so ravno sinapse tako občutljive, še ni znano, vendar njihovo občutljivost na degenerativne dražljaje potrjujejo spremembe celičnih značilnosti in molekularnih poti vezanih na pojav in delovanje sinaps oz. njihovih delov (*angl.* "synaptic compartments"). Z aktivacijo antiapoptotičnih poti v sinapsah nevronov in celic glije s pomočjo nevrotrofičnih faktorjev se degeneracija sinaps zmanjša, kar kaže, da je najverjetnejši mehanizem degeneracije apoptoza (*angl.* "synapoptosis pathway"). Tudi drugih molekularnih poti v sinapsah ne gre zanemariti, npr. nekroze in poti, odvisne od ubikvitina.

Za nastajanje novih ter delovanje že obstoječih sinaps je pomemben prepis nekaterih molekul mRNA za proteine, ki so sestavni del sinaps (Czaplinski, 2014), to so med drugim receptorji za neurotransmitterje in napetostno odvisni kanalčki (Hanus in sod., 2014). Za plastičnost sinapse so pomembne naslednje mRNA:

- mRNA, ki kodirajo presinaptične membranske receptorje AMPA (alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionic kislinske glutamate receptorje) (Kreutz in Sala, 2012) ter druge mRNA, ki kodirajo receptorske proteine (glicin, glutamat, inozitol 1,4,5-trifosfat receptor 1 (IP3R1)) (Bannai in sod., 2004).
- mRNA, ki kodirajo kinaze (Ca²⁺/CaM1 kinazo II (CaMKII)) (Bannai in sod., 2004).
- mRNA družin proteinov Shank (1–3) in SAPAP (1–4), kajti vplivajo na postsinaptično gostoto (*angl.* "postsynaptic density") (Kreutz in Sala, 2012). Tako imenujemo večje signalizacijske objekte (*angl.* "signaling machines") v postsinaptičnih celicah, ki nadzorujejo moč sinaptične povezave. Na te signalizacijske objekte so vezani receptorji. Postsinaptična gostota je odvisna od mRNA molekul. mRNA vplivajo na moč sinaptične povezave, prispevajo k obdelovanju informacij in sodelujejo pri ustvarjanju spomina (Kennedy, 2000).
- mRNA Jacob proteina, katerega produkt vpliva na transkripcijo mRNA v postsinaptični celici in posledično zmanjša sinaptično povezavo med dvema celicama (Kreutz in Sala, 2012).
- mRNA za proteine citoskeleta. To je npr. MAP2 mRNA (Bannai in sod., 2004). Raziskave so pokazale, da je okoli 100 MAP2 mRNA molekul na nevron (Batish in sod., 2012). Tudi Arc (*angl.* "activity-regulated cytoskeleton associated protein") mRNA kodira proteine citoskeleta (Bannai in sod., 2004). 3.1/Arc mRNA se je pri miših sintetizirala že nekaj ur po učenju, kar pomeni, da je ključna za vzpostavljanje novih sinaptičnih povezav (Montag-Sallaz in Montag, 2003).

Cona translacije teh molekul mRNA je v dendritih, v t.i. coni rasti nevrona. To področje in molekule mRNA (njihova prisotnost, koncentracija) v njem se spreminjajo med razvojem organizma in tudi če pride do patoloških sprememb. mRNA v tej coni vplivajo na moč sinaptične povezave med dvema nevronoma (Crino in Eberwine, 1996). mRNA je izredno pomembna tudi na drugih področjih. Pri oocitah žabe krempličarke (*Xenopus*) mRNA določa sam potek razvoja embria. Pri prenosu mRNA v tem primeru sodelujeta citoplazemski razdelek imenovan mitohondrijski oblak in endoplazmatski retikulum (Schnapp in sod., 1997).

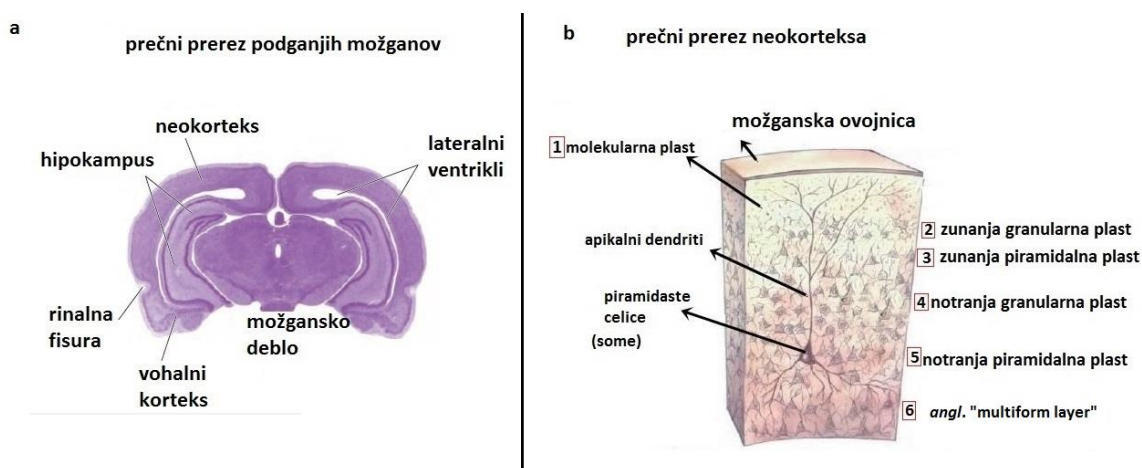
mRNA se prenašajo tudi z zunajceličnimi vezikli (EV). EV so veliki od 30 do 1000 nm, nastajajo v nevronih, oligodendrocitih, astrocitih in mikrogliji. EV nastanejo z eksocitozo in endocitozo znotraj t.i. multivezikularnih teles v celici in se prenašajo od ene do druge živčne celice. Tudi EV imajo vlogo pri komunikaciji med nevroni in nove raziskave (Candelario in Steindler, 2014) kažejo, da se mRNA, ki so med drugim tudi vpletene v nevrodegenerativne bolezni, lahko prenašajo s pomočjo teh veziklov. Treba je poudariti, da ne gre za prenos teh mRNA v dendrite, kakor pri granulah mRNA. Razumevanje vloge prenosa mRNA z EV bi prav tako veliko pripomoglo k razvoju raznih molekularnih in bioloških terapij.

2. 1.6 ANATOMSKA PODROČJA PODGANJIH MOŽGANOV

2. 1.6.1 Možganska skorja

Glede na celično strukturo so znani trije glavni tipi možganske skorje, prikazani na sl. 10a. Prvi tip je hipokampus, zvita struktura na sredi lateralnega ventrikla. Zaradi svoje značilne oblike je ime dobil iz grške besede, ki pomeni morski konjiček. Spredaj in ob strani hipokampusa je drugi tip možganske skorje, imenovan vohalni korteks. Tako ime je dobil, ker je povezan z vohalnim bulbusom. Tretji in prevladujoči tip skorje je neokorteks. Vohalni korteks od neokorteksa loči struktura, imenovana rinalna fisura (Bear in sod., 2006).

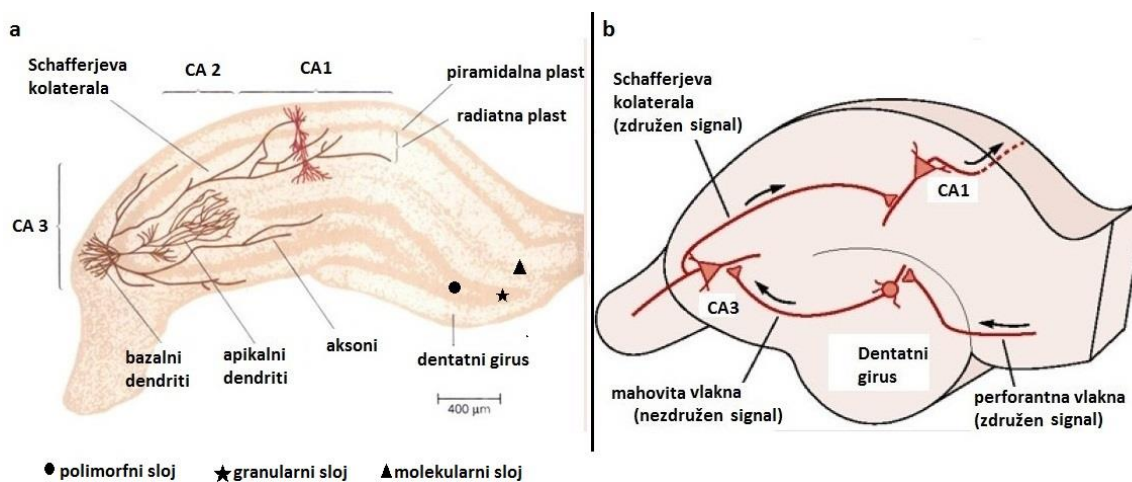
Neokorteks (v nadaljevanju skorja velikih možganov) je večplasten, kar je prikazano na sl. 10a. Some nevronov v skorji velikih možganov so vedno urejene v plasteh. Plast najbližje lobanji in prva pod možgansko ovojnico je imenovana molekularna plast ali preprosto plast 1 (Bear in sod., 2006). Sledijo ji zunanja granularna (2) in piramidalna (3) plast, ter notranja granularna (4) in piramidalna (5) plast. Pod temi je še šesta t.i. multiformna plast (*angl.* "multiform layer"). Zgradba skorje velikih možganov je prikazana na sl. 10b (Brodal, 2010). Piramidalna plast vsebuje piramidaste nevrone z dendriti, ki so veliki in jih imenujemo tudi apikalni dendriti. Ti dendriti segajo do plasti 1 in se tam razvejajo. V plasteh 2 in 4 so granularne celice, v plasteh 1, 2, 3 pa so prisotni dendriti piramidastih nevronov, s somami v nižjih plasteh. V plasteh 2 in 3 poteka ključni del procesiranja dražljajev (Bear in sod., 2006).



Slika 10: Možganska skorja. (a) Trije glavni tipi možganske skorje (prilagojeno po Bear in sod., 2006: 197) (b) Plasti skorje velikih možganov / neokorteksa (prilagojeno po Bear in sod., 2006: 196; Brodal, 2010: 468)

2. 1.6.2 Hipokampus

Struktura hipokampusa je plastovita. Some piramidalnih nevronov so močno nakopičene v piramidalni plasti (*lat.* "striatum pyramidale"), radiatna plast (*lat.* "striatum radiatum") pa je tam, kjer so aksoni in dendriti piramidalnih nevronov. Glede na velikosti piramidalnih nevronov, njihove povezave ter razvejanost dendritov delimo piramidalno plast hipokampusa v tri različna področja: CA1, CA2, CA3. Dendriti piramidalnih nevronov v CA3 področju tvorijo sinapse z dendriti piramidalnih nevronov v CA1 področju. Ti področji sta večji, CA2 je manjše. Piramidalni hipokampusni nevroni so izredno pomembni pri tvorbi spomina. Aksoni teh nevronov, ki izraščajo na vsaki strani some, tvorijo apikalno in bazalno vejo (Kandel in sod., 2000). V dentatnem girusu so prisotne granularne celice, njihovi aksoni se imenujejo mahovita (*angl.* "mossy") vlakna (Gutierrez, 2003). Celotna zgradba je prikazana na sl. 11a (Kandel in sod., 2000). Potovanje informacije v obliki akcijskega potenciala je prikazano na sl. 11b. Najprej pride po večih perforantnih vlaknih vzbujenje oz. signal in se združi na poti do posameznih celic dentatnega girusa (združen signal). Te vzburiijo več aksonov mahovitih vlaken. Mahovita vlakna pa vodijo do posameznih piramidalnih nevronov CA3 področja hipokampusa (nezdružen signal). Po Schafferjevi kolaterali se na poti od CA3 do CA1 področja signal spet združi in tako pride do piramidalnih nevronov v CA1 (Kandel in sod., 2000).



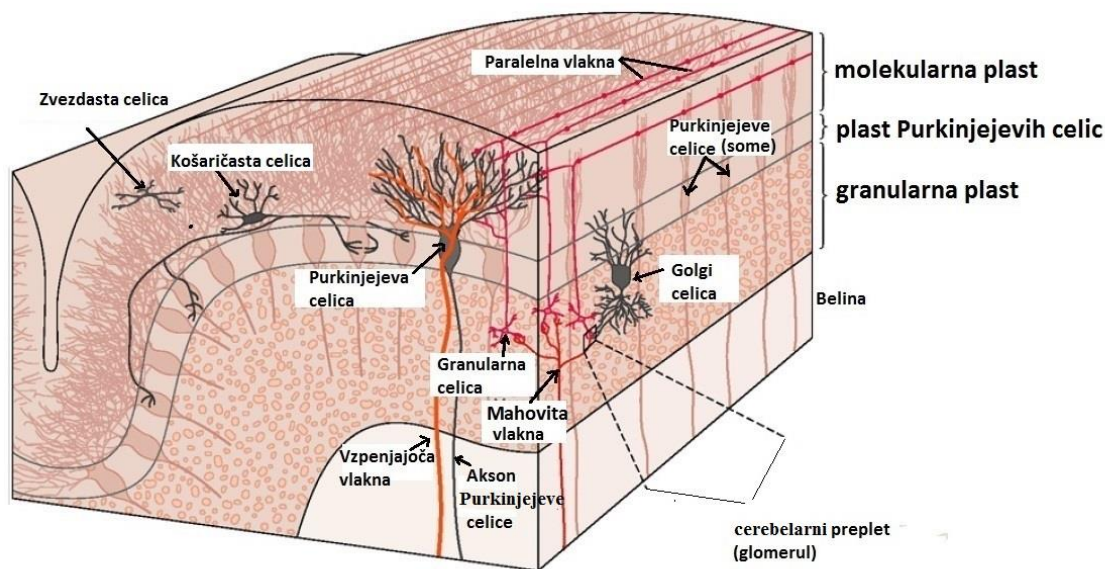
Slika 11: Hipokampus. (a) Zgradba hipokampusa (prilagojeno po Kandel in sod., 2000: 78)

(b) Potovanje signala (prilagojeno po Kandel in sod., 2000:1050)

Hipokampus sodeluje pri spominu, predvsem pretvorbi kratkoročnega spomina v dolgoročnega. Udeležen je tudi pri prostorskem spominu. Če pride do poškodbe hipokampusa, oseba ne more tvoriti novih spominov, stari spomini pa vseeno ostanejo. Zanimivo je tudi, da hipokampus regulira stresni odziv organizma, dokazali so vpliv nanj pri različnih travmatičnih izkušnjah. Glukokortikoidni receptorji hipokampusa se odzovejo na kronično povišano koncentracijo kortizola in hipokampusni nevroni odmrejo (Kandel in sod., 2000).

2. 1.6.3 Mali možgani

Mali možgani so zgrajeni iz treh večjih delov, prikazanih na sl. 12. Prvi del je zunanji ovoj cerebelarnega korteksa, imenovan sivina in ga sestavljajo molekularna plast, plast Purkinjejevih celic in granularna plast. Je zguban in zato tvori značilne strukture tako imenovanih lističev. Pod sivino je drugi del malih možganov, belina. Tretji del so jedra v notranjosti. Najbolj zunanja plast sivine je molekularna plast in je iz som dveh tipov celic: zvezdastih in košaričastih internevrnalnih celic. Ta plast vsebuje tudi aksone granularnih celic in dendrite Purkinjejevih celic. Aksoni granularnih celic potekajo vzporedno z dolgo osjo lističev in jih tako imenujemo tudi paralelna (vzporedna) vlakna. Pod molekularno plastjo ležijo v eni sami plasti some Purkinjejevih celic. Purkinjejeve celice izločajo neurotransmitter GABA, prvič so bile opisane že leta 1837 (Bear in sod., 2006). Iz njihovih som segajo navzgor v molekularno plast razvejani dendriti (*angl.* "fanlike dendritic arborization") (Kandel in sod., 2000). Aksoni Purkinjejevih celic segajo navzdol v belino. Notranja plast sivine malih možganov je granularna. Je iz mnogih granularnih celic, ocenjujejo, da okoli 10^{11} . Ime so dobile zaradi tega, ker so majhne in imajo kompaktna jedra. V tej plasti je še nekaj večjih Golgijevih internevrnalnih celic. Te tvorijo z mahovitimi vlakni cerebelarne preplete (glomerule). Po mahovitih in vzpenjajočih vlaknih informacije prihajajo v male možgane (Kandel in sod., 2000).

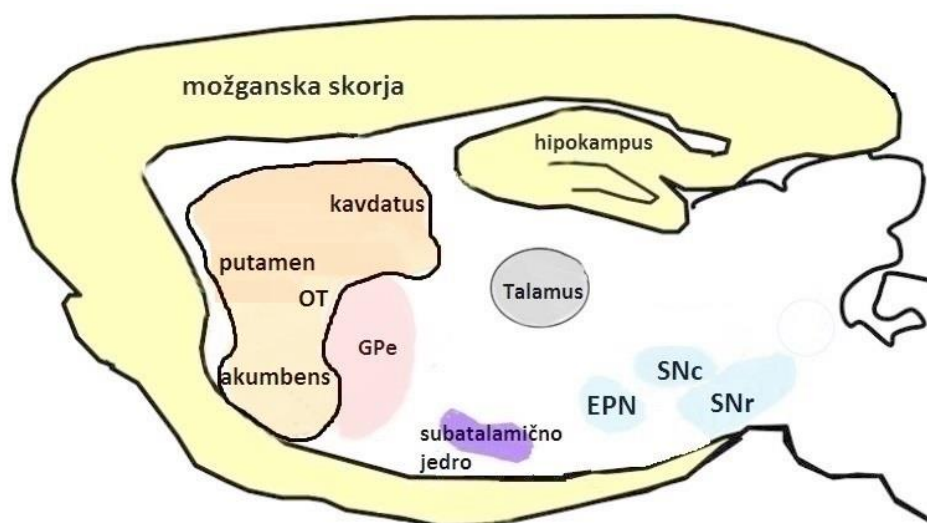


Slika 12: Zgradba malih možganov (prilagojeno po Kandel in sod., 2000: 715)

V malih možganih pride do obdelovanja podatkov, posledica tega so želeni gibi. Če se zgodi poškodba malih možganov, pride do neusklajenega in nerodnega gibanja (Bear in sod., 2006). Do malih možganov pride 40-krat več informacij, kakor jih zapusti. Čeprav zavzemajo le 10 odstotkov volumna, je v malih možganih kar 50 odstotkov vseh nevronov možganov (Kandel in sod., 2000).

2. 1.6.4 Striatum in druga subkortikalna jedra bazalnih jeder

Striatum je eno od subkortikalnih jeder bazalnih jeder. V kaudalnem delu je sestavljen iz kaudatusa ter putamna, v ventralnem pa iz akumbensa in olfaktornega tuberkula. Striatum je medsebojno kompleksno povezan z drugimi subkortikalnimi jedri bazalnih jeder. Ti so palidum, subtalamično jedro ter črno jedro (Albin in sod., 1989). Palidum gradita dva segmenta, eksterni in interni del paliduma. Podgane so brez internega paliduma, imajo pa temu jedru analogno strukturo, imenovano entopedunkularno jedro. Črno jedro je tudi sestavljeno iz dveh delov: kompaktni in retikulatni del (Brodal, 2010; Gerfen in Surmeier, 2011).



Slika 13: Vzdolžni prerez podganjih možganov, bazalna jedra: **striatum** (kaudatus, putamen, akumbens, OT oz. olfaktorni tuberkul), **GPe** (eksterni palidum, *angl.* "globus pallidus external"), **EPN** (entopedunkularno jedro, *angl.* "entopeduncular nuclei"), **SNc** (kompaktni del črnega jadra, *angl.* "substantia nigra pars compacta"), **SNr** (retikulatni del črnega jadra, *angl.* "substantia nigra pars reticulate") ter **subtalamično jedro** (prilagojeno po David, 2009: 2)

Striatum ima raznoliko strukturo in funkcijo, saj je iz dveh različnih delov, to sta matriks in strije. Matriks se med seboj histokemično razlikuje glede na prisotne DA receptorje. D1 (družina DA receptorjev 1) so povezani z aktivacijo gibov, D2 pa z zaviranjem. Največ informacij pride iz možganske skorje v bazalna jedra ravno preko striatuma, naprej pa nevroni vodijo do paliduma po dveh možnih poteh - posredni poti preko D1 in neposredni poti preko receptorjev D2 (Kandel in sod., 2000). D1 aktivirajo adenilil ciklaze, D2 adenilil ciklaze inhibirajo (Zhang in sod., 2004). Matriks torej vsebuje nevrone posredne in neposredne poti. Nekatere bolezni (parkinsonova, huntingtonova) močno prizadenejo bazalna jedra in zmožnost nadzora gibov. Striatum najbolj sodeluje pri habituaciji (navajanju) in proceduralnem spominu, deluje pa tudi kot stikalo med preklapljanjem enega gibanja v drugega (Bear in sod., 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3. 1.1 EKSPERIMENTALNE ŽIVALI

Naša eksperimentalna žival je bila laboratorijska rjava podgana (*Rattus norvegicus*). V raziskavi kolokalizacije proteinov SIT 7 in SINKRIP smo uporabili možgane treh različnih podgan. Poškodbe in nelagodje živali smo omejili na minimum. Pred začetkom poskusa so bile živali nameščene v klimatiziranem hlevu z 12-urnim umetnim dnevno-nočnim ciklom. Ves čas so imele dostop do hrane in vode. Podgane, ki smo jih uporabili, so tehtale od 250 do 300 gramov. Za izvajanje poskusov na živalih smo dobili dovoljenje Veterinarske uprave Republike Slovenije - za odvzem tkiva (34401-33/2011/3) ter priglasitev za delo na izoliranih organih, tkivih in truplih (34401-7/2011/2). Poskuse smo izvajali na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

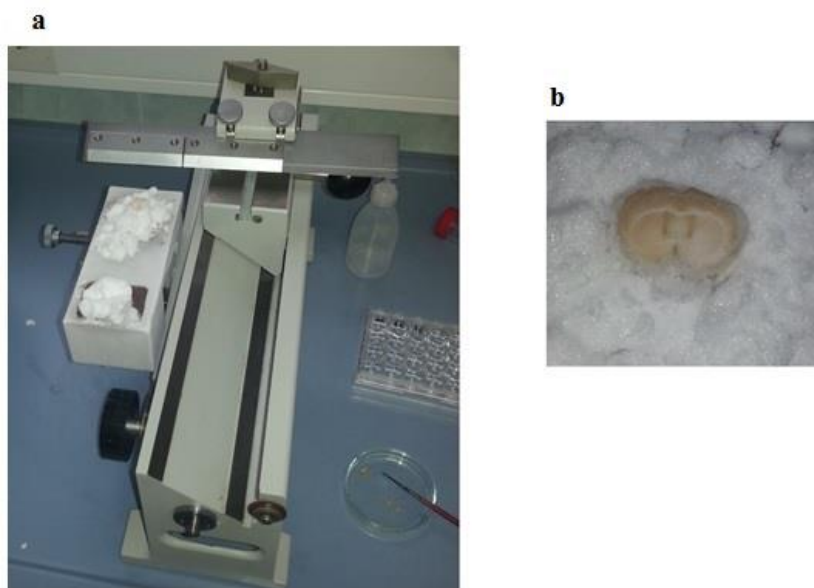
3. 1.2 TRANSKARDIALNA PERFUZIJA

V raziskavi smo uporabili *in situ* fiksirane možgane, zato je bilo potrebno opraviti transkardialno perfuzijo. Anestetik smo inicirali intraperitonealno (skozi trebušno steno). Anestetik je bil pripravljen iz ksilazina (10 mg/kg telesne teže; Chanelle Pharmaceuticals Manufacturing, Galway, Irska), bioketana (75 mg/kg; Vetoquinol Biowert, Gorzow, Poljska) in fiziološke raztopine. Podgano smo položili na hrbet na rešetko. Pod žličko smo pri koži s pomočjo pincete s škarjicami zarezali in prerezali mišice ter spustili srce na prosto. V levi ventrikel smo zarezali in vstavili kanilo, ki smo jo porinili v aorto. Ko je bilo to opravljeno, smo preščipnili s škarjicami desni atrij, da je začel krvaveti. Odprli smo križno tesnilo, da je skozi kanilo začela teči fiziološka raztopina z dodanim heparinom (5000 enot/l, Braun Melsungen AG, Melsungen, Nemčija) in spirali tako dolgo, da je kri odtekla. Sočasno smo spirali krvne strdke iz trebušne in prsne votline. Ko je tkivo pobledelo, smo odprli križno tesnilo, da je skozi kanilo začel teči 4-odstotni paraformaldehid (Sigma) pripravljen v 0,1 natrij-fosfatnem puftru (PBS, pH 7,2) in počakali, da je žival otrdela. Takrat smo živali odstranili *in situ* fiksirane možgane.

3. 1.3 PRIPRAVA PROSTO PLAVAJOČIH MOŽGANSKIH REZIN

Postfiksacija možganov je potekala čez noč pri 4°C. Kot postfiksativ smo uporabili fiksativ z dodano 20-odstotno saharozo (Sigma). Iz postfiksativa smo možgane vzeli naslednji dan ter jih prenesli v 0,1 M PBS, dokler nismo pripravili drsnega mikrokriotoma. Z njim smo narezali možgane na poltanke (20 µm) koronarne možganske rezine od 1,56 mm do -10,32 mm oddaljenosti od bregme. Možgane smo pred rezanjem zamrznili s suhim ledom, rezali pa smo jih s toplim rezilom pri sobni temperaturi. Možganske rezine smo imeli shranjene v 24-prekatni plastični posodici. Rezine so v posodici prosto plavale v krioprotektantu (30-odstotna saharoza (Sigma), 5-odstotni polivinilpirilidon (Sigma), 30-odstotni etilenglikol

(Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) v PBS) pri -20°C . Tako smo pripravili t.i. prosto plavajoče možganske rezine.



Slika 14: Drсни mikrokriotom in zamrznjeni možgani. (a) Drсни mikrokriotom (b) Zamrznjeni možgani

3. 1.4 IMUNOHISTOKEMIČNA LOKALIZACIJA PROTEINOV

Plavajoče možganske rezine smo najprej iz krioprotektanta prenesli v koške znotraj 6-prekatne plastične posodice s kalij-fosfatnim pufom (KPBS, pH 7,3) za 30 minut. Volumen tekočine v enem košku je bil 3,5 mL. Možganske rezine smo nato prenesli v mikrocentrifugirke in jih 30 minut inkubirali v citratnem pufu (pH 8,75) na 80°C , da smo odkrili antigene, ki se zamrežijo med fiksacijo z aldehidi (*angl.* "antigen retrieval"). Ker smo možganske rezine tretirali s citratnim pufom, smo omogočili vezavo primarnih protiteles na specifične antigene. Po odkrivanju antigenov smo možganske rezine prenesli nazaj v koške s KPBS in jih spirali 15 minut. Nato smo možganske rezine inkubirali eno uro v KPBS z 1-odstotnim govejim serumskim albuminom (BSA, Sigma), 0,4-odstotnim triton-X 100 (Sigma) ter 4-odstotnim neimunim serumom (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornija, ZDA). Triton smo dodali za izboljšanje prepustnosti celic v tkivu, BSA za stabiliziranje protiteles, neimun serum (uporabljeni neimuni serumi so navedeni v pregl. 1) pa zato, da smo zmanjšali nespecifično ozadje. Protitelesa v naravnem serumu prekrijejo antigene, da se kasneje nanje ne vežejo biotinizirana sekundarna protitelesa. Po tej enourni inkubaciji z neimunim serumom smo možganske rezine inkubirali s specifičnimi primarnimi protitelesi. Specifična primarna protitelesa smo redčili v KPBS, ki je vseboval 1-odstotni BSA, 0,4-odstotni triton-x 100 ter 1-odstotni neimun serum. Inkubacija je potekala čez noč na 4°C ter dve uri na sobni temperaturi na stresalniku. Možganske rezine smo naslednji dan inkubirali z biotiniziranimi sekundarnimi protitelesi za 90 minut na sobni temperaturi. V pregl. 1 so navedena uporabljena primarna in sekundarna protitelesa ter njihove razredčitve. Da bi

dobili optimalni signal proteinov SIT 7 in SINKRIP, smo uporabili različne razredčitve primarnih protiteles in nato izbrali najbolj optimalno. V pregl. 2 so navedene razredčitve protiteles, ki smo jih uporabili, preden smo dobili optimalne. Možganske rezine smo po inkubaciji s sekundarnimi protitelesi na sobni temperaturi eno uro inkubirali s kompletom ABC (Vectastain elite ABC kit, Vector Laboratories). Ta komplet vsebuje avidin-biotinski kompleks, na katerega je vezanih več peroksidaz, ki vizualizirajo mesta vezave sekundarnih protiteles. Po inkubaciji s kompletom ABC smo možganske rezine inkubirali še z DAB (substratom encima hrenove peroksidaze 3'3-diaminobenzidinom; Aldrich Chemicals, Milwaukee, Wisconsin, ZDA). DAB se po delovanju peroksidaz obarva rjavo. Po imunooznačevanju smo plavajoče možganske rezine pobrali na silanizirana krovna stekla (Starfrost, Waldemar Knittel, Braunschweig, Nemčija) ter jih dehidrirali v naraščajočih koncentracijah alkoholov (50-, 70-, 100-odstotni etanol) in ksilolu. Pokrili smo jih z medijem DePeX (Sigma) za pokrivanje. Vzporedno z možganskimi rezinami, na katere smo vezali primarna protitelesa, smo pripravili tudi negativne imunohistokemične kontrole. Namesto inkubacije možganskih rezin v raztopini primarnih protiteles smo rezine inkubirali samo v raztopini, v kateri smo sicer redčili primarna protitelesa. Ostali postopek je bil enak. Signali negativnih kontrol so bili šibki in nespecifični. Možganskih rezin nismo označevali s protitelesi za oba proteina, temveč posebej za SIT 7 in posebej za SINKRIP. Trajne preparate, ki smo jih naredili, smo po imunohistokemičnem barvanju pregledali s svetlobnim mikroskopom in po optimizaciji še slikali s svetlobnim mikroskopom, povezanim s kamero ter transiluminatorjem.

Preglednica 1: Primarna in sekundarna protitelesa ter neimuni serumi za imunohistokemično dokazovanje proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v možganskih rezinah

	Primarno protitelo	Sekundarno protitelo	Neimun serum
SIT 7	Kunčje poliklonsko protitelo proti proteinu SIT 7 narejeno v kozi (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japonska).	Kozje protitelo, ki prepozna kunčje antigene, konjugirano z biotinom (Vector Laboratories).	Kozji neimun serum (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornija, ZDA).
SINKRIP	Mišje poliklonsko protitelo proti proteinu SINKRIP narejeno v konju (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japonska).	Konjsko protitelo, ki prepozna mišje antigene, konjugirano z biotinom (Vector Laboratories).	Konjski neimun serum (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornija, ZDA).

Preglednica 2: Optimizacija razredčitev primarnih protiteles za imunohistokemično dokazovanje proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v možganskih rezinah in optimalne razredčitve primarnih ter sekundarnih protiteles

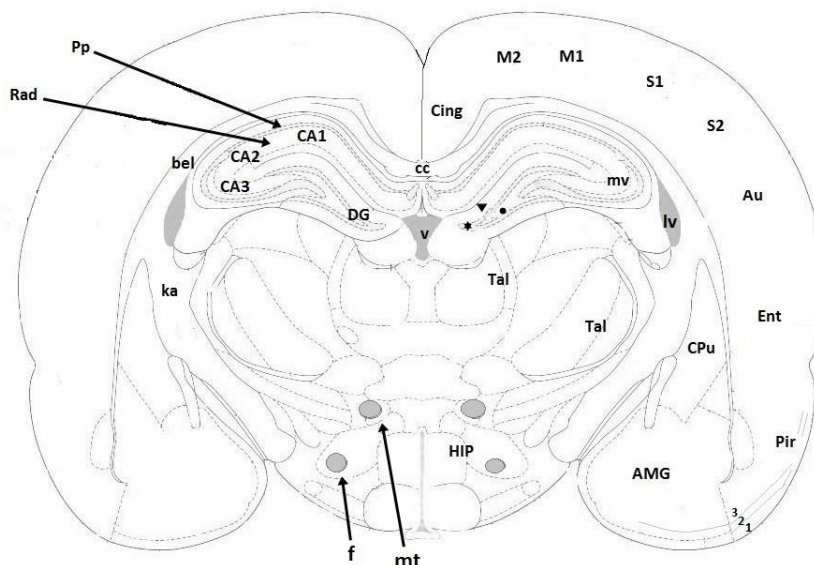
Protitelo	Razredčitve pri optimizaciji	Optimalne razredčitve protiteles
Primarno protitelo za SIT 7	1:500, 1:1000, 1:1500	1:1000
Sekundarno protitelo za SIT 7	1:1500	1:1500
Primarno protitelo za SINKRIP	1: 100, 1:250, 1:500	1:250
Sekundarno protitelo za SINKRIP	1: 500	1:500

3. 1.4.1 Analiza in zajem slike imunohistokemičnih preparatov

Svetlobne razmere ter nastavitve objektiva in zaslonke so bile konstantne pri analizi vseh možganskih rezin. Ob zajemanju slik je program sam opravil zmanjšanje nehomogenosti ozadja svetlobnega vira. Zmanjšal je tudi vplive elektronskega šuma zaradi videokamere in zajemalnika. Možganske rezine vseh treh živali z imunohistokemično označenim SIT 7 in možganske rezine z imunohistokemično označenim proteinom SINKRIP smo najprej dobro pregledali s svetlobnim mikroskopom Olympus IX81.

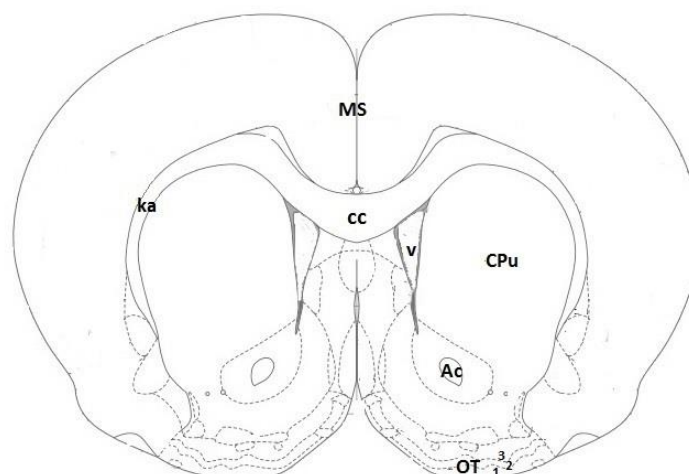
Nato smo možganske rezine, tako rezine z imunohistokemično označenim SIT 7, kot rezine z imunohistokemično označenim proteinom SINKRIP, slikali najprej s transiluminatorjem, povezanim s kamero CoolSNAP. Krovna stekla z možganskimi rezinami smo polagali na negatoskop, ki jih je presvetljeval z difuzno neonsko svetlobo. S programom MCID Elite, ki je digitaliziral signal, smo dobili osem-bitno črno-belo sliko z več odtenki sivine. Na teh slikah so vidne celotne možganske rezine. Prisotnost proteina v možganskih rezinah smo, tako kot pri svetlobnem mikroskopu, določili glede na rjavo obarvanje. Obarvanje je pomenilo prisotnost proteinov SIT 7 in SINKRIP v posameznem anatomskem področju. Zanimala so nas anatomska področja v možganskih rezinah treh različnih oddaljenosti od bregme: -3,24 mm, 1,56 mm in -10,32 mm. Pomagali smo si z Atlasom možganov podgane (Paxinos in Watson, 2007).

V koronarnem prerezu možganov -3,14 mm od bregme (sl. 15) smo analizirali naslednja anatomska področja: hipokampus (področja CA in dentatni girus), skorjo velikih možganov (h kateri štejemo cingulatni korteks, primarni in sekundarni motorični korteks, primarni in sekundarni somatosenzorični korteks, avditorni korteks ter entorinalni korteks), piriformni korteks, amigdaloidna, talamična in hipotalamična jedra, interno kapsulo, belino, kalozni korpus (*lat.* "corpus callosum"), ventrikel in lateralni ventrikel.



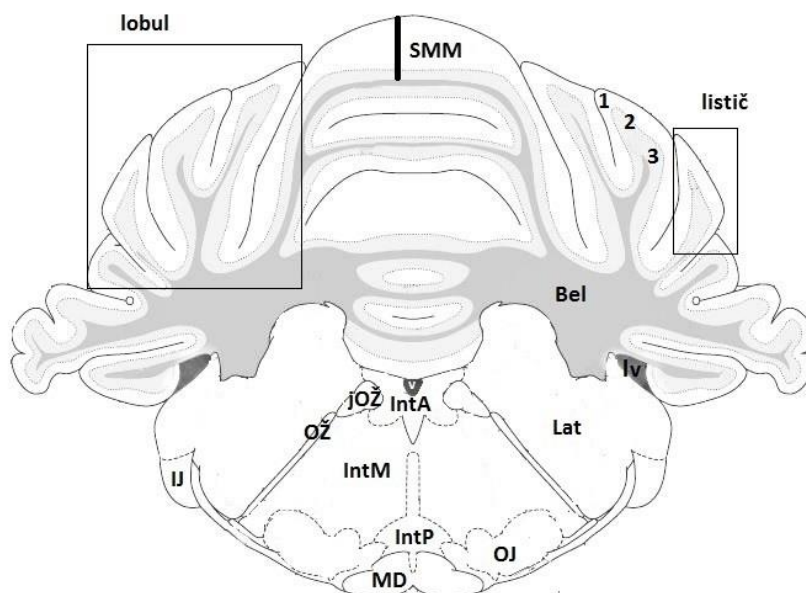
Slika 15: Prikaz anatomskih področij možganov podgane, koronarni prerez možganov -3,24 mm od bregme. Hipokampus: **CA1**, **CA2**, **CA3**, mahovita vlakna (**mv**), radiatna plast (**Rad**), piramidalna plast (**Pp**). Dentatni girus (**DG**): molekularni (**trikotnik**), granularni (**zvezdica**) in polimorfni sloj (**krog**). Skorja velikih možganov - cinguladni korteks (**Cing**), primarni (**M1**) in sekundarni (**M2**) motorični korteks, primarni (**S1**) in sekundarni (**S2**) somatosenzorični korteks, avditorni korteks (**Au**), entorinalni korteks (**Ent**). Piriformni korteks (**Pir** – **1, 2, 3 sloj**). Amigdaloidna jedra (**AMG**). Talamična jedra (**Tal**). Hipotalamična jedra (**HIP**). Belina (**bel**). Interna kapsula (**ka**). Kalozni korpus (**cc**). Forniks (**f**). Mamilotalamični trakt (**mt**). Ventrikel (**v**) in lateralni ventrikel (**lv**) (prilagojeno po Paxinos in Watson, 2007: 62)

V koronarnem prerezu možganov 1,56 mm od bregme (sl. 16) smo analizirali naslednja anatomiska področja: skorjo velikih možganov, striatum (kavdatus in putamen), akumbens, olfaktorni tuberkul striatuma, interno kapsulo, kalozni korpus in lateralni ventrikel.



Slika 16: Prikaz anatomskih področij možganov podgane, koronarni prerez možganov 1,56 mm od bregme. Striatum (**CPu**). Akumbens (**Ac**). Olfaktorni tuberkul striatuma (**OT** – sloj **1, 2, 3**). Kalozni korpus (**cc**). Interna kapsula (**ka**). Lateralni ventrikel (**v**) (prilagojeno po Paxinos in Watson, 2007: 20)

V koronarnem prerezu možganov -10,56 mm od bregme (sl. 17) smo analizirali naslednja anatomska področja: skorjo malih možganov, izvenkortikalna jedra (h katerim štejem interposedna jedra, lateralno cerebelarno jedro, intersticialno celično jedro), olivarno jedro, obrazni živec, jedra obraznega živca, interno kapsulo, belino, ventrikel, lateralni ventrikel in možgansko deblo.



Slika 17: Prikaz anatomskih področij možganov podgane, koronarni presek možganov -10,32 mm od bregme.

Skorja malih možganov, ki tvori lističe, kateri se povezujejo v lobule, iz treh plasti: molekularna (1), tanka plast Purkinjejevih celic (2) ter granularna (3) plast. Pet izvenkortikalnih jeder: interposedno anteriorno (**IntA**), interposedno medialno (**IntM** ali fastigialno), interposedno posteriorno (**IntP** ali globozno), lateralno cerebelarno jedro (**Lat**) ter intersticialno celično jedro (**IJ**). Olivarno jedro (**OJ**). Obrazni živec (**OŽ**) in jedra obraznega živca (**jOŽ**). Možgansko deblo (**MD**). Ventrikel (**v**) in lateralni ventrikel (**lv**) (prilagojeno po Paxinos in Watson, 2007: 119)

Nato smo v teh možganskih rezinah s svetlobnim mikroskopom, povezanim s kamero Olympus DP71 (Olympus Optical), posneli hipokampus, striatum, skorjo velikih možganov in skorjo malih možganov. Naredili smo posnetke pri 10-, 20-, in 40-kratni povečavi mikroskopa. Zajemanje vseh slik je potekalo pri istih svetlobnih pogojih in z enakimi nastavitvami.

3. 1.5 IMUNOFLUORESCENČNA LOKALIZACIJA PROTEINOV

Imunofluorescenčno označevanje antigenov v možganskih rezinah je bilo v začetku enako kot pri postopku imunohistokemije (glej poglavje nazaj). Razlika je bila v uporabljenih sekundarnih protitelesih. Pri imunohistokemičnem označevanju proteinov smo uporabili biotinizirana sekundarna protitelesa, pri imunofluorescenčnem pa sekundarna protitelesa konjugirana s fluorokromi različnih valovnih dolžin (AlexaFluor). V pregl. 3 so označena primarna in sekundarna protitelesa, uporabljena v postopku imunofluorescenčnega označevanja proteinov v možganskih rezinah. Tako kot pri imunohistokemičnem barvanju smo tudi pri imunofluorescenčnem barvanju izvedli optimizacijo razredčitve primarnih protiteles. Razredčitve, ki smo jih uporabili pri optimizaciji, so navedene v pregl. 4, prav tako najbolj optimalne razredčitve. Po inkubaciji možganskih rezin s sekundarnimi protitelesi, smo možganske rezine obarvali z 0,1-odstotno raztopino barvila Sudan Black (Sigma), raztopljenega v 70-odstotnem etanolu. Barvanje je trajalo 5 minut pri sobni temperaturi. Sudan Black barva lipofusceinske granule v možganih in s tem prekrije njihovo avtofluorescenco. Po obarvanju smo možganske rezine pobrali na silanizirana krovna stekla ter jih pokrili s Prolongom z DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Molecular Probes). Prolong z DAPI jedra celic fluorescenčno označi, veže se specifično na kromatin. Pokrivni medij, v katerega je vključen, preprečuje bledenje fluorescenčnega signala.

Pri imunofluorescenčnem označevanju proteinov SIT 7 in SINKRIP v možganskih rezinah smo barvali s protitelesi za oba hkrati. Barvali smo s protitelesi za en protein naenkrat, uporabili smo zaporedno imunofluorescenčno označevanje. To pomeni, da je inkubaciji s prvim primarnim in ustreznim sekundarnim protitelesom sledila inkubacija z drugim primarnim in ustreznim sekundarnim protitelesom. Vrstni red barvanja je bil vedno enak. Najprej smo označili SIT 7, ki mu je sledil SINKRIP.

Sočasno smo delali negativne imunofluorescenčne kontrole. Te so bile pripravljene po istem postopku, razlika je bila v inkubaciji s primarnimi protitelesi. Namesto inkubacije možganskih rezin v raztopini primarnih protiteles, smo kontrolne možganske rezine inkubirali v raztopini, v kateri smo sicer redčili primarna protitelesa. Signali negativnih kontrol so bili šibki in nespecifični.

Preglednica 3: Primarna in sekundarna protitelesa ter neimuni serumi za imunofluorescenčno dokazovanje proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v možganskih rezinah

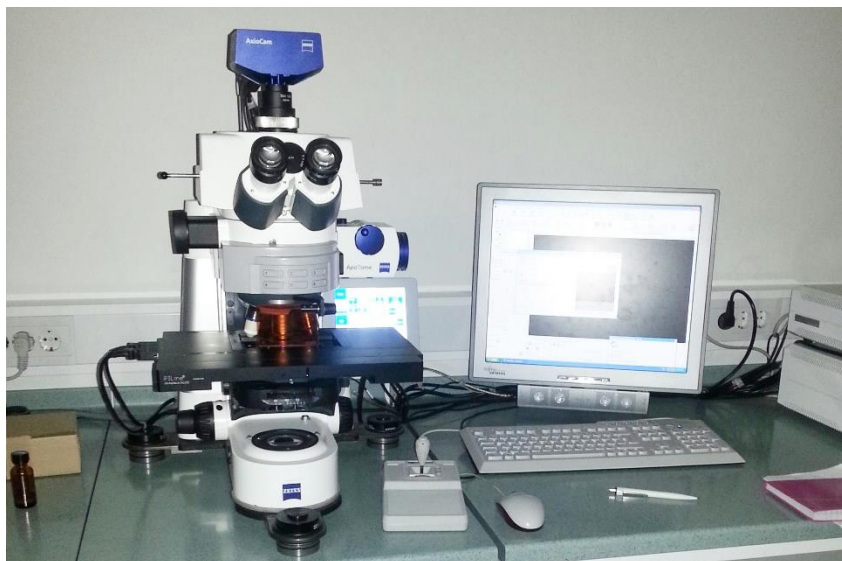
	Primarno protitelo	Sekundarno protitelo	Neimun serum
SIT 7	Kunčje poliklonsko protitelo proti proteinu SIT 7 narejeno v kozi (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japonska).	Kozje protitelo, ki prepozna kunčje antigene, konjugirano z AlexaFluor 488 (Invitrogen, Molecular Probes).	Kozji neimun serum (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornija, ZDA).
SINKRIP	Mišje poliklonsko protitelo proti proteinu SINKRIP narejeno v konju (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japonska).	Konjsko protitelo, ki prepozna mišje antigene, konjugirano z AlexaFluor 555 (Invitrogen, Molecular Probes).	Konjski neimun serum (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornija, ZDA).

Preglednica 4: Optimizacija razredčitev primarnih protiteles za imunofluorescenčno dokazovanje proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v možganskih rezinah in optimalne razredčitve primarnih ter sekundarnih protiteles

Protitelo	Razredčitve pri optimizaciji	Optimalna razredčitev protiteles
Primarno protitelo za SIT 7	1:250, 1:400, 1:750	1:400
Sekundarno protitelo za SIT 7	1:300	1:300
Primarno protitelo za SINKRIP	1:100, 1:300, 1:500	1:300
Sekundarno protitelo za SINKRIP	1:300	1:300

3. 1.5.1 Analiza in zajem slike imunofluorescenčnih preparatov

Slikanje in pregledovanje preparatov imunofluorescenčnih barvanj je potekalo z mikroskopom AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Heidelberg, Nemčija) na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani. S fluorescenčnim mikroskopom z dodatkom ApoTome smo lahko posneli imunofluorescenčni signal v več posameznih optičnih rezinah. Optične rezine, ki smo jih posneli, so bile 240 nm narazen. Slikali smo pri 63-kratni povečavi.



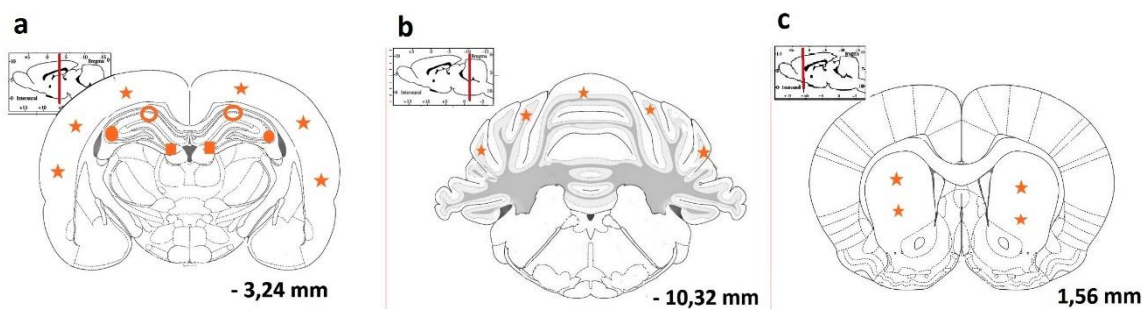
Slika 18: Mikroskop AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani

3. 1.5.2 Analiza kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP

S fluorescenčnim mikroskopom z dodatkom ApoTome smo posneli 10 naključnih mest (pri 63-kratni lastni povečavi) v CA1 in CA3 področju hipokampusa, striatumu in skorji velikih možganov vsake od treh živali ($n=3$). V dentatnem girusu hipokampusa smo posneli 10 naključnih mest pri eni živali ($n=1$), v skorji malih možganov pa 10 naključnih mest v vsakem posameznem delu slike ($n=1$). Vsaka slika je bila sestavljena iz (vsaj) treh optičnih rezin, katerih goriščne ravnine so bile oddaljene 240 nm. Stopnjo kolokalizacije SIT 7 in SINKRIP v posameznem anatomskem področju smo ovrednotili s programom ImageJ z vmesnikom JACoP (*angl.* "Just Another Colocalization Plugin"). Pri skorji malih možganov smo ovrednotili posamezni del slike (molekularni sloj, sloj Purkinjejevih celic in granularni sloj), ki ga imenujemo območje analize (ROI, *angl.* "region of interest"). Purkinjejeve celice smo analizirali z obkroževanjem som. Na vsaki sliki (in pri malih možganih v vsakem območju analize) smo analizirali stopnjo kolokalizacije tako, da smo izračunali vrednosti Pearsonovega koeficienta. Podatke v grafih smo prikazali kot povprečne vrednosti kolokalizacijskih koeficientov \pm SD posameznega področja.

Raziskovalci (Bolte in Cordelieres, 2006) pravijo, da sta lokacija določenega proteina v celici in njegova vloga močno povezani, zato je lokacija izredno pomembna za razumevanje vloge določenega proteina v biološkem procesu. Kolokalizacija je prostorsko sovpadanje lokalizacij dveh ali več različnih proteinov v preparatu (Bolte in Cordelieres, 2006). Kolokalizacijo smo ocenili tako, da smo imunofluorescenčno istočasno označili dva antigena v preparatu s protitelesi označenimi s fluorokromi. Potem smo ugotavljali ali se pojavljata na istem mestu in kolokalizacijo tudi kvantitativno ovrednotili.

Anatomska področja, v katerih smo določali kolokalizacijo, so prikazana na sl. 19, na koronarnih prerezih možganov: hipokampus (CA1, CA3, dentatni girus) in skorja velikih možganov -3,24 mm od bregme (sl. 19a), striatum 1,56 mm od bregme (sl. 19b) ter skorja malih možganov -10,32 mm od bregme (sl. 18c). Pomagali smo si z Atlasom možganov podgane (Paxinos in Watson, 2007).



Slika 19: Shema anatomskih področij, v katerih smo določali kolokalizacijo proteinov. Koronarni prerezi možganov: (a) Hipokampus: CA1 (prazen krog), CA3 (polni krog), dentatni girus (kvadrat) in skorja velikih možganov (zvezdice) -3,24 mm od bregme (b) Mali možgani (zvezdice) -10,36 mm od bregme (c) Striatum (zvezdice) 1,56 mm od bregme (prilagojeno po Paxinos in Watson, 2007)

Glede na naravo in obliko fluorescenčnega signala (kaj analiziramo, kakšno je ozadje oz. šum) smo se odločili za ustrezen pristop k analizi kolokalizacije. Tega smo se lotili tako, da smo najprej izbrali specifične antigene, ki so nas zanimali, in nato izključili nespecifične pojave, ki nastanejo zaradi ozadja. Fluorokromi v preparatu se pojavljajo na nivoju nanometrov, medtem ko je ločljivost optičnega sistema bližje nivoju mikrometra, zato je kvantitativno ovrednotenje kolokalizacije dveh antigenov označenih s fluorokromi odvisno od več dejavnikov (Bolte in Cordelieres, 2006). Med dejavniki, na katere smo pazili zraven optičnega sistema, sta tudi zajemanje slik ter kvaliteta in zanesljivost antigenskih fluorescenčnih označevalcev.

Za označevanje antigenov za SIT 7 smo uporabili fluorokrom AlexaFluor 488, ki fluorescira pri valovni dolžini 488 nm, v zelenem delu barvnega spektra. Fluorokrom AlexaFluor 555 smo uporabili za označevanje antigenov za SINKRIP. Ta fluorokrom fluorescira pri valovni dolžini 555 nm, kar je v rdečem delu barvnega spektra. Vizualizacija fluorokromov je v našem primeru torej potekala v zelenem in rdečem kanalu.

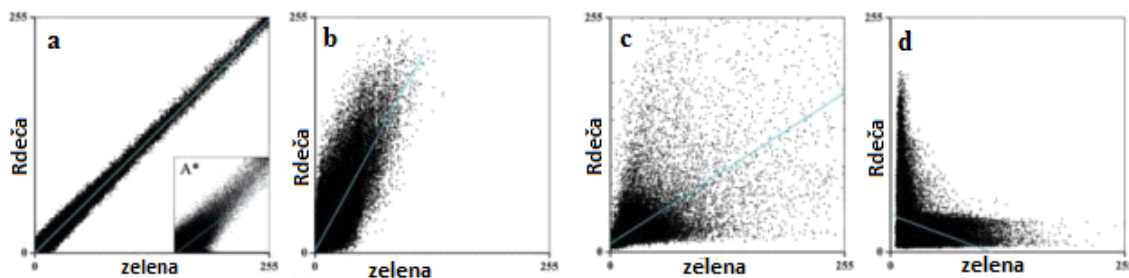
Za kvantificiranje kolokalizacije je najpreprostejša metoda metoda prekrivanja. Gre za to, da pride slika iz vsakega od dveh fluorescenčnih kanalov (rdečega in zelenega) in se obe sliki nato prekrijeta. Rdeča in zelena slikovna točka (*angl.* "pixel") skupaj naredita rumeno. Kolokalizacija je s to metodo določena glede na pojavnost rumenih slikovnih točk. Pojavljanje rumene barve pa je na žalost odvisno od moči fluorescence fluorokromov v kanalih, zato metoda prekrivanja ni vedno primerna. Obseg kolokalizacije je možno podceniti ali preceniti, še posebej, če gre za analizo tkivnih območij z visoko gostoto

antigenskih fluorescenčnih označevalcev, ki se jih zaradi optičnega sistema fluorescenčnega mikroskopa ne da ločiti. Obstajata dva osnovna načina za določanje kolokalizacije v bioloških preparatih (Bolte in Cordelieres, 2006). Prvi način je analiza kolokalizacije, ki temelji na korelacijskih koeficientih moči fluorescenčnega signala, in je uporaben pri slikah posnetih v dveh kanalih. Pri tem načinu gre za statistično analizo povezave med vrednostmi moči zelenega in rdečega fluorescenčnega signala (fluorescenčni signal se pojavlja v obliki slikovnih točk). Največkrat se z njim kvantitativno ovrednoti moč linearnega razmerja med dvema spremenljivkama. Ti spremenljivki sta vrednosti moči sivin fluorescence slikovnih točk v rdečem in zelenem kanalu. Drugi način temelji na iskanju sovpadajočih objektov. To metodo se uporablja za kolokalizacijo celičnih struktur v večji velikosti od ločljivosti optičnega sistema, z njo pa je možno kvantitativno ovrednotiti krivulje moči fluorescence in določiti, katere strukture so prisotne. Mi smo uporabili prvi način, ki temelji na korelacijskih koeficientih moči fluorescenčnega signala iz dveh kanalov, saj nismo kolokalizirali celičnih struktur v večji velikosti, temveč proteine. Obstaja več kolokalizacijskih koeficientov za kvantitativno oceno stopnje kolokalizacije. Vsak kolokalizacijski koeficient ima svoje značilnosti (občutljivost, nanašanje na iskanje prekrivajočih se slikovnih točk v obeh kanalih) in posledično uporabnost. Vsaka slikovna točka pri tem načinu kvantitativnega vrednotenja kolokalizacije je kot del slike in ne del določene celične strukture (Bolte in Cordelieres, 2006).

3. 1.5.2.1 Pearsonov korelacijski koeficient

Pearsonov korelacijski koeficient (PK) je leta 1896 definirjal in zanj napisal formulo matematik Karl Pearson. Za namene fluorescenčne mikroskopije ga je skoraj 100 let kasneje karakteriziral Manders (Dunn in sod., 2011). Fluorogram, razsevni graf moči sivin slikovnih točk dveh izbranih kanalov, prikaže način vrednotenja pojavljanja slikovnih točk iz teh dveh kanalov na istem mestu. Moč sivin slikovnih točk iz enega kanala (npr. A) je prikazana na x osi fluorograma, moč sivin iz drugega (npr. B) pa na y osi (A_i in B_i za posamezno slikovno točko) (Bolte in Cordelieres, 2006).

Fluorogrami različnih tipov kolokalizacije so prikazani na sl. 20. V primeru, da preučevana proteina popolnoma kolokalizirata, nastane fluorogram, kjer točke tvorijo linearno linijo (sl. 20a). Ko je kolokalizacija popolna, vendar moči signalov v obeh kanalih niso enake, točke tvorijo linearno linijo, ki pa je samo pomaknjena k eni izmed osi (sl. 20b). V primeru delnega prekrivanja signalov točke v fluorogramu ne tvorijo popolne linearne linije in so razpršene (sl. 20c). Če se signala v kanalih popolnoma izključujeta, so točke ob oseh fluorograma (sl. 20d).



Slika 20: Fluorogrami različnih tipov kolokalizacije. (a) Popolna kolokalizacija (b) Popolna kolokalizacija z različnimi intenzitetami fluorescence v zelenem in rdečem kanalu (c) Delna kolokalizacija (d) Izključevanje signalov, ni kolokalizacije (prilagojeno po Bolte in Cordelieres, 2006: 10)

Vrednosti PK, ki se izračunajo po formuli (1) (Dunn in sod., 2011), so vedno med -1 in 1. Pri popolni izključitvi signalov je vrednost PK -1, ko ni kolokalizacije 0, pri popolni kolokalizaciji pa 1. V bioloških vzorcih je vrednost 1 mogoča samo, ko podvojimo določeno sliko (Bolte in Cordelieres, 2006).

$$PK = \frac{\sum i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum i (G_i - \bar{G})^2}} \quad \dots (1)$$

R_i v formuli (1) pomeni moč fluorescence v rdečem (*angl.* "red") kanalu, G_i moč fluorescence v zelenem (*angl.* "green") kanalu za povprečno točko v fluorogramu (A_i , B_i). \bar{R} in \bar{G} predstavljata povprečno moč fluorescence v posameznem kanalu (Dunn in sod., 2011).

PK vrednoti pojavljanje slikovnih točk iz dveh kanalov na istem mestu, ni pa zanesljiv način za pravo kvantifikacijo kolokalizacije. Vrednotenje vrednosti PK je lahko težavno zaradi deljenih mnenj raziskovalcev o negativnih vrednostih PK. Pri vrednotenju je mogoče tudi, da pride do zapletov zaradi nespecifičnega ozadja ali prehajanja fluorescenčne emisije (*angl.* "bleedthrough") in neenakomerne razporeditve proteinov v preparatu (Bolte in Cordelieres, 2006).

4 REZULTATI

4.1.1 LOKACIJA PROTEINOV SINAPTOTAGMIN 7 IN SINKRIP

V možganskih rezinah intaktnih možganov podgane smo z imunohistokemičnim označevanjem proteinov SIT 7 in SINKRIP s specifičnimi protitelesi analizirali lokalizacijo teh dveh proteinov v anatomskih področjih možganov v treh različnih oddaljenostih od bregme: 1,56 mm, -3,24 mm ter -10,56 mm, ter zajeli vsa prisotna anatomsko področja. Prisotnost proteinov smo določevali glede na prisotnost obarvanja. Protitelesa, konjugirana z biotinom, obarvajo protein-pozitivna mesta rjavo.

4.1.1.1 Protein sinaptotagmin 7 je prisoten v večini anatomskih področij

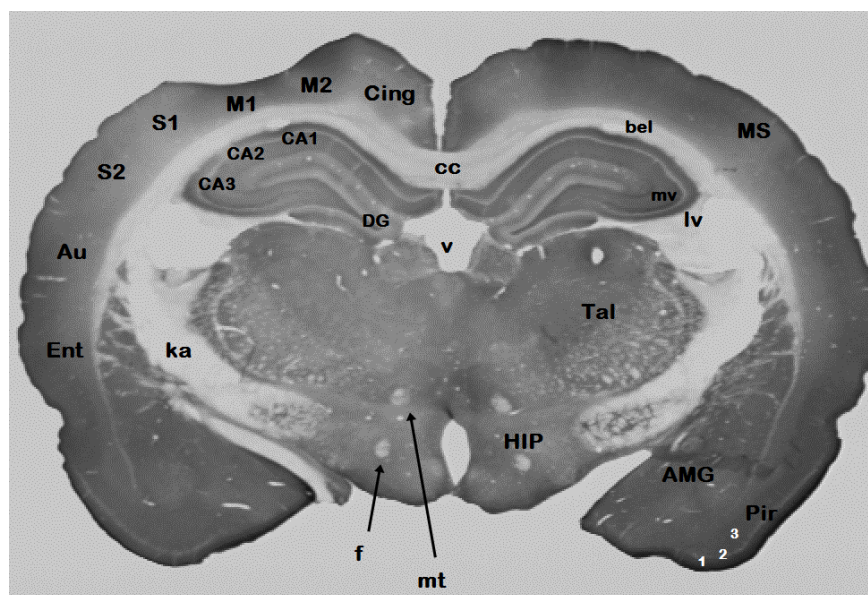
Z imunohistokemičnim označevanjem SIT 7 s kozjimi protitelesi, ki prepoznajo kunčje antigene in so konjugirana z biotinom, so se SIT 7-pozitivna mesta obarvala rjavo. Ugotavljali smo, ali se SIT 7 pojavlja v možganih podgane in v katerih anatomskih področjih je prisoten.

Na sl. 21 je vidno, da je signal za SIT 7 prisoten v večini anatomskih področij v koronarnem prerezu možganov -3,24 mm od bregme; močno je prisoten v naslednjih področjih: v hipokampusu (v CA1, CA3, dentatnem girusu ter izrazito močno v mahovitih vlaknih), skorji velikih možganov, piriformnem korteksu (v vseh treh slojih, najmočneje se je obarval sloj 2), amigdaloidnih, talamičnih in hipotalamičnih jedrih. Slabo je signal za SIT 7 zaznaven v belini, kaloznem korpusu, interni kapsuli, forniksi, mamilotalamičnem traktu, ventriklu in lateralnem ventriklu te možganske rezine. Skorja velikih možganov se je obarvala enakomerno v vseh predelih: v cingulatnem korteksu, v primarnem in sekundarnem motoričnem korteksu, primarnem in sekundarnem somatosenzoričnem korteksu, avditornem korteksu, entorinalnem korteksu.

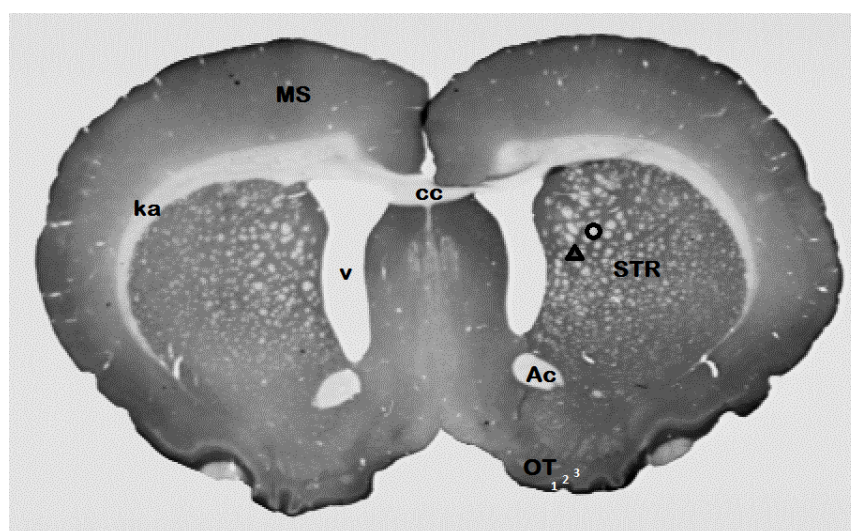
Na sl. 22 je vidno, da je signal za SIT 7 prisoten v večini anatomskih področij v koronarnem prerezu možganov 1,56 mm od bregme; močno v naslednjih področjih: v možganski skorji, striatumu ter olfaktornem tuberkulu striatuma. Slabo je signal za SIT 7 zaznaven v kaloznem korpusu, interni kapsuli in ventriklu. Skorja velikih možganov se je obarvala enakomerno po plasteh v vseh predelih. Močno se je obarval striatum v predelu matriksa, ne pa v predelu strij. V olfaktornem tuberkulu je signal močen predvsem v plasti 1 in 3, manj v plasti 2. Akumbens se je zelo šibko obarval.

Na sl. 23 je vidno, da je signal za SIT 7 prisoten v večini anatomskih področij v koronarnem prerezu možganov -10,32 mm od bregme; močno v naslednjih področjih: v izvenkortikalnih jedrih (interposednih jedrih, lateralnem cerebelarnem jedru, intersticijskem celičnem jedru), olivarnem jedru in skorji malih možganov. V belini, ventriklu in lateralnem ventriklu, obraznem živcu, jedrih obraznega živca in možganskem deblu signala skoraj ni. V skorji

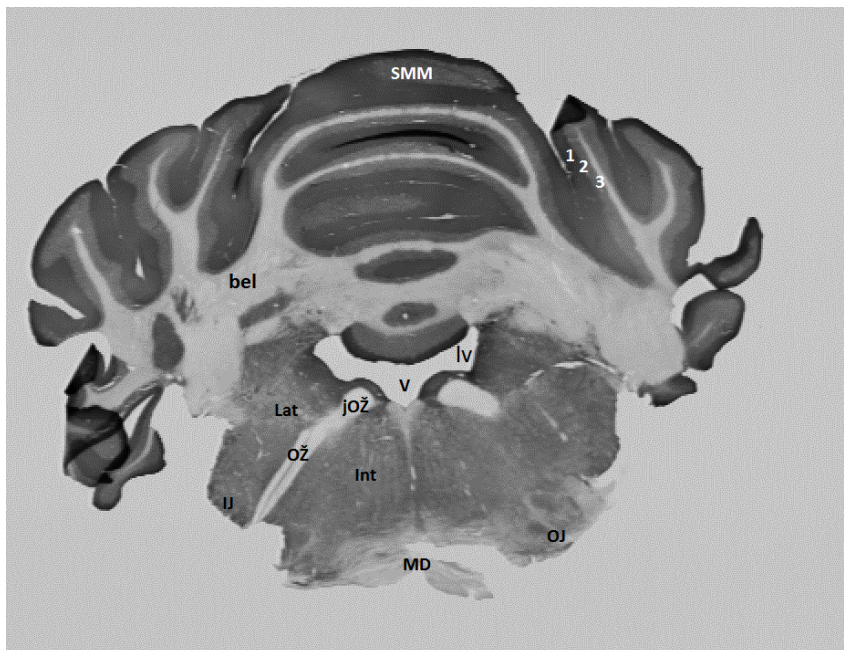
malih možganov je najmočneje obarvana plast Purkinjejevih celic, granularna in molekularna plast sta šibkeje obarvani.



Slika 21: Sinaptotagmin 7 je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov -3,24 mm od bregme. Močen signal v skorji velikih možganov (MS, vsi predeli) in hipokampusu: CA1, CA2, CA3, dentatnem girusu (DG) ter mahovitih vlaknih (mv), v sloju 1 in 3 piriformnega korteksa (Pir – 1, 3), amigdaloidnih (AMG), talamičnih (Tal) in hipotalamičnih (HIP) jedrih. Malo šibkejši signal v sloju 2 piriformnega korteksa (Pir – 2). V belini (bel), kaloznem korpusu (cc), interni kapsuli (ka), forniksu (f), mamilotalamičnem traktu (mt), ventriklu (v) in lateralnem ventriklu (lv) je zelo šibek oz. skoraj odsoten.



Slika 22: Sinaptotagmin 7 je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov 1,56 mm od bregme. Močen signal v striatumu (STR) - v matriksu (trikotnik) ne v predelu strij (krog), v plasti 1 in 3 olfaktornega tuberkula striatuma (OT – 1, 3). Malo šibkejši signal v plasti 2 olfaktornega tuberkula (OT – 2). Najšibkejši in skoraj odsoten signal v kaloznem korpusu (cc), interni kapsuli (ka), ventriklu (v) ter akumbensu (Ac).



Slika 23: Sinaptotagmin 7 je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov -10,32 mm od bregme. Močen signal je prisoten v izvenkortikalnih jedrih: interposednih jedrih (**Int**), lateralnem cerebelarnem jedru (**Lat**), intersticijskem celičnem jedru (**IJ**) in olivarnem jedru (**OJ**) ter v plasti Purkinjejevih celic (**2**) skorje malih možganov (**SMM**). Malo šibkejši signal je v molekularni (**1**) in granularni plasti (**3**) skorje malih možganov. V obraznem živcu (**OŽ**), jedrih obraznega živca (**jOŽ**), belini (**bel**), ventriklu (**v**), lateralnem ventriklu (**Iv**) in možganskem deblu (**MD**) je signal zelo šibek.

4. 1.1.2 Protein SINKRIP je prisoten v večini anatomskih področij

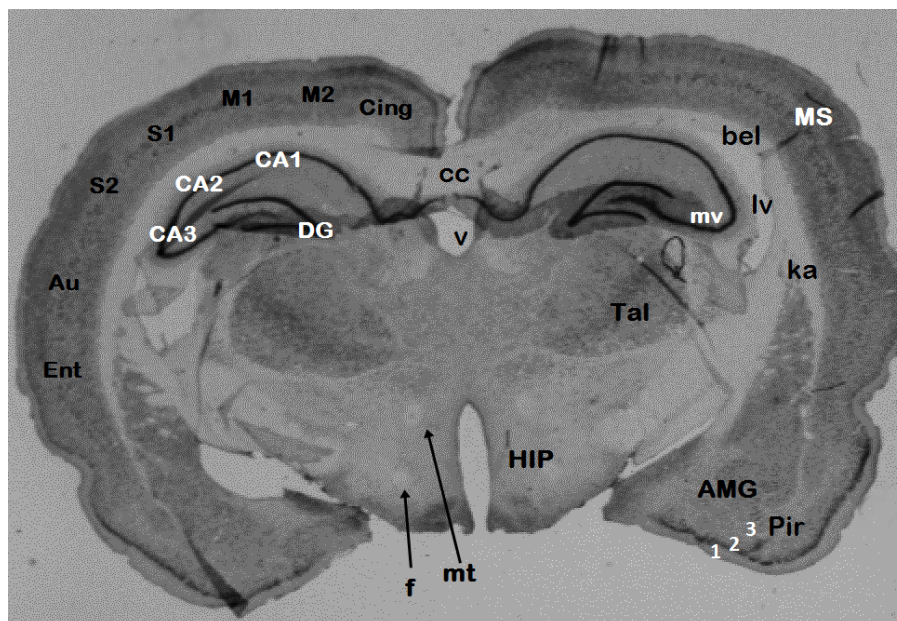
Z imunohistokemičnim označevanjem proteina SINKRIP s konjskimi protitelesi, ki prepoznajo mišje antigene in so konjugirana z biotinom, so se rjavo obarvala SINKRIP-pozitivna mesta. Zanimalo nas je, ali se SINKRIP pojavlja v vseh preučevanih možganskih anatomskih področjih in v katerih področjih je prisoten.

Na sl. 24 je vidno, da je signal za SINKRIP prisoten v večini anatomskih področij v koronarnem prerezu možganov -3,24 mm od bregme; močno v naslednjih področjih: v hipokampusu, skorji velikih možganov, piriformnem korteksu (v vseh treh slojih, najmočneje sta se obarvala sloj 1 in 3), amigdaloidnih, talamičnih in hipotalamičnih jedrih. Slabo je signal za SINKRIP zaznaven v belini, kaloznem korpusu, interni kapsuli, fornixu, mamilotalamičnem traktu, ventriklu in lateralnem ventriklu te možganske rezine. V hipokampusu so se močno obarvala vsa tri CA področja ter dentatni girus. Malo šibkejši signal je v mahovitih vlaknih, nitju granularnih celic dentatnega girusa. Skorja velikih možganov se je obarvala enakomerno v vseh predelih: v cingulatnem korteksu, primarnem in sekundarnem motoričnem korteksu, primarnem in sekundarnem somatosenzoričnem korteksu, avditornem korteksu, entorinalnem korteksu.

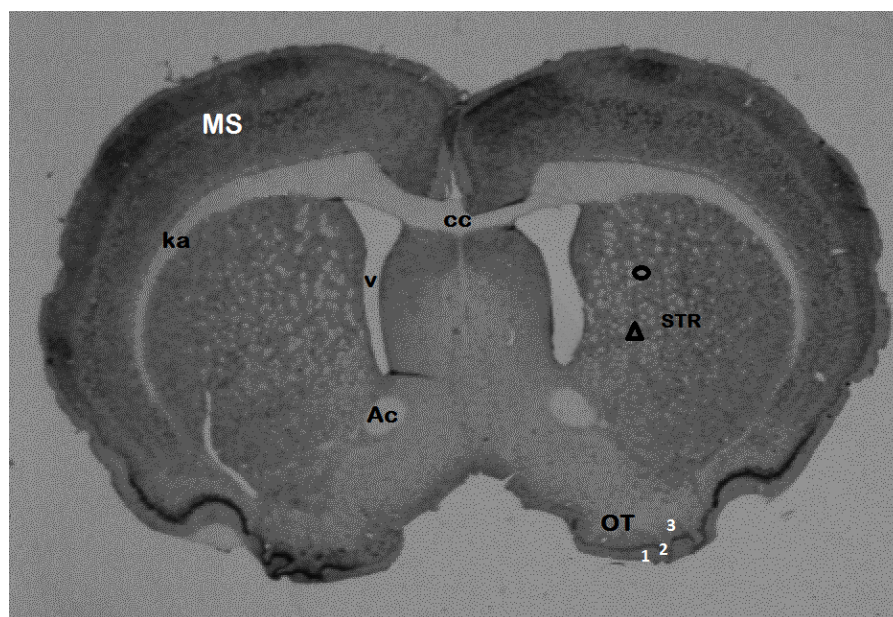
Na sl. 25 je vidno, da je signal za SINKRIP prisoten v večini anatomskih področij v koronarnem prerezu možganov 1,56 mm od bregme; močno v naslednjih področjih: v možganski skorji, striatumu ter olfaktornem tuberkulu striatuma. Slabo je signal za SINKRIP zaznaven v kaloznem korpusu, interni kapsuli in ventriklu. Skorja velikih možganov se je obarvala enakomerno po plasteh v vseh predelih. Močno je obarvan striatum v predelu matriksa, v predelu strij zelo šibko. V olfaktornem tuberkulu je signal močen predvsem v plasti 2, manj v plasti 1 in 3. Akumbens se je zelo šibko obarval.

Na sl. 26 je vidno, da je signal za SINKRIP prisoten v večini anatomskih področij v koronarnem prerezu možganov -10,32 mm od bregme; močno v naslednjih področjih: v izvenkortikalnih jedrih (interposednih jedrih, lateralnem cerebelarnem jedru, intersticijskem celičnem jedru), olivarnem jedru in skorji malih možganov. V belini, ventriklu in lateralnem ventriklu, obraznem živcu, jedrih obraznega živca in možganskem deblu signala skoraj ni. V skorji malih možganov je najmočneje obarvana plast Purkinjejevih celic, granularna plast in molekularna plast sta šibkeje obarvani.

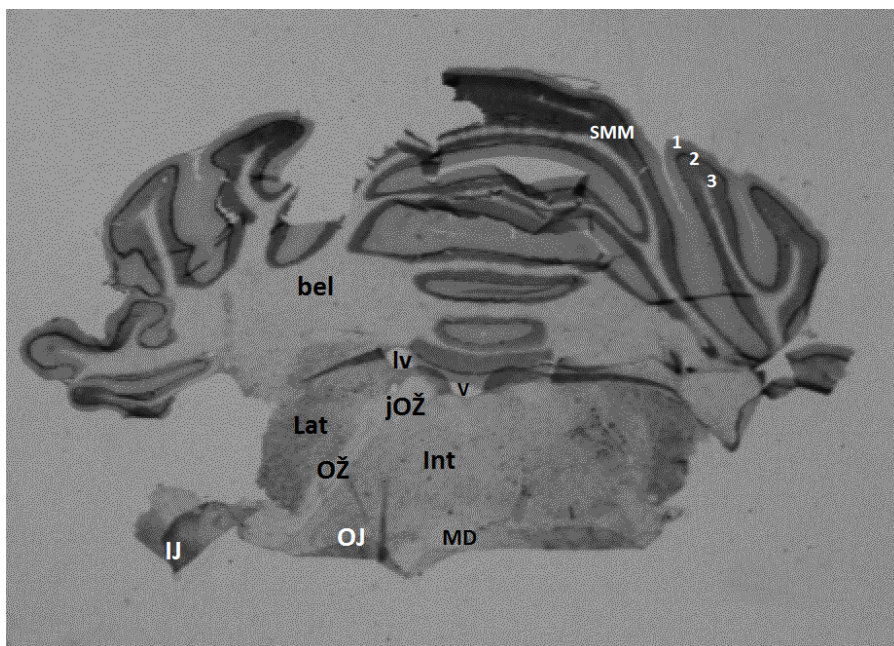
Signal za SINKRIP je v vseh možganskih rezinah nasploh šibkejši kot za SIT 7.



Slika 24: SINKRIP je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov -3,24 mm od bregme. Močen signal v skorji velikih možganov (MS), v CA1, CA2, CA3 ter dentatnem girusu (DG) hipokampusa, v sloju 2 piriformnega korteksa (Pir – 2), amigdaloidnih (AMG), talamičnih (Tal) in hipotalamičnih (HIP) jedrih. Malo šibkejši signal v mahovitih vlaknih (mv) hipokampusa, sloju 1 in 3 piriformnega korteksa (Pir – 1, 3). V belini (bel), kaloznem korpusu (cc), interni kapsuli (ka), fornixu (f), mamilotalamičnem traktu (mt), ventriklu (v), lateralnem ventriklu (Iv) je signal zelo šibek.



Slika 25: SINKRIP je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov 1,56 mm od bregme. Močen signal v skorji velikih možganov (MS), striatumu (STR) - v matriksu (trikotnik) ne v predelu strij (krog), v plasti 2 olfaktornega tuberkula striatuma (OT – 2). Malo šibkejši signal v plasti 1 in 3 olfaktornega tuberkula (OT – 1, 3). Najšibkejši in skoraj odsoten signal v kaloznem korpusu (cc), interni kapsuli (ka), ventriklu (v) ter akumbensu (Ac).



Slika 26: SINKRIP je prisoten v večini anatomskih področij, koronarni prerez možganov -10, 32 mm od bregme. Močen signal je prisoten v izvenkortikalnih jedrih: interposednih jedrih (**Int**), lateralnem cerebelarnem jedru (**Lat**), intersticijskem celičnem jedru (**IJ**) in v olivarnem jedru (**OJ**) ter v plasti Purkinjejevih celic (**2**) skorje malih možganov (**SMM**). Malo šibkejši signal je v molekularni (**1**) in granularni plasti (**3**) skorje malih možganov (**SMM**). V obraznem živcu (**OŽ**), jedrih obraznega živca (**JOŽ**), belini (**bel**), ventriklju (**v**), lateralnem ventriklju (**lv**) in možganskem deblju (**MD**) je signal zelo šibek.

4. 1.1.3 Signal za protein sinaptotagmin 7 je najmočnejši v nevpililu

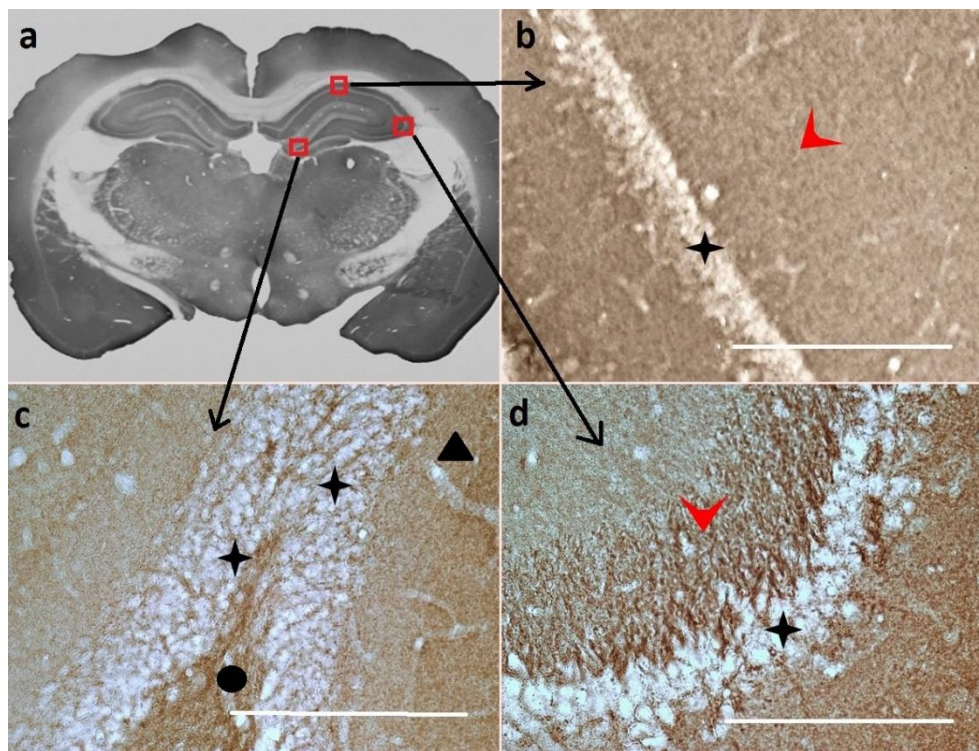
Ugotovili smo, da je SIT 7 v vseh področjih hipokampusa, torej v CA1, CA3 in dentatnem girusu. Signal je močen v nevpililu⁵ obeh CA področij ter v nevpililu molekularnega in polimorfne sloja dentatnega girusa. V somah celic v CA1 (sl. 27b), CA3 (27d) in granularnem sloju - v somah granularnih celic dentatnega girusa (sl. 27c) hipokampusa je signal za SIT 7 zelo šibek. Predvsem močen je v mahovitih vlaknih, nitju granularnih celic dentatnega girusa (sl. 27d).

SIT 7 je prisoten v skorji velikih možganov. Močen signal je v nevpililu zunanje, t.i. molekularne plasti, kjer so dendriti piramidastih nevronov. V nevpililu bolj notranjih plasti (zunanja granularna in piramidalna plast, notranja granularna in piramidalna plast ter plast 6) je šibkejši. V somah celic teh plasti je signal za SIT 7 zelo šibek (sl. 28b).

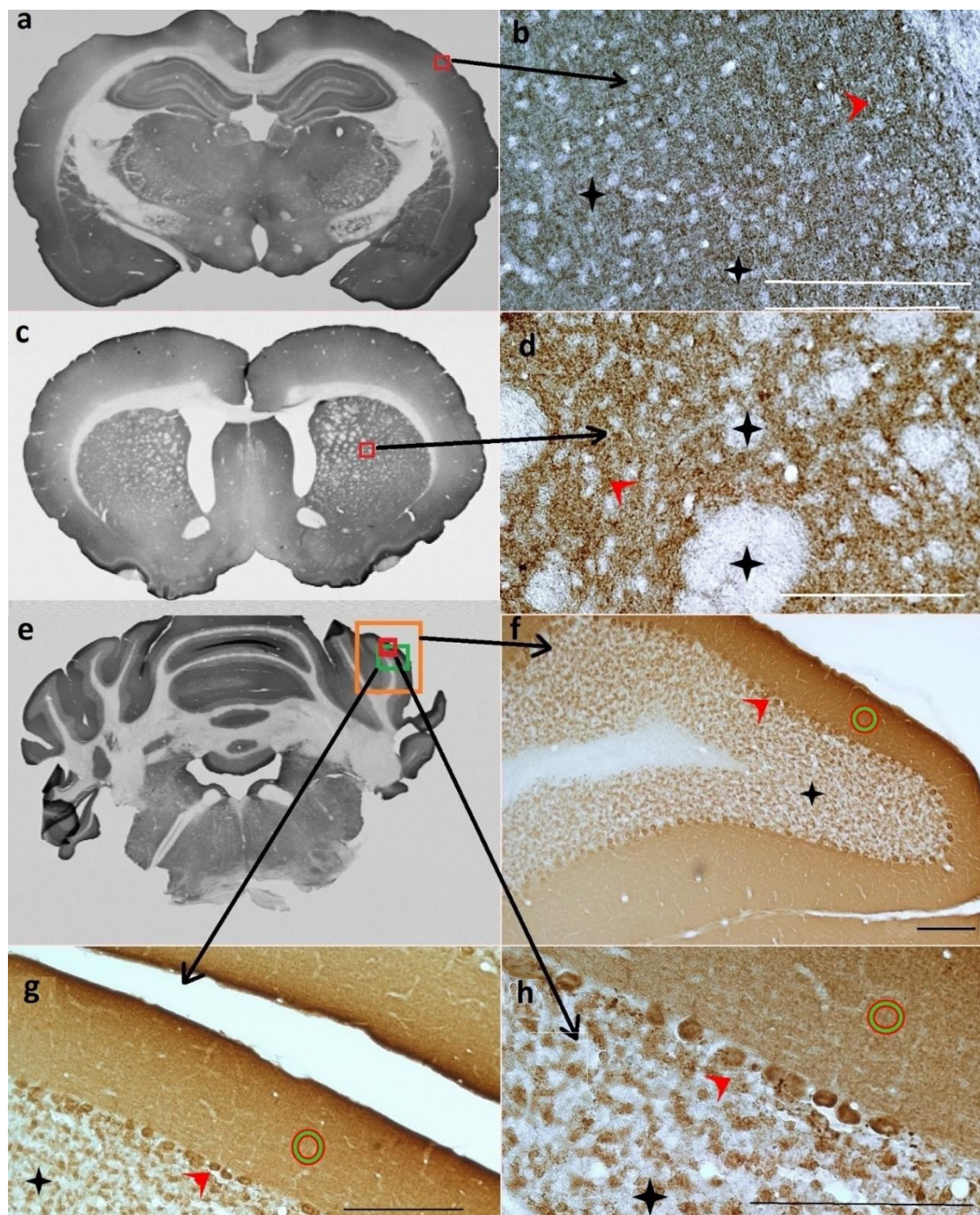
SIT 7 smo zaznali v striatumu. Tam je signal zanj najbolj prisoten v nevpililu matriksa, predvsem v izrastkih celic posredne in neposredne poti (v nadaljevanju celice matriksa). V strijah in v somah celic matriksa je signal zelo šibek (sl. 28d).

SIT 7 smo zaznali tudi v skorji malih možganov. V malih možganih je najbolj SIT 7-pozitivno mesto zunanja, molekularna plast. V vseh treh plasteh je SIT 7 najbolj prisoten v nevpililu v izrastkih zvezdastih in košaričastih internevrnalnih celic, ter granularnih celic (paralelnih vlaknih) in Purkinjejevih celic. Signal je izrazit v plasti Purkinjejevih celic, torej somah Purkinjejevih celic (sl. 28h). V granularni plasti smo SIT 7 zaznali prav tako v nevpililu v izrastkih granularnih celic in Golgijevih internevrnalnih celic, some teh celic niso dobro obarvane in signal v njih je zelo šibek.

⁵ **Nevpilil** je splet izrastkov nevronov (aksonov in dendritov), sinaps in celic glije (Pearsall J., Neuropil).



Slika 27: Sinaptotagmin 7 je najbolj prisoten v nevpilu vseh področij hipokampusa. **(a)** Koronarni prerez možganov -3,24 mm od bregme **(b)** Povečano CA1 področje hipokampusa; močen signal v nevpilu (glava puščice), šibek pa v somah piramidalnih nevronov (zvezdica) **(c)** Povečan dentatni girus; močen signal v nevpilu molekularnega (trikotnik), granularnega (zvezdica) in polimorfne sloja (krog), v somah granularnih celic (zvezdica) šibek signal **(d)** Povečano CA3 področje hipokampusa; močen signal v mahovitih vlaknih (glava puščice), v somah piramidalnih nevronov (zvezdica) zelo šibek. Merilce: 100 μ m



Slika 28: Sinaptotagmin 7 je najbolj prisoten v nevpilu skorje velikih možganov, matriksa striatuma in nevpilu skorje malih možganov. **(a)** Koronarni prerez možganov -3,24 mm od bregme **(b)** Povečana skorja velikih možganov; največ signala v nevpilu zunanjih plasti (glava puščice) in malo manj v nevpilu notranjih plasti (zvezdica), v somah celic možganske skorje ga je zelo malo **(c)** Koronarni prerez možganov 1,56 mm od bregme **(d)** Povečan striatum; največ signala v nevpilu matriksa (glava puščice), v somah celic matriksa in strijah ga je zelo malo (zvezdica) **(e)** Koronarni prerez možganov -10,32 mm od bregme **(f)** 10-krat povečan list malih možganov **(g)** 20-krat povečan list malih možganov **(h)** 40-krat povečana skorja malih možganov; močen signal v nevpilu molekularne plasti, kjer so prisotni dendriti Purkinjejevih celic (krog) in vzporedna vlakna granularnih celic, v somah Purkinjejevih celic (glava puščice) in somah celic granularne plasti (zvezdica). Merilce: 100 μ m

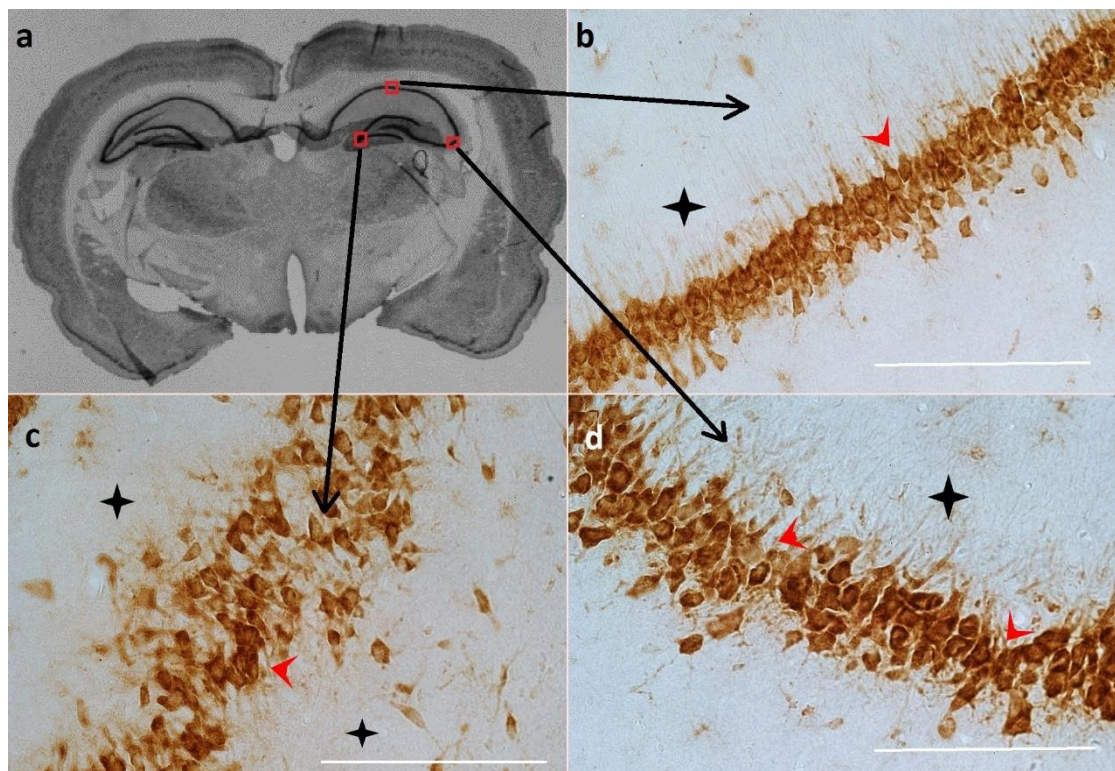
4. 1.1.4 Signal za protein SINKRIP je najmočnejši v somah celic

Ugotovili smo, da je tako kot SIT 7 tudi SINKRIP v vseh področjih hipokampusa (CA1, CA3 in dentatnem girusu). V CA1 (sl. 29b) in CA3 (sl. 29d) področju hipokampusa je signal, obratno kot za SIT 7, močen v somah piramidalnih nevronov in postaja šibkejši v dendritih piramidalnih nevronov, v ostalem nevpilu je skoraj odsoten. V dentatnem girusu (sl. 29c) je SINKRIP, obratno kot SIT 7, prisoten v somah in dendritih celic, zaradi števila celic predvsem v granularni plasti, v drugih plasteh manj. V nevpilu molekularne, granularne in polimorfne plasti dentatnega girusa je signal šibek. Šibek je tudi v mahovitih vlaknih, nitju granularnih celic dentatnega girusa (sl. 29d).

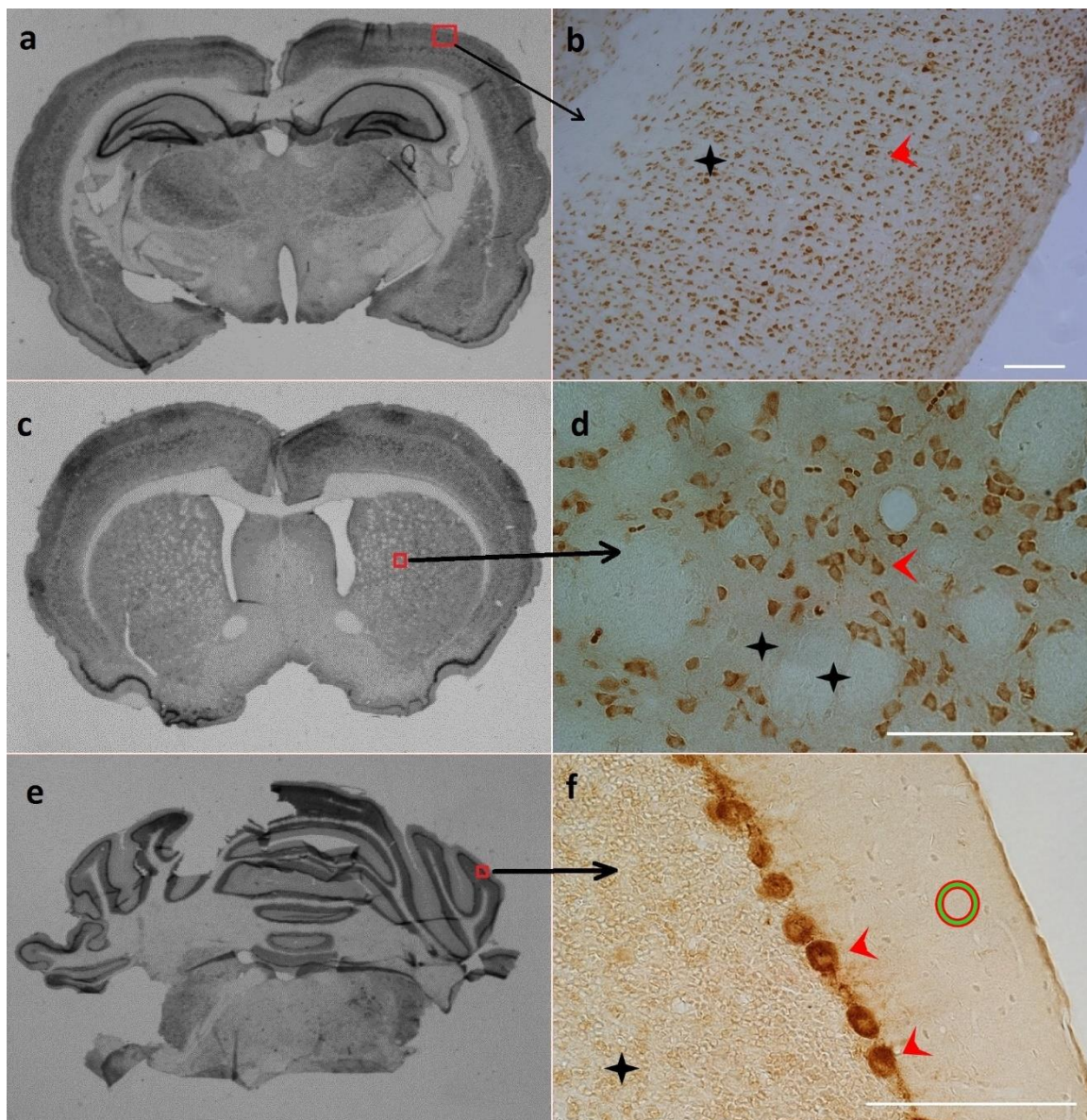
Protein SINKRIP je prisoten v skorji velikih možganov; zaradi številčnosti celic najbolj v molekularni plasti. V nevpilu te in drugih plasti (zunanja granularna in piramidalna plast, notranja granularna in piramidalna plast ter plast 6) je signal nasploh zelo šibek. V vseh plasteh so se močno obravale some piramidastih in granularnih celic (sl. 30b).

Protein SINKRIP smo zaznali v striatumu. V striatumu je močno prisoten v somah in malo šibkejše v izrastkih celic matriksa. V področju strij je signal za protein SINKRIP zelo šibek (sl. 30d).

Ugotovili smo, da je protein SINKRIP prisoten v skorji malih možganov. Najbolj močno so obarvane some Purkinjejevih celic (sl. 30f). Signal smo v granularni plasti dobili predvsem verjetno v somah granularnih in Golgijevih internevralskih celic. V nevpilu granularne plasti proteina SINKRIP nismo močno zaznali, kar pomeni, da verjetno ni prisoten v izrastkih Purkinjejevih celic ter paralelnih vlaknih. Signal je tudi v somah in izrastkih celic molekularnih plasti - verjetno v zvezdastih ter košaričastih internevralskih celicah.



Slika 29: SINKRIP je prisoten v večini som celic vseh področij hipokampusa. **(a)** Koronarni prerez možganske rezine v oddaljenosti -3,24 mm od bregme **(b)** Povečano CA1 področje hipokampusa; močen signal v somah in dendritih piramidalnih nevronov (glava puščice), ne pa v ostalem nevpilu (zvezdica) **(c)** Povečan dentatni girus; močen signal v granularni plasti v somah in dendritih granularnih celic (glava puščice) ter v somah celic molekularne in polimorfne plasti, v ostalem nevpilu dentatnega girusa je šibek signal (zvezdica) **(d)** Povečano CA3 področje hipokampusa; močen signal v somah in dendritih nevronov CA3 področja (glava puščice), v mahovitih vlaknih granulanih celic in ostalem nevpilu (zvezdica) šibek. Merilce: 100 μ m



Slika 30: SINKRIP je najbolj prisoten v somah celic skorje velikih možganov, matriksa striatuma in skorje malih možganov. **(a)** Koronarni prerez možganov -3,24 mm od bregme **(b)** Povečana skorja velikih možganov; največ signala je v piramidalni plasti (glava puščice) in prisoten je v večini som celic vseh plasti, v nevpilu je zelo šibek (zvezdica) **(c)** Koronarni prerez možganov 1,56 mm od bregme **(d)** Povečan striatum; močan signal v somah in dendritih celic matriksa (glava puščice), v ostalem nevpilu matriksa in strijih je signal šibek (zvezdica) **(e)** Koronarni prerez možganov -10,32 mm od bregme **(f)** Povečana skorja malih možganov; močno obarvane some Purkinjejevih celic (glave puščic), signal v granularni plasti predvsem verjetno v somah granularnih in Golgijevih internevalnih celic (zvezdica), v somah in izrastkih celic molekularne plasti (krog), verjetno so to zvezdaste ter košaričaste internevalne celice. Merilce: 100 μ m

4. 1.2 STOPNJA KOLOKALIZACIJE PROTEINOV SINAPTOTAGMIN 7 IN SINKRIP JE NIZKA, RAZEN V PURKINJEJEVIH CELICAH MALIH MOŽGANOV

V možganskih rezinah intaktnih možganov podgane smo z dvojnimi imunofluorescenčnimi označevanjem proteinov SIT 7 in SINKRIP s specifičnimi protitelesi, ki označijo ta proteina, analizirali njuno kolokalizacijo v štirih možganskih področjih: v hipokampusu (v CA1, CA3, dentatnem girusu), skorji velikih možganov, striatumu in skorji malih možganov (v granularni in molekularni plasti ter somah Purkinjejevih celic).

Kozje protitelo, ki prepozna kunčje antigene, konjugirano z AlexaFluor 488, označi protein SIT 7 zeleno. Konjsko protitelo, ki prepozna mišje antigene, konjugirano z AlexaFluor 555, označi protein SINKRIP rdeče. Jedra celic so označena modro zaradi Prolong z DAPI. Kolokalizacijo smo analizirali in kvantitativno ovrednotili s Pearsonovim koeficientom \pm SD za vsako preučevano anatomsko področje možganov.

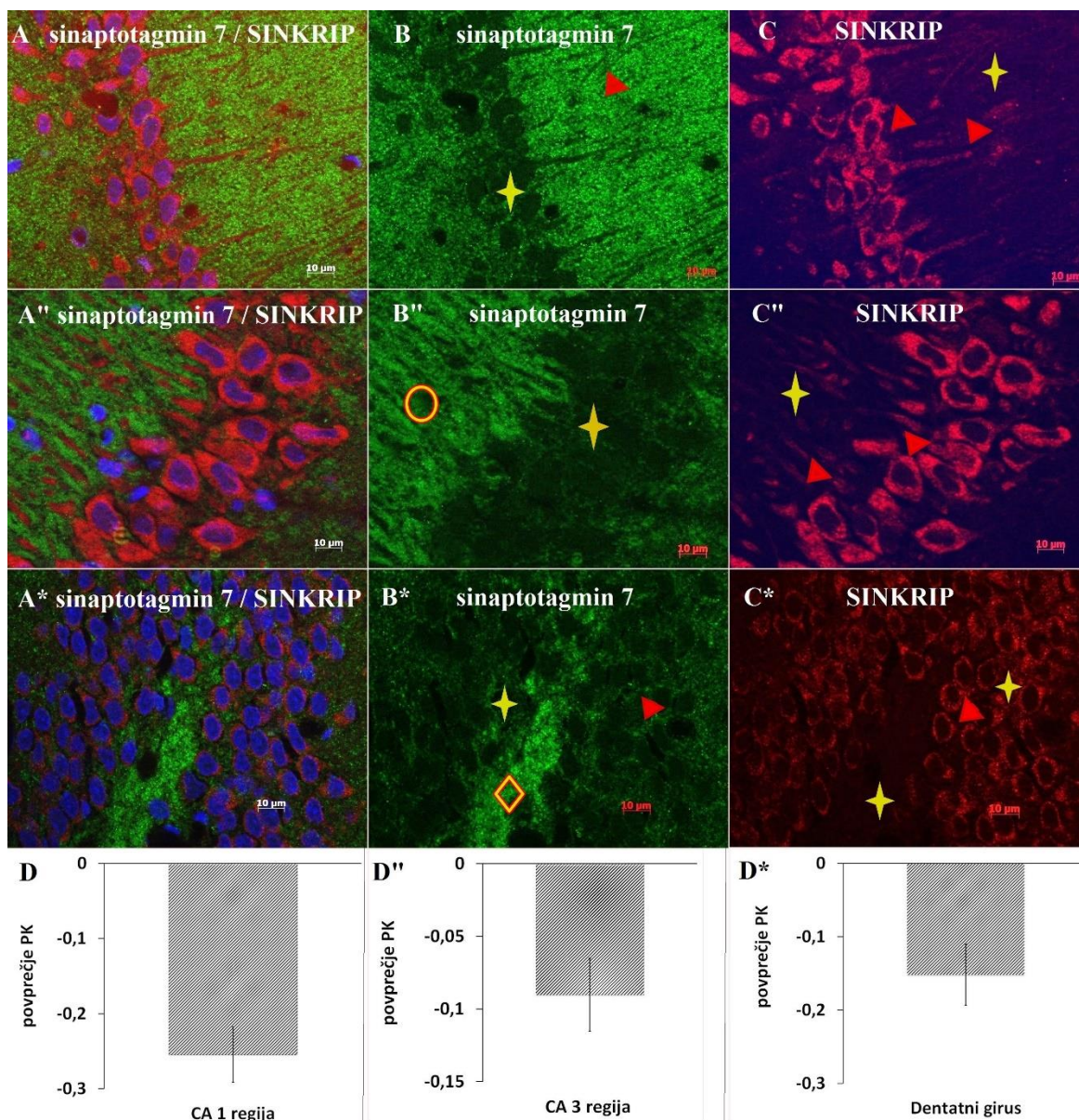
4. 1.2.1 Kolokalizacija v hipokampusu

Ugotovili smo, da je signal za SIT 7 močen v večini nevpila, malo šibkejši v nekaterih izrastkih (verjetno dendritih) piramidalnih celic v CA1 (sl. 31 B) in CA3 (sl. 31 B'') področju hipokampusa. V somah piramidalnih nevronov v CA1 in CA3 hipokampusa ter v somah granularnih celic dentatnega girusa signala skoraj nismo zaznali. SIT 7 je močno prisoten v mahovitih vlaknih (sl. 31 B'') ter v nevpilu granularnega in polimorfne sloja dentatnega girusa (sl. 31 B*).

Protein SINKRIP je prisoten v vseh področjih hipokampusa (v CA1, CA3 in dentatnem girusu). V hipokampusu je signal, obratno kot za SIT 7, močen v somah piramidalnih nevronov v CA1 (sl. 31 C) in CA3 (sl. 31 C'') področju, ter postaja šibkejši v dendritih piramidalnih nevronov. V ostalem nevpilu teh dveh področij je skoraj odsoten. Signal za SINKRIP je močen v somah granularnih celic dentatnega girusa, ter šibek v nevpilu (sl. 31 C*). Stopnja kolokalizacije v vseh področjih hipokampusa je nizka, signala se izključujeta. Signal za SIT 7 je v vseh področjih hipokampusa močno prisoten v nevpilu, signal za SINKRIP pa v somah nevronov. Graf vrednosti PK za CA1 področje je na sl. 31 D, za CA3 na sl. 31 D'', za dentatni girus na sl. 31 D*. V pregl. 5 so navedene vrednosti Pearsonovega koeficienta za posamezno področje hipokampusa.

Preglednica 5: Vrednosti Pearsonovega koeficienta za posamezno področje hipokampusa

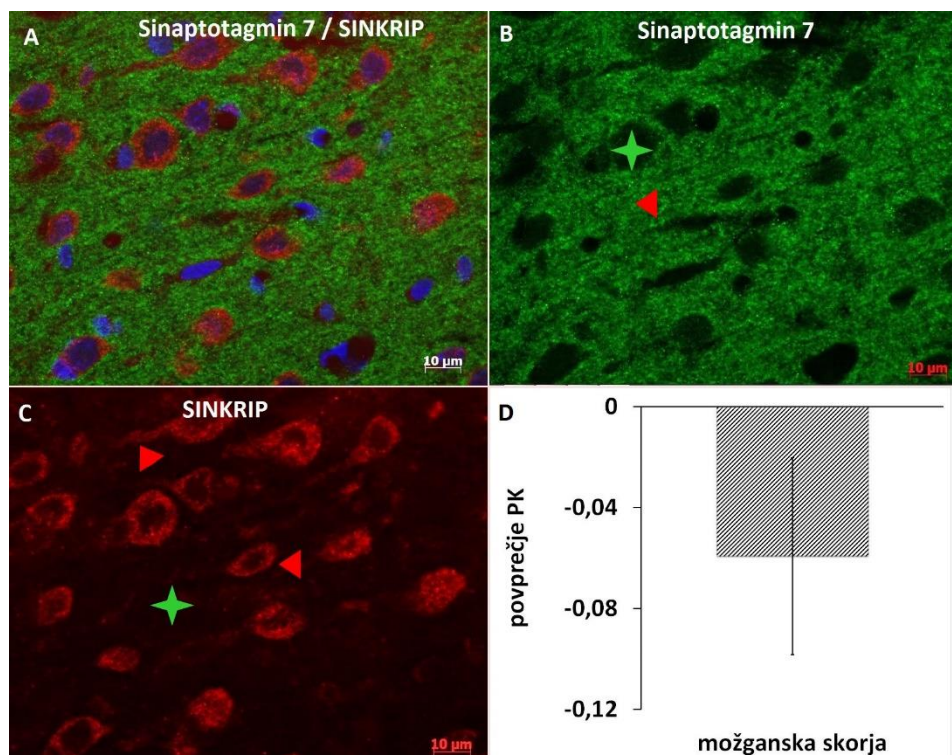
CA1	CA3	Dentatni girus
-0,25 (\pm 0,037)	-0,09 (\pm 0,025)	-0,15 (\pm 0,042)



Slika 31: Nizka stopnja kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v CA1, CA3 ter dentatnem girusu hipokampusa. (A) CA1: oba proteina (B) Sinaptotagmin 7 v CA1 področju; močen signal v večini nevpila (glava puščice), šibkejši v izrastkih (verjetno dendritih) in somah piramidalnih celic (zvezdica) (C) SINKRIP v CA1 področju; močen signal v somah in dendritih piramidalnih nevronov (glava puščice), v ostalem nevpilu šibek (zvezdica) (A'') CA3 področje: oba proteina (B'') Sinaptotagmin 7 v CA3 področju; močen signal v mahovitih vlaknih (krog), šibek v somah in dendritih piramidalnih nevronov (zvezdica) (C'') SINKRIP v CA3 področju; močen signal v somah in dendritih piramidalnih nevronov (glava puščice), v ostalem nevpilu šibek (zvezdica) (A*) Dentatni girus: oba proteina (B*) Sinaptotagmin 7 v dentatnem girusu; močen signal v nevpilu granularnega sloja (glava puščice) ter polimorfne sloja (kara), šibek v somah granularnih celic (zvezdica) (C*) SINKRIP v dentatnem girusu; močen signal v somah granularnih celic (glava puščice), v nevpilu granularnega in polimorfne sloja (zvezdica) šibek (D) Graf povprečja PK za CA1 področje ($PK = -0,25 (\pm 0,037)$, $n = 3$, št. posnetkov = 30) (D'') Graf povprečja PK za CA3 področje ($PK = -0,09 (\pm 0,025)$, $n = 3$, št. posnetkov = 30) (D*) Graf povprečja PK za dentatni girus ($PK = -0,152 (\pm 0,042)$, $n = 1$, št. posnetkov = 10)

4. 1.2.2 Kolokalizacija v skorji velikih možganov

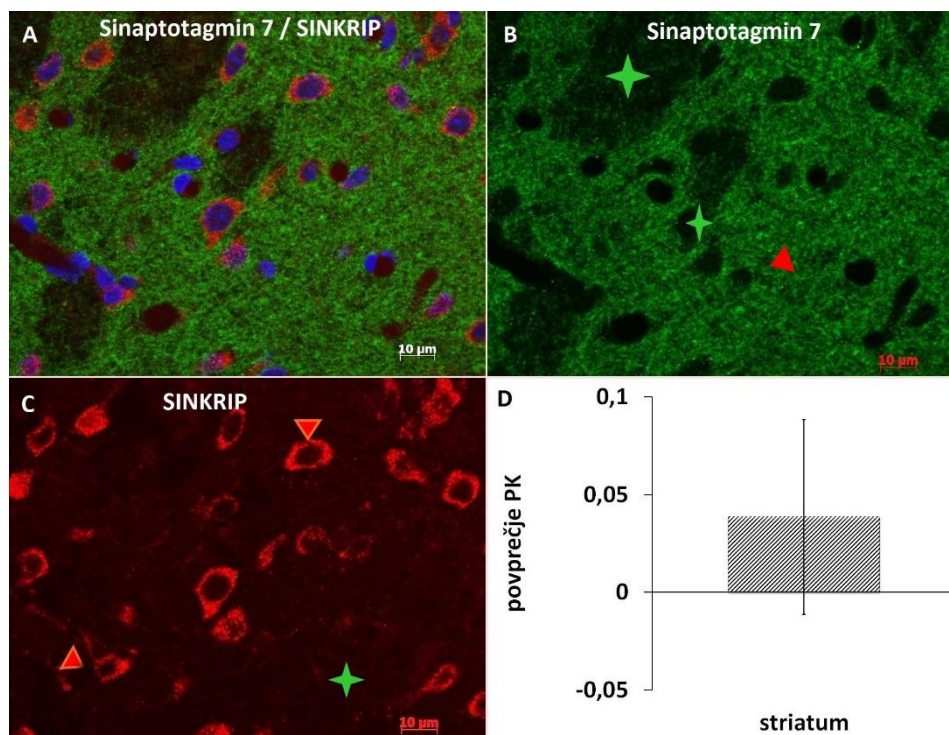
Ugotovili smo, da je v skorji velikih možganov močen signal za SIT 7 v nevropilu, v somah nevronov pa šibek (sl. 32 B). Protein SINKRIP je, nasprotno, prisoten v somah in izrastkih nevronov, verjetno v dendritih (sl. 32 C), v ostalem nevropilu šibek. Stopnja kolokalizacije proteinov je nizka. Vrednost Pearsonovega koeficienta je $-0,06 (\pm 0,04)$, kar je prikazano z grafom na sl. 32 D.



Slika 32: Nizka stopnja kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v skorji velikih možganov. (A) Oba proteina (B) Sinaptotagmin 7; močen signal v nevropilu (glava puščice), v somah nevronov šibek (zvezdica) (C) SINKRIP; močen signal v somah in nekaterih izrastkih nevronov (glava puščice), v ostalem nevropilu šibek (zvezdica) (D) Graf povprečja PK za skorjo velikih možganov (možgansko skorjo; $PK=-0,06 (\pm 0,04)$, $n=3$, št. posnetkov=30)

4. 1.2.3 Kolokalizacija v striatumu

Proteina SIT 7 in SINKRIP sta prisotna v striatumu. Močen signal za SIT 7 je v nevropilu matriksa, v strijah in somah celic matriksa je skoraj odsoten (sl. 33 B). Signal za SINKRIP je, ravno obratno, močno prisoten v somah celic matriksa medtem ko je v strijah in nevropilu matriksa skoraj odsoten (sl. 33 C). Stopnja kolokalizacije proteinov je nizka. Vrednost Pearsonovega koeficienta je $0,04 (\pm 0,05)$, kar prikazuje graf na sl. 33 D.



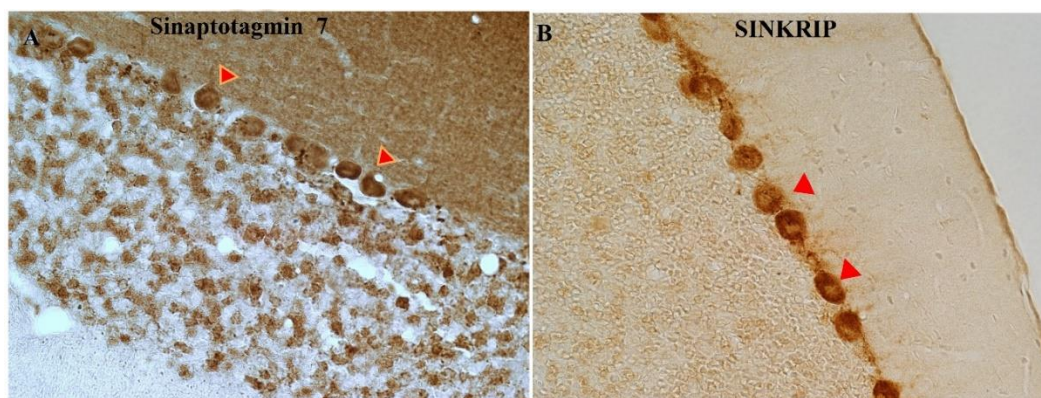
Slika 33: Nizka stopnja kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v striatumu. (A) Oba proteina (B) Sinaptotagmin 7; močen signal v nevropilu (glava puščice), šibek v somah celic matriksa ter strijih (zvezdica) (C) SINKRIP; močen signal v somah celic matriksa (glava puščice), v nevropilu (zvezdica) in strijih signala skoraj ni (D) Graf povprečja PK za striatum (PK=0,04 (\pm 0,05), n=3, št. posnetkov=30)

4. 1.2.4 Kolokalizacija v skorji malih možganov

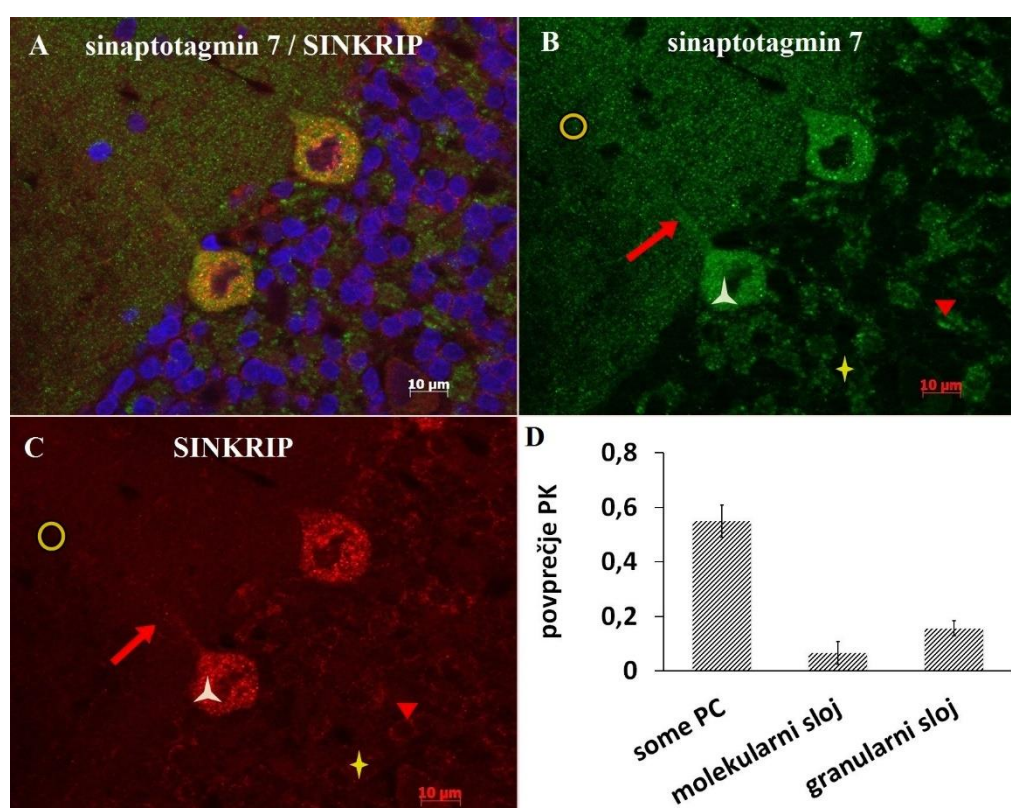
V skorji malih možganov je pri imunohistokemičnih barvanjih dobro vidno, da se oba proteina pojavljata v plasti Purkinjejevih celic. To je prikazano na sl. 34.

Prisotnost proteinov smo preučili tudi pri imunofluorescenčnih barvanjih. Signal za SIT 7 je v granularni plasti najbolj močen v nevropilu, v somah granularnih celic je šibek (sl. 35 B). Signal za SINKRIP je, obratno, močen v somah granularnih celic in šibek v nevropilu (sl. 35 C). Stopnja kolokalizacije proteinov v tej plasti skorje malih možganov je nizka, vrednost Pearsonovega koeficienta je 0,16 (\pm 0,028). V molekularni plasti skorje malih možganov je signal za SIT 7 močen v nevropilu (sl. 35 B), signal za SINKRIP je v nevropilu te plasti šibek (sl. 35 C). Stopnja kolokalizacije proteinov je tudi v tej plasti nizka, vrednost Pearsonovega koeficienta je 0,07 (\pm 0,042).

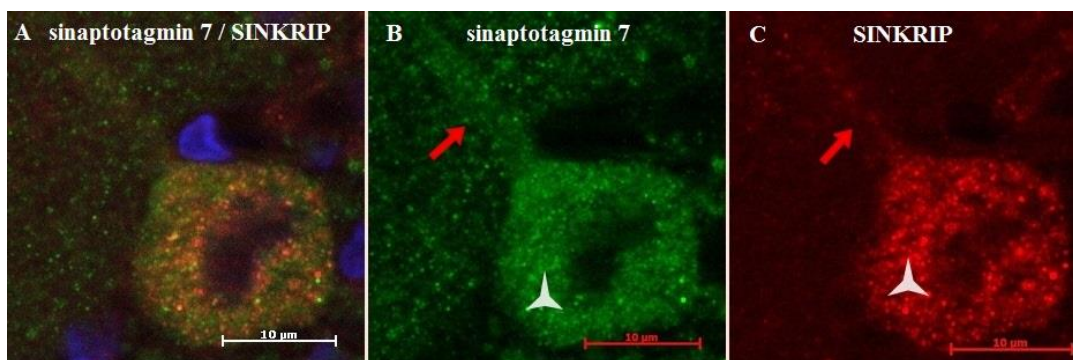
Oba signala, tako za SIT 7 kot za SINKRIP, sta močna v somah Purkinjejevih celic (sl. 35 B za SIT 7, sl. 35 C za SINKRIP). Stopnja kolokalizacije proteinov v tej plasti je visoka, vrednost Pearsonovega koeficienta je 0,55 (\pm 0,059). Vrednosti Pearsonovega koeficienta za vsako področje skorje malih možganov so prikazane na grafu, sl. 35 D.



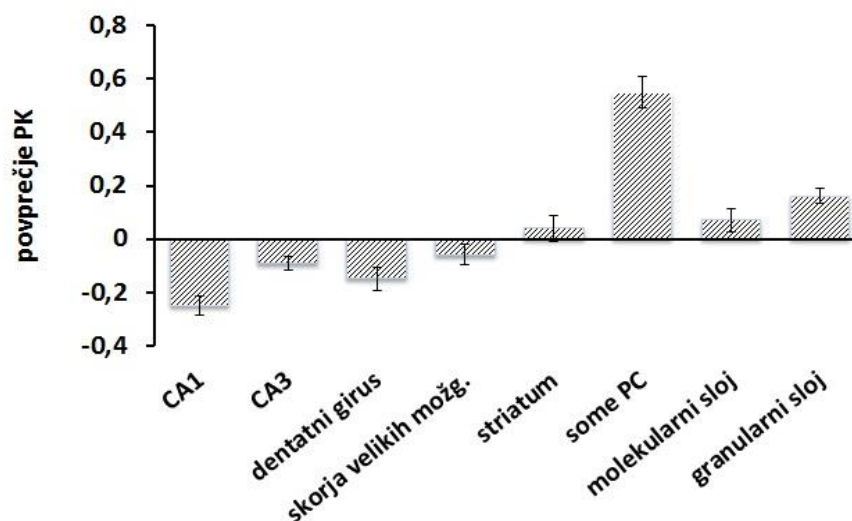
Slika 34: Sinaptotagmin 7 in SINKRIP sta prisotna v Purkinjejevih celicah. (A) Sinaptotagmin 7 v somah Purkinjejevih celic (glave puščic) (B) SINKRIP v somah Purkinjejevih celic (glave puščic)



Slika 35: Stopnja kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v skorji malih možganov. Posamezno območje smo analizirali z obkroževanjem. (A) Oba proteina (B) Sinaptotagmin 7; močen signal v nevpilu granularne plasti (glava puščice), nevpilu molekularne plasti (krog) in somah (trikotnik) ter dendritih (puščica) Purkinjejevih celic; v somah granularnih celic (zvezdica) je šibek (C) SINKRIP; močen signal v somah granularnih celic (zvezdica) in Purkinjejevih celicah (trikotnik) ter dendritih Purkinjejevih celic (puščica), v nevpilu granularne (glava puščice) in molekularne plasti (krog) šibek (D) Graf povprečja PK za male možgane (some Purkinjejevih celic (PC)=0,55 ($\pm 0,059$) n=1, št. posnetkov=10. Molekularni sloj=0,07 ($\pm 0,042$), n=1, št. posnetkov=10. Granularni sloj=0,16 ($\pm 0,028$), n=1, št. posnetkov=10)



Slika 36: Visoka stopnja kolokalizacije proteinov sinaptotagmin 7 in SINKRIP v somah Purkinjejevih celic in prisotnost obeh proteinov v dendritih. Some celic smo analizirali z obkroževanjem. (A) Oba proteina (B) Sinaptotagmin 7; močen signal v somah Purkinjejevih celic (trikotnik) in dendritih (puščica) (C) SINKRIP; močen signal v somah Purkinjejevih celic (trikotnik) in dendritih (puščica)



Graf 1: Povprečne vrednosti Pearsonovih korelacijskih koeficientov v posameznih anatomskih področjih. **CA1** (PK=-0,25 (\pm 0,037), n=3, št. posnetkov=30). **CA3** (PK= -0,09 (\pm 0,025), n=3, št. posnetkov=30). **Dentatni girus** (PK=-0,152 (\pm 0,042), n=1, št. posnetkov=10). **Skorja velikih možganov** (PK=-0,06 (\pm 0,04), n=3, št. posnetkov=30). **Striatum** (PK=0,04 (\pm 0,05), n=3, št. posnetkov=30). **Skorja malih možganov** (PK some Purkinjejevih celic (PC)=0,55 (\pm 0,059) n=1, št. posnetkov=10. PK molekularni sloj=0,07 (\pm 0,042), n=1, št. posnetkov=10. PK granularni sloj=0,16 (\pm 0,028), n=1, št. posnetkov=10).

5 RAZPRAVA

5.1.1 MOREBITNA VLOGA PROTEINOV SINKRIP IN SINAPTOTAGMIN 7 NA PODLAGI UGOTAVLJANJA PRISOTNOSTI V MOŽGANSKIH PODROČJIH

V naši raziskavi smo se osredotočili na morebitno vlogo proteinov SINKRIP in SIT 7 na podlagi ugotavljanja prisotnosti v možganskih področjih. Osnovna specifična vloga proteina SIT 7 v tistih anatomskih področjih možganov, kjer je prisoten, je verjetno eksocitoza različnih membranskih struktur, kot so sekretorni vezikli in lizosomi. Eksocitoza poteka v odvisnosti od Ca^{2+} , kalcijevi ioni v citoplazmi se vežejo na C2 podenoti SIT 7 v membrani sekretornega vezikla (Andrews in Chakrabarti, 2005) in na ta način SIT 7 sodeluje pri počasni in nesinhroni eksocitozi (Bacaj in sod., 2013) snovi iz sekretornih veziklov. O vlogi SIT 7 v nevronih možganov ni veliko znanega, veliko poskusov o SIT 7 je bilo namreč narejenih na drugih celicah in tkivih, saj SIT 7 ni vezan le na živčevje. Tako obstaja malo relevantnih raziskav v povezavi z našo raziskavo. Znano je, da v nevronih SIT 7 najdemo v dendritih presinaptičnih celic oz. presinaptični aktivni coni (Andrews in Chakrabarti, 2005), kjer med drugim interagira s specifičnim glikoproteinom na membrani lizosomov. Domnevajo, da v takšnem primeru SIT 7 posreduje združevanje lizosomalnih membran s plazmalemo in rast nevitov nevronov simpatičnega sistema (Arantes in Andrews, 2006). Tudi v hipokampusnih nevronih SIT 7 najdemo v aksonih na področju sinaps (Montserrat in sod., 2007), kjer naj bi bil ključen pri prenosu sinaptičnih veziklov v dendrite. Na to funkcijo kaže prav tako prisotnost SIT 7 na plazemski membrani (Sugita in sod., 2001). SIT 7 torej sodeluje tudi pri samem prenosu sinaptičnih veziklov (ti vsebujejo nevrottransmitterje) iz some v dendrite nevronov. Slednje je bilo dokazano samo na primeru nevrottransmitterja dopamina - ko pride do znižanega izražanja SIT 7, se zmanjša koncentracija tega nevrottransmitterja v somi in dendritih (Mendez in sod., 2011). SIT 7 je zaradi morebitnega sodelovanja pri nastanku novih membran in s tem rasti nevronov (Arantes in Andrews, 2006) pomemben pri raziskavah nevrodegenerativnih bolezni. Patofiziološki procesi pri teh boleznih, npr. pomanjkanje energije, porušenje ionske homeostaze, pojav reaktivnega kisika in drugo, vodijo v apoptozo in nekrozo nevronov ter nepravilnosti sinaptičnih medceličnih povezav. SIT 7 je morda pomemben pri obnavljanju degeneriranih nevronov in pri prilagajanju ob njihovi izgubi (Glavan in sod., 2009). Raziskovalci (Wishart in sod., 2006) sklepajo, da gre pri vseh nevrodegenerativnih boleznih za isti celični in molekularni mehanizem nastanka, mehanizem, osredotočen na sinapse. Za nastajanje novih ter delovanje že obstoječih sinaps je pomemben prepis nekaterih molekul mRNA za proteine, ki so sestavni del sinaps (Czaplinski, 2014). Vloga proteina SINKRIP v vseh anatomskih področjih, kjer se le-ta pojavlja, pa je povezana prav s prepisom mRNA, saj sodeluje pri znotrajceličnem prenosu mRNA (s pomočjo granul mRNA) v dendrite nevronov, kjer se te molekule potem prepisujejo. Interakcija med njima bi posledično lahko nakazovala vključenost SIT 7 pri prenosu mRNA v dendrite (Mizutani in sod., 2000). RNA-vezavni citoplazemski protein SINKRIP se sicer veže na SIT 7 preko podenote C2B (Mizutani in sod., 2000), vendar so dosedaj to pokazali samo *in vitro* (te raziskave so potekale na celičnih

kulturah COS-7 in Sf9 celic in ne iz nevronov možganov) (Mizutani in sod., 2000). Zato smo to preverili še *in vivo*, da bi v primeru njune kolokalizacije lahko potrdili našo hipotezo o vključenosti SIT 7 pri prenosu mRNA v dendrite nevronov. V raziskavi smo s tem namenom z metodo imunofluorescence analizirali kolokalizacijo proteinov SIT 7 in SINKRIP. mRNA se prenašajo tako z granulami mRNA kot tudi z zunajceličnimi vezikli (EV) - tudi ti imajo pomembno vlogo pri sinaptični komunikaciji med nevroni (Candelario in Steindler, 2014). V nadaljnjih raziskavah bi lahko raziskali prisotnost SIT 7 še v teh veziklih in to bi pripomoglo k razumevanju vloge prenosa mRNA, vendar v tem primeru ne prenosa mRNA v dendrite. Tudi na ta način bi lahko izboljšali razvoj raznih molekularnih in bioloških terapij za nevrodegenerativne bolezni.

Pokazano je bilo sicer, da transport mRNA v dendrite v nevronih poteka predvsem s pomočjo granul RNA (Batish in sod., 2012), a nekateri avtorji navajajo, da je transport možen tudi s pomočjo določenih organelov, npr. citoplazemskega razdelka, imenovanega mitohondrijski oblak in endoplazmatskega retikuluma, na podlagi lokalizacije citoplazemske mRNA s pomočjo specifičnega proteina v žabjih oocitih (Schnapp in sod., 1997; Deshler in sod., 1998). Možno bi bilo, da obstaja podoben način transporta mRNA v dendrite tudi v nevronih.

S pomočjo imunohistokemije smo analizirali prisotnost proteinov SIT 7 in SINKRIP v koronarnih prerezih možganov 1,56 mm, -3,24 mm ter -10,56 mm oddaljenosti od bregme ter ugotovili, da se oba proteina pojavljata v večini anatomskih področij. Signal za SIT 7 v celotnih možganskih rezinah je viden na sl. 21, sl. 22, sl. 23, signal za SINKRIP pa na sl. 24, sl. 25, sl. 26. Signal za oba proteina je močan v hipokampusu, matriksu striatuma, skorji velikih možganov, skorji malih možganov, piriformnem korteksu, olfaktornem tuberkulu, amigdaloidnih, talamičnih in hipotalamičnih jedrih, izvenkortikalnih jedrih in olivarnem jedru malih možganov. Večina predhodnih raziskav kaže na to, da imata v celotnih možganih podgane proteina SIT 7 in SINKRIP različne funkcije. SIT 7 v vsakem od anatomskih področij kjer je, sodeluje pri izločanju specifičnih snovi (nevrotransmitterjev), medtem ko SINKRIP sodeluje pri znotrajceličnem prenosu specifičnih mRNA v dendrite celic. Vsebnost teh proteinov je manjša v mieliziranih anatomskih področjih - v belini, kaloznem korpusu, interni kapsuli, strijah striatuma, fornixu, mamilotalamičnem traktu, obraznem živcu in jedrih obraznega živca. V teh področjih so povezave različnih struktur možganov in mielizirana vlakna, tako da predvidevamo, da SIT 7 in SINKRIP nista ključna pri povezavah različnih delov možganov. Zelo šibek imunohistokemični signal smo zaznali v lateralnih ventriklih, ker sta napolnjena s cerebrospinalno tekočino, ependimalne celice pa ne izločajo nevrotransmitterjev (Bear in sod., 2006). Šibek signal je tudi v akumbensu, ki vsebuje končiče dopaminskih nevronov (Kandel in sod., 2000). V vsakem od zgoraj omenjenih anatomskih področij smo analizirali prisotnost za vsak protein posebej. V področju, kjer je posamezen protein, smo sklepali o njegovi domnevni vlogi v tem področju.

5. 1.1.1 Hipokampus

V hipokampusu se oba proteina pojavljata v obeh CA področjih in dentatnem girusu (na sl. 21 SIT 7, sl. 24 SINKRIP), vendar ne na istem mestu. Signal za protein SIT 7 (sl. 27) je izrazito prisoten v mahovitih vlaknih, radiatni plasti vseh treh CA področij ter polimorfne in molekularne sloje dentatnega girusa (DG), v piramidalni plasti CA področij in granularnem sloju DG pa malo manj. Protein SINKRIP je, ravno obratno (sl. 29), izrazito prisoten v piramidalni plasti CA področij in granularnem sloju DG, manj v radiatni plasti CA področij, polimorfne in molekularne sloje DG ter mahovitih vlaknih. Naši rezultati (sl. 27) se skladajo z rezultati drugih raziskav (Sugita in sod., 2001), kjer je bilo ugotovljeno, da je SIT 7 izrazito prisoten v mahovitih vlaknih hipokampusa in zaznan v nevropilu, predvsem v izrastkih nevronov. V predelu nevropila se sproščajo sinaptični vezikli z neurotransmiterji. V hipokampusnih nevronih (piramidalnih in granularnih celicah) so to acetilholin, γ -aminomaslena kislina (GABA) in glutamat (Giovannini in sod., 2001), v internevronih pa GABA (Freund in Buzsáki, 1996) - sklepali bi lahko, da SIT 7 sodeluje pri njihovem sproščanju. Granularne celice omogočajo brstenje mahovitih vlaken, pojav veziklov (Rekart in sod., 2007) in zaradi prisotnosti SIT 7 na tem področju lahko postavimo hipotezo, da ima SIT 7 pomembno vlogo pri omogočanju brstenja mahovitih vlaken. SIT 7 v prejšnjih raziskavah (Sugita in sod., 2001) ni bil prisoten v somah hipokampusnih nevronov, kar se tudi sklada z rezultati naše raziskave (sl. 27). V somah granularnih celic in piramidalnih nevronov smo dokazali močno prisotnost proteina SINKRIP (sl. 29) in tudi v določenih izrastkih teh celic v bližini som, ne pa v ostalem nevropilu. Prisotnost proteina SINKRIP v dendritih je bila do sedaj potrjena tudi v cerebelarnih Purkinjejevih celicah in drugih nevronih možganske skorje (Bannai in sod., 2004), protein SINKRIP pa v hipokampusnih področjih ni vezan na mahovita vlakna, zato lahko domnevamo, da SINKRIP za razliko od SIT 7 nima neposredne vloge pri pojavu dolgoročnega spomina. Prisotnost proteina SINKRIP v somah hipokampusnih nevronov so dokazali že v prejšnjih raziskavah (Bannai in sod., 2004), v naši raziskavi smo to potrdili (sl. 29) in predvidevamo, da sodeluje pri znotrajceličnem prenosu specifičnih mRNA v dendrite hipokampusnih nevronov.

5. 1.1.2 Skorja velikih možganov

Oba proteina se pojavljata v skorji velikih možganov (na sl. 21 SIT 7, sl. 24 SINKRIP), a tudi ne na istem mestu. Najbolj je SIT 7 prisoten v nevropilu molekularne plasti (sl. 28b), to je najbolj zunanja plast, kjer je v največ izrastkov (apikalnih dendritov) piramidastih nevronov in kolateral različnih nevronov, ki tvorijo sinapse s temi dendriti. Ko pride v celico signal, presinaptična celica iz aksona sprosti glutamat. Sklepamo lahko, da SIT 7 sodeluje pri sproščanju glutamata iz aksonov teh celic. Seveda pa so v nevropilu celice glije. Omeniti velja astrocite, saj na njih najdemo receptorje za glutamat približno v enaki gostoti kot na živčnih celicah. Zraven glutamata so na astrocitih dokazali tudi transportne proteine za druge neurotransmiterje, npr. GABA, glicin in biogene amine (Križan, 2001). Proteini sinaptičnega

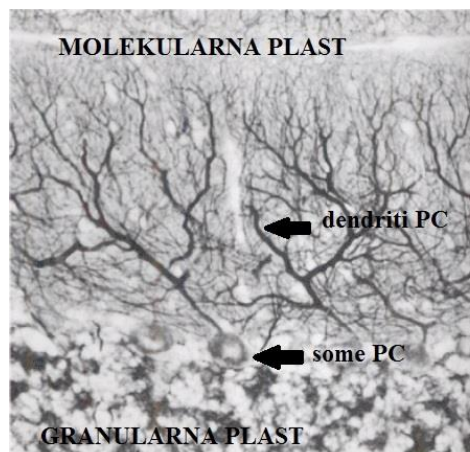
vezikla in presinaptične membrane astrocitov so podobni kot pri nevronih in njihova vloga je enaka. Pri astrocitih najdemo sinaptobrevin 2, sintaksin in SNAP-23 (Montana in sod., 2006), za prenos veziklov pa sta pomembna Rab4 and Rab5 (Potokar in sod., 2012). SIT 7 prav tako najdemo v astrocitih, vendar njegova vloga v njih ni znana. Vlogo sproščanja glutamata ima v astrocitih SIT 4, za SIT 7 to ni znano. Nekatere raziskave (Mittelstead in sod., 2009) na astrocitih v hipokampusu samo nakazujejo, da se SIT 7 pojavlja skupaj s SIT 11. V tej raziskavi je zanimiv podatek, da so tisti astrociti, ki niso izražali SIT 7, izražali tako SIT 1 kot SIT 4. Ker so astrociti v nevpilu, sklepamo, da SIT 7 sodeluje pri eksocitozi in endocitozi nevrottransmitterjev iz teh celic. Raziskave kažejo (Kreft in sod., 2004), da se eksocitoza veziklov razlikuje pri astrocitih in nevronih glede na kapacitivnost membrane. Pri astrocitih je Ca^{2+} odvisna sprememba približno 100-krat počasnejša kot pri nevronih. SINKRIP je v skorji velikih možganov najbolj prisoten v somah piramidastih nevronov, je pa prisoten tudi v somah celic drugih plasti (v somah granularnih celic (sl. 30b)). Domnevamo lahko, da v teh celicah sodeluje pri znotrajceličnem prenosu specifičnih mRNA v dendrite nevronov tega področja.

5. 1.1.3 Striatum

V striatumu smo dokazali prisotnost obeh proteinov (na sl. 22 SIT 7, sl. 25 SINKRIP), sta pa prisotna na različnih mestih tega področja. SIT 7 je prisoten v nevpilu, ne pa tudi v somah nevronov matriksa (sl. 28d). V matriksu striatuma so prisotni nevroni posredne in neposredne poti, ki so GABAergični, internevroni pa so holinergični. Ti izločajo v predelu izrastkov različne nevrottransmitterje: kalretinin, parvalbumin, somatostatin in neuropeptid Y (Gerfen in Surmeier, 2011). SIT 7 morda sodeluje pri njihovem izločanju. Sklepamo, da SINKRIP, ki je v somah celic matriksa (sl. 30d), v teh celicah sodeluje pri znotrajceličnem prenosu specifičnih mRNA v dendrite nevronov.

5. 1.1.4 Skorja malih možganov

V skorji malih možganov sta prav tako prisotna oba proteina (na sl. 23 SIT 7, sl. 26 SINKRIP). Glede na naše rezultate imunohistokemičnega barvanja sta oba prisotna v Purkinjejevih celicah (sl. 34), kar je precej zanimivo. Zaradi visoke stopnje kolokalizacije proteinov v somah teh celic (sl. 35 D) lahko delno potrdimo našo prvo hipotezo. To nakazuje na možno vključenost SIT 7 pri prenosu mRNA v dendrite Purkinjejevih celic. To sklepamo zaradi same zgradbe Purkinjejevih celic prikazane na spodnji sliki, sl. 37. Glede na to, da obarvani izrastki Purkinjejevih celic v naši raziskavi segajo v molekularno plast (sl. 36), sklepamo, da sta oba proteina prisotna v dendritih.



Slika 37: Zgradba skorje malih možganov. Barvanje z MAP2 proteinom, ki je specifičen za dendrite: molekularna ter granularna plast in plast s somami Purkinjejevih celic. Dendriti Purkinjejevih celic segajo v molekularno plast (prilagojeno po Kandel in sod., 2000: 72)

Njuna prisotnost se razlikuje v ostalih dveh delih skorje malih možganov, molekularni in granularni plasti. Dokazali smo, da se SIT 7 najmočneje pojavlja v nevropilu molekularne plasti, kjer so prisotni predvsem dendriti Purkinjejevih celic in vzporedna vlakna granularnih celic (sl. 28h). Lahko omenimo, da je interakcija med Purkinjejevimi celicami in vzporednimi vlakni ključna za ustvarjanje spomina (D'Angelo, 2014). Predvidevamo, da ima zaradi pojavljanja v nevropilu molekularne plasti SIT 7 vlogo pri eksocitozi sinaptičnih veziklov z nevrottransmitterjem GABA (Bear in sod., 2006) iz trnov na dendritih Purkinjejevih celic, ki so področje sinaptičnih povezav Purkinjejevih celic z drugimi celicami (Gray, 1961). Lahko gre tudi za sproščanje iz kolateral oz., da se SIT 7 sintetizira v somah granularnih celic in potuje do sinaps, ki jih tvorijo te kolaterale z dendriti Purkinjejevih celic. Protein SINKRIP je prisoten le v somah in izrastkih celic molekularnih plasti (verjetno so to zvezdaste ter košaričaste internevrnalne celice) ter izrastkih Purkinjejevih celic, ne pa tudi v ostalem nevropilu (sl. 30f). Torej sklepamo, da ni prisoten ali pa je manj v celotnem dendritičnem drevesu Purkinjejevih celic, saj je le-to zelo razvejano in bi se moralo močneje barvati. Najmočneje je prisoten v granularni plasti, verjetno predvsem v somah granularnih in Golgijevih internevrnalnih celic. Domnevamo, da ima v teh celicah vlogo pri znotrajceličnem prenosu specifičnih mRNA v dendrite.

5. 1.1.5 Ostala anatomsko področja

Preučevana proteina se pojavljata še v piriformnem korteksu in olfaktornem tuberkulu striatuma. V piriformnem korteksu signal za SIT 7 najbolj izstopa v sloju 1 in 3 (sl. 21), signal za SINKRIP pa v plasti 2 (sl. 24). Enako je v olfaktornem tuberkulu: signal za SIT 7 je močen predvsem v plasti 1 in 3 (sl. 22), šibek pa v plasti 2. Pri proteinu SINKRIP je ravno obratno (sl. 25), v plasti 2 piriformnega korteksa je namreč največja koncentracija glutamatnih nevronov z gostimi jedri (Bekkers in Suzuki, 2013), podobno pri olfaktornem tuberkulu (Wesson in Wilson, 2011). Njuno pojavljanje se ne prekriva, zato ne moremo sklepati, da gre za isto funkcijo v teh predelih. SIT 7 je prisoten predvsem v nevropilu (več

ga je v plasteh 1 in 3), kjer so tudi izrastki celic in lahko predvidevamo, da sodeluje pri eksocitozi predvsem glutamata (ter drugih nevrottransmitterjev, npr. dopamina), SINKRIP pa pri znotrajceličnem prenosu specifičnih mRNA v dendrite, saj je prisoten v predelu, kjer je največ som nevronov, v plasti 2 (sl. 24). Oba proteina najdemo v amigdaloidnih, talamičnih in hipotalamičnih jedrih (na sl. 21 SIT 7, sl. 24 SINKRIP). Amigdaloidna jedra vsebujejo nevrone z nevrottransmitterji: kortikotropin-sproščujoči faktor, somatostatin in nevrotenzin (Davis, 1992) in lahko bi domnevali, da SIT 7 sodeluje pri njihovem izločanju. V talamičnih jedrih, katerih nevroni oživčujejo celice možganske skorje, SIT 7 domnevno sodeluje pri izločanju nevrottransmitterjev GABA in glutamat, v hipotalamičnih jedrih pa pri izločanju nevrottransmitterja iz celic REM (*angl.* "non-REM-on cells") ter drugih: neuropeptida Y, dopamina in histamina (Kandel in sod., 2000). Za protein SINKRIP lahko predvidevamo, da v teh anatomskih področjih sodeluje pri znotrajceličnem prenosu mRNA v dendrite nevronov. Tudi v izvenkortikalnih jedrih malih možganov in olivarnem jedru (na sl. 23 SIT 7, sl. 26 SINKRIP) se pojavljata oba proteina. Lahko bi domnevali, da SIT 7 sodeluje pri eksocitozi nevrottransmitterja glutamata iz prehodnih (*angl.* "relay cells") celic, nevrottransmitterja GABA iz GABAergičnih in glicina, ki je bil kot nevrottransmitter zaznan pri miših (Voogd in sod., 2013) tako v nevronih kot tudi astrocitih olivarnega jedra (Stephan in Friauf, 2014). Glede na to, kaj je znano glede vloge proteina SINKRIP, tudi za to anatomsko področje lahko domnevamo, da sodeluje pri znotrajceličnem prenosu specifičnih mRNA v dendrite nevronov.

5. 1.2 NIZKA STOPNJA KOLOKALIZACIJE PROTEINOV

Raziskovalci (Bolte in Cordelieres, 2006) pravijo, da sta lokacija proteina v celici in njegova vloga močno povezani, zato je lokacija izredno pomembna za razumevanje vloge določenega proteina v biološkem procesu. Kolokalizacija, prostorsko sovpadanje lokalizacij dveh ali več različnih proteinov v preparatu (Bolte in Cordelieres, 2006), dokazuje, da sta vlogi (funkciji) teh dveh proteinov tesno povezani. Kolokalizacijo smo analizirali s pomočjo metode dvojnega imunofluorescenčnega označevanja in z mikroskopom AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome. Rezultati naše raziskave kažejo, da je stopnja kolokalizacije preučevanih proteinov zelo nizka v večini analiziranih anatomskih področij: v hipokampusu (sl. 31), skorji velikih možganov (sl. 32), striatumu (sl. 33), v granularni in molekularni plasti skorje malih možganov (sl. 35). V somah Purkinjejevih celic se pod svetlobnim mikroskopom oba proteina pojavljata skupaj (sl. 34). Kolokalizacijo smo potrdili (sl. 35 D) in sklepamo, da sta oba proteina prisotna tudi v dendritih teh celic. Ker smo v raziskavi z analizo kolokalizacije v večini področij dokazali zelo nizko stopnjo kolokalizacije (graf 1) med proteinoma v možganih podgane, sklepamo, da med njima verjetno ne pride do fiziološke interakcije in SIT 7 nima pomembne vloge pri prenosu mRNA v dendrite nevronov, vsaj v povezavi s proteinom SINKRIP ne. Vrednotenje kolokalizacije je glede na različna mnenja raziskovalcev precej vprašljivo. Ko sta fluorescenčna signala neodvisna in ni kolokalizacije, je vrednost Pearsonovega koeficienta 0. Pearsonovi koeficienti so bili v našem primeru tudi negativni (graf 1). Nekateri avtorji (Zinchuk in sod., 2007) so mnenja,

da pri popolni izključitvi fluorescenčnega signala na sliki, ne dobiš vrednosti -1, in je v primeru slik vrednotenje kolokalizacije nezanesljivo; potrebno je izračunati še Mandersove koeficiente. Drugi (Barlow in sod., 2010) so mnenja, da je za vrednotenje kolokalizacije boljša uporaba enega samega koeficienta (ne računanje še drugih koeficientov) in so tudi negativne vrednosti PK, kakor v našem primeru, zanesljive in uporabne.

5. 1.3 UPORABA METODE DVOJNEGA IMUNOFLUORESCENČNEGA OZNAČEVANJA

Za analizo kolokalizacije proteinov SIT 7 in SINKRIP smo uporabili metodo dvojnega imunofluorescenčnega označevanja. Uporaba te metode ima tudi nekaj pomanjkljivosti. Za možgansko tkivo je značilna avtofluorescenca možganskega tkiva (avtofluorescenčno ozadje), ki moti imunofluorescenčno detekcijo proteinov. Ti se relativno šibko sintetizirajo v tkivu oz. v celici. Omejitev metode imunofluorescence na tkivu, fiksiranem z aldehidi, je nedostopnost antigenov za vezavo protiteles. Fiksacija tkiva z aldehidi namreč zamreži proteine (*angl.* "cross-linking"), tako da nastanejo metilenski mostički med aminokislinami proteinov (Fox in sod., 1985), in tako onemogoči vezavo protiteles na epitope antigenov. Znanih je kar nekaj metod za odkrivanje epitopov oz. antigenov (*angl.* "antigen retrieval"), pri vsaki od metod pa je odkrivanje antigenov omejeno, saj je potrebno zagotoviti, da so poškodbe tkiva oz. antigenov pri tem minimalne (D'Amico in sod., 2009). Obstaja verjetnost, da z metodo imunofluorescence zaradi avtofluorescenčnega ozadja in zamreženosti antigenov v tkivu nismo dobili točne lokacije in kolokalizacije preučevanih proteinov.

6 SKLEPI

Naša prva hipoteza je bila, da je protein SINKRIP kolokaliziran s proteinom sinaptotagmin 7 v nevronih možganov podgane. Hipotezo smo delno potrdili. Z imunohistokemičnim in imunofluorescenčnim barvanjem je vidno, da se oba proteina pojavljata skupaj v Purkinjejevih celicah (somah in dendritih) skorje malih možganov. Stopnja kolokalizacije v somah teh celic je relativno visoka. Hipoteze za ostala možganska področja ne moremo potrditi. Stopnja kolokalizacije proteinov v hipokampusu, skorji velikih možganov, striatumu, v granularni in molekularni plasti skorje malih možganov je nizka in tako sklepamo, da sinaptotagmin 7 najverjetneje v preučevanih možganskih regijah (razen sloja Purkinjejevih celic) ne sodeluje pri transportu mRNA v dendrite, katerega uravnava protein SINKRIP.

Druga hipoteza je bila, da sta proteina sinaptotagmin 7 in SINKRIP prisotna v večini anatomskih področij možganov podgane. Hipotezo smo potrdili. Signal za sinaptotagmin 7 je najmočnejši v nevroplu, za SINKRIP pa v somah celic preučevanih anatomskih področij.

7 POVZETEK

Sinaptotagmin 7 je transmembranski protein iz družine 17 sinaptotagminov, ki so v možganih podgane vpleteni v procese uravnavanja od Ca^{2+} odvisne eksocitoze in endocitoze sinaptičnih in večjih optično gostih veziklov. Sinaptotagmin 7 sodeluje pri počasni in nesinhroni eksocitozi nevronov, njegovo pojavljanje pa kaže na njegovo vlogo tudi pri transportu veziklov v njihove dendrite. Sinaptotagmin 7 sodeluje pri fagocitozi, popravilu membrane mišične celice in izločanju inzulina iz sekretornih β -celic trebušne slinavke. O vlogi proteina sinaptotagmin 7 v nevronih možganov ni veliko znanega, veliko poskusov je bilo narejenih na drugih celicah in tkivih in tako obstaja malo relevantnih raziskav v povezavi z našo raziskavo. Znano je, da ima pomembno vlogo pri sproščanju dopamina iz dendritov v črnem jedru možganov. V živčevju ima sinaptotagmin 7 domnevno vlogo popravljanja degeneriranih nevronov, za katere je med drugim značilna okvarjena sposobnost tvorbe sinaps. Za nastajanje novih ter delovanje že obstoječih sinaps je pomemben prepis nekaterih molekul mRNA za proteine, ki so sestavni del sinaps. Vloga proteina SINKRIP je povezana s prepisom mRNA, saj sodeluje pri znotrajceličnem prenosu mRNA v dendrite nevronov. mRNA se prenašajo s pomočjo granul mRNA, na katere je SINKRIP vezan. Interakcijo med njima so dosedaj pokazali samo *in vitro*. Mi smo to preverili še *in vivo* in bi v primeru njune kolokalizacije lahko potrdili našo hipotezo o vključenosti proteina sinaptotagmin 7 pri prenosu mRNA v dendrite nevronov. Namen magistrske naloge je bil raziskati kolokalizacijo proteinov v nevronih v različnih regijah možganov: v treh področjih hipokampusa (CA1, CA3 in dentatnem girusu), skorji velikih možganov, striatumu ter v skorji malih možganov (granularni in molekularni plasti ter plasti Purkinjejevih celic) laboratorijske podgane (*Rattus norvegicus*). V primeru, da bi proteina kolokalizirala, bi obstajala možnost za njuno fiziološko interakcijo. To smo ugotavljali z metodo imunofluorescenčne analize.

Z imunohistokemično analizo smo najprej lokalizirali posamezen protein, potem pa na podlagi ugotavljanja prisotnosti v možganskih področjih sklepali na morebitno vlogo proteinov. Intaktne možgane treh različnih podgan smo transkardialno perfundirali s fiksativom, jih narezali ter pobarvali z metodo imunohistokemije z uporabo specifičnih protiteles proti proteinoma sinaptotagmin 7 in SINKRIP. Glede na predhodne raziskave lahko domnevamo, da imata proteina različne funkcije v področjih, kjer smo ju zasledili. Sinaptotagmin 7 najverjetneje v vsakem od anatomskih področij kjer je, sodeluje pri izločanju neurotransmiterjev iz celic posameznega anatomskega področja, SINKRIP pa pri znotrajceličnem prenosu specifičnih mRNA v dendrite celic. Signal za protein sinaptotagmin 7 je izrazito prisoten v mahovitih vlaknih, radiatni plasti vseh treh CA področij hipokampusa ter polimorfne in molekularne plasti dentatnega girusa (DG), v piramidalni plasti CA področij in granularnem sloju DG pa malo manj. Protein SINKRIP je, ravno obratno, izrazito prisoten v piramidalni plasti CA področij in granularnem sloju DG, manj pa v radiatni plasti CA področij, polimorfne in molekularne plasti DG ter mahovitih vlaknih. V skorji velikih možganov je sinaptotagmin 7 prisoten v nevroplasti molekularne plasti, SINKRIP pa v somah piramidastih nevronov in somah celic drugih plasti, tudi somah granularnih celic. V striatumu je sinaptotagmin 7 najbolj prisoten v nevroplasti, ne pa tudi somah celic matriksa,

SINKRIP pa je najbolj prisoten ravno v somah teh celic. V malih možganih se sinaptotagmin 7 najmočneje pojavlja v nevpilni molekularni plasti, SINKRIP je prisoten le v somah in izrastkih celic molekularnih plasti, ne pa tudi v ostalem nevpilu. Najmočneje je protein SINKRIP prisoten v granularni plasti predvsem verjetno v somah celic te plasti. Zanimivo je, da se oba proteina pojavljata v somah Purkinjejevih celic. Oba preučevana proteina se pojavljata tudi v piriformnem korteksu in olfaktornem tuberkulu striatuma. V piriformnem korteksu signal za sinaptotagmin 7 najbolj izstopa v sloju 1 in 3, signal za SINKRIP v plasti 2. Tudi v olfaktornem tuberkulu je signal za sinaptotagmin 7 močen predvsem v plasti 1 in 3, šibek v plasti 2, pri proteinu SINKRIP pa je ravno obratno. Oba proteina najdemo v amigdaloidnih, talamičnih in hipotalamičnih jedrih, pojavljata se še v izvenkortikalnih jedrih malih možganov in olivarnem jedru. Vsebnost teh proteinov je manjša v mieliziranih anatomskih področjih: belini, kaloznem korpusu, interni kapsuli, strijah striatuma, fornixu, mamilotalamičnem traktu, obraznem živcu in jedrih obraznega živca. V teh področjih so prisotne povezave različnih struktur možganov in mielizirana vlakna, tako da predvidevamo, da noben preučevan protein ni ključen pri povezavah različnih delov možganov. Signal za proteina je šibek v lateralnih ventriklih (ker sta napolnjena s cerebrospinalno tekočino, ependimalne celice pa ne izločajo nevrottransmiterjev) ter v akumbensu.

V drugem delu raziskave smo uporabili iste možgane podgan, že transkardialno perfundirane s fiksativom in narezane, vendar smo jih tokrat pobarvali z metodo dvojne imunofluorescence. Uporabili smo specifična protitelesa proti proteinoma SINKRIP in sinaptotagmin 7. Z uporabo fluorescenčnega mikroskopa AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome smo analizirali kolokalizacijo obeh proteinov v štirih različnih regijah podganjih možganov in jo ovrednotili s programom ImageJ z vmesnikom JACoP. Stopnjo kolokalizacije smo ovrednotili tako, da smo izračunali vrednosti Pearsonovega koeficienta (PK) na sliki. V primeru skorje malih možganov smo izračunali vrednosti koeficienta kolokalizacije samo dela slike (območje analize), some Purkinjejevih celic pa smo analizirali z obkroževanjem. Podatke smo prikazali kot povprečne vrednosti $PK \pm SD$ posameznega področja. Povprečna vrednosti PK v CA1 področju je $-0,25 (\pm 0,037)$, v CA3 področju $-0,09 (\pm 0,025)$, v dentatnem girusu hipokampusa $-0,152 (\pm 0,042)$, v skorji velikih možganov $-0,06 (\pm 0,04)$, v striatumu $0,04 (\pm 0,05)$, v somah Purkinjejevih celic $0,55 (\pm 0,059)$, v molekularnem sloju $0,07 (\pm 0,042)$ in v granularnem sloju $0,16 (\pm 0,028)$. Ti rezultati naše raziskave kažejo, da je stopnja kolokalizacije proteinov v veliki večini preučevanih anatomskih področij nizka.

V raziskavi smo dopolnili znanje o lokalizaciji proteinov sinaptotagmin 7 in predvsem SINKRIP (o katerem je zelo malo znanega), ki je bistvena za določanje funkcije proteinov v fizioloških razmerah. Sklepamo, da se proteina, sinaptotagmin 7 in SINKRIP, pojavljata v večini anatomskih področij možganov podgane, stopnja njune kolokalizacije v večini preučevanih področjih pa je nizka. Zaradi nizke stopnje kolokalizacije sinaptotagmin 7 najverjetneje ne sodeluje pri transportu mRNA v dendrite, ki ga uravnava protein SINKRIP. Izjema je le plast Purkinjejevih celic v skorji malih možganov, kjer visoka stopnja kolokalizacije v somah in pojavljanje obeh proteinov v dendritih teh celic nakazujeta na možno vključenost proteina sinaptotagmin 7 pri transportu mRNA v dendrite teh celic.

8 VIRI

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. 1994. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York, Garland Publishing: 1294 str.
- Albin R. L., Young A. B., Penney J. B. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences*, 12, 10: 366–375
- Anderson P., Kedersha N. 2006. RNA granules. *The Journal of Cell Biology*, 172, 6: 803–808
- Andrews N. W., Chakrabarti S. 2005. There's more to life than neurotransmission: the regulation of exocytosis by synaptotagmin VII. *Trends in Cell Biology*, 15, 11: 626–631
- Arantes R. M. E., Andrews N. W. 2006. A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 26, 17: 4630–4637
- Bacaj T., Wu D., Yang X., Morishita W., Zhou P., Xu W., Malenka R. C., Südhof T. C. 2013. Synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 trigger synchronous and asynchronous phases of neurotransmitter release. *Neuron*, 80, 4: 947–959
- Bekkers J. M., Suzuki N. 2013. Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. *Trends in neurosciences*, 36, 7: 429–438
- Bannai H., Fukatsu K., Mizutani A., Natsume T., Iemura S., Ikegami T., Inoue T., Mikoshiba K. 2004. An RNA-interacting Protein, SYNCRIP (Heterogeneous Nuclear Ribonuclear Protein Q1/NSAP1) is a Component of mRNA Granule Transported with Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 51: 53427–53434
- Barlow A. L., MacLeod A., Noppen S., Sanderson J., Guérin C. J. 2010. Colocalization analysis in fluorescence micrographs: Verification of a more accurate calculation of Pearson's correlation coefficient. *Microscopy & Microanalysis*, 16, 6: 710–724
- Batish M., van den Bogaarda P., Kramera F. R., Tyagi S. 2012. Neuronal mRNAs travel singly into dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 12: 4645–4650
- Bear F. M., Connors B. W., Paradiso M. A. 2006. *Neuroscience: Exploring the brain*. 3rd ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 857 str.

- Bolte S., Cordelieres F. P. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224, 3: 213–232
- Brodal P. 2010. *The central nervous system: Structure and function*. 4th ed. New York, Oxford University Press: 606 str.
- Burgoyne R. D., Morgan A. 2003. Secretory granule exocytosis. *Physiological Reviews*, 83, 2: 581–632
- Candelario K. M., Steindler D. A. 2014. The role of extracellular vesicles in the progression of neurodegenerative disease and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 20, 7: 368–374
- Chakrabarti S., Kobayashi K. S., Flavell R. A., Marks C. B., Miyake K., Liston D. R., Fowler K. T., Gorelick F. S., Andrews N. W. 2003. Impaired membrane resealing and autoimmune myositis in synaptotagmin VII-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 162, 4: 543–549
- Choi K. S., Mizutani A., Lai M. M. C. 2004. SYNCRIP, a member of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein family, is involved in mouse hepatitis virus RNA synthesis. *Journal of Virology*, 78, 23: 13153–13162
- Cooper G. M., Hausman R. E. 2004. *The Cell: A molecular approach*. 3rd ed. Washington, Sinauer Associates: 713 str.
- Crino P. B., Eberwine J. 1996. Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron*, 17, 6: 1173–1187
- Czaplinski K. 2014. Understanding mRNA trafficking: Are we there yet? *Seminars in cell & developmental biology*, 32: 63–70
- Czibener C., Sherer N. M., Becker S. M., Pypaert M., Hui E., Chapman E. R., Mothes W., Andrews N. W. 2006. Ca²⁺ and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes. *The Journal of Cell Biology*, 174, 7: 997–1007
- Deshler J. O., Highett M. I., Abramson T., Schnapp B. J. 1998. A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Current biology*, 8, 9: 489–496.
- David H. N. 2009. Towards a reconceptualization of striatal interactions between glutamatergic and dopaminergic neurotransmission and their contribution to the production of movements. *Current neuropharmacology*, 7, 2: 132–141

- Davis M. 1992. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual review of neuroscience*, 15, 1: 353–375
- D'Amico F., Skarmoutsou E., Stivala F. 2009. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of Immunological Methods*, 341, 1: 1–18
- D'Angelo E. 2014 The organization of plasticity in the cerebellar cortex: from synapses to control. *Progress in Brain Research*, 210: 31–58
- Dunn K. W., Kamocka M. M., McDonald J. H. 2011. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology*, 300, 4: C723–C742
- Duque G. A., Fukuda M., Descoteaux A. 2014. Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. *The Journal of Immunology*, 190, 4: 1737–1745
- Fox C. H., Johnson F. B., Whiting J., Roller P. P. 1985. Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33, 8: 845–53
- Freund T. F., Buzsáki G. Y. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6, 4: 347–470
- Fulop T., Radabaugh S., Smith C. 2005. Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *The Journal of Neuroscience*, 25, 32: 7324–7332
- Ekici M., Hohl M., Schuit F., Martinez-Serrano A., Thiel G. 2008. Transcription of Genes Encoding Synaptic Vesicle Proteins in Human Neural Stem Cells; Chromatin accessibility, histone methylation pattern, and the essential role of the rest. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 14: 9257–9268
- Flannery A. R., Czibener C., Andrews N. W. 2010. Palmitoylation-dependent association with CD63 targets the Ca²⁺ sensor synaptotagmin-VII to lysosomes. *The Journal of Cell Biology*, 191, 3: 599–613
- Fukuda M. 2006. The role of Synaptotagmin and synaptotagmin-like protein (Slp) in regulated exocytosis. *Molecular Mechanisms of Exocytosis* Regazzi R. (ed.). New York, Springer: 42–61
- Fukuda M., Kanno E., Satoh M., Saegusa C., Yamamoto A. 2004. Synaptotagmin VII Is Targeted to Dense-core Vesicles and Regulates Their Ca²⁺ dependent Exocytosis in PC12 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 50: 52677–52684

- Fukuda M., Ogata Y., Saegusa C., Kanno E., Mikoshiba K. 2002. Alternative splicing isoforms of synaptotagmin VII in the mouse, rat and human. *Biochemical Journal*, 365: 173–180
- Gao Z., Reavey-Cantwell J., Young R. A., Jegier P., Wolf B. A. 2000. Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca^{2+} induced insulin secretion in pancreatic islet β -cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 46: 36079–36085
- Gauthier B. R., Duhamel D. L., Iezzi M., Theander S., Saltel F., Fukuda M., Wehrle-Haller B., Wollheim C. B. 2007. Synaptotagmin VII splice variants α , β , and γ are expressed in pancreatic β -cells and regulate insulin exocytosis. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22, 1: 194–206
- Gerfen C. R., Surmeier D. J. 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34: 441–466
- Giovannini M. G., Rakovska A., Benton R. S., Pazzagli M., Bianchi L., Pepeu G. 2001. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience*, 106, 1: 43–53
- Glavan G., Schliebs R., Živin M. 2009. Synaptotagmins in neurodegeneration. *The Anatomical Record*, 292, 12: 1849–1862
- Glavan G., See R. E., Živin M. 2012. Differential Patterns of Synaptotagmin7 mRNA expression in rats with kainate- and pilocarpine- induced seizures. *PLoS ONE*, 7, 5: e36114: 7 str.
- Glavan G., Živin M. 2005. Differential expression of striatal synaptotagmin mRNA isoforms in hemiparkinsonian rats. *Neuroscience*, 135, 2: 145–154
- Gray E. G. 1961. The granule cells, mossy synapses and Purkinje spine synapses of the cerebellum: light and electron microscope observations. *Journal of Anatomy*, 95, 3: 345–356
- Gustavsson N., Lao Y., Maximov A., Chuang J. C., Kostromina E., Repa J. J., Li C., Radda G. K., Südhof T. C., Han W. 2008. Impaired insulin secretion and glucose intolerance in synaptotagmin-7 null mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 10: 3992–3997
- Gut A., Kiraly C. E., Fukuda M., Mikoshiba K., Wollheim C. B., Lang J. 2001. Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine β -cells: their function in insulin exocytosis. *Journal of Cell Science*, 114, 9: 1709–1716

- Gutierrez R. 2003. The GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the dentate gyrus. *Progress in Neurobiology*, 71, 5: 337–358
- Hanus C., Kochen L., tom Dieck S., Racine V., Sibarita J. B., Schuman E. M., Ehlers M. D. 2014. Synaptic control of secretory trafficking in dendrites. *Cell Reports*, 7, 6: 1771–1778
- Hirokawa N. 2006. mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *The Journal of Neuroscience*, 26, 27: 7139–7142
- Jansen R. P., Niessing D., Baumann S., Feldbrügge M. 2014. mRNA transport meets membrane traffic. *Trends in Genetics*, 30, 9, 408–417
- Kaesler-Woo Y. J., Younts T. J., Yang X., Zhou P., Wu D., Castillo P. E., Südhof T. C. 2013. Synaptotagmin-12 phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase is essential for hippocampal mossy fiber LTP. *The Journal of Neuroscience*, 33, 23: 9769–9780
- Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. 2000. *Principles Of Neural Science*. 4th ed. New York, McGraw-Hill Companies: 1229 str.
- Kennedy M. B. 2000. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*, 290, 5492: 750–754
- Kreft M., Stenovec M., Rupnik M., Grilc S., Kržan M., Potokar M., Pangršič T., Haydon P. G., Zorec R. 2004. Properties of Ca²⁺-dependent exocytosis in cultured astrocytes. *Glia*, 46, 4: 437–445
- Kreutz M. R., Sala C. 2012. *Synaptic Plasticity: Dynamics, development and disease*. Wien, Springer: 618 str.
- Križan M. 2001. Funkcija Astrocitov. *Zdravniški vestnik*, 70: 553–559
- Liu H., Bai H., Hui E., Yang L., Evans C. S., Wang Z., Kwon S. E., Chapman E. R. 2014. Synaptotagmin VII functions as a Ca²⁺ sensor for synaptic vesicle replenishment. *eLIFE*, 3: e01524: 18 str.
- Marqueze B., Berton F., Seagar M. 2000. Synaptotagmins in membrane traffic: Which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie*, 82, 5: 409–420
- Maximov A., Lao Y., Li H., Chen X., Rizo J., Sørensen J. B., Südhof T. C. 2007. Genetic analysis of synaptotagmin-7 function in synaptic vesicle exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 10: 3986–3991

- Mendez J. A., Bourque M. J., Fasano C., Kortleven C., Trudeau L. E. 2011. Somatodendritic dopamine release requires synaptotagmin 4 and 7 and the participation of voltage-gated calcium channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 27: 23928–23937
- Mittelsteadt T., Seifert G., Álvarez-Barón E., Steinhäuser C., Becker A. J., Schoch S. 2009. Differential mRNA expression patterns of the synaptotagmin gene family in the rodent brain. *Journal of Comparative Neurology*, 512, 4: 514–528
- Mizutani A., Fukuda M., Iбата K., Shiraishi Y., Mikoshiba K. 2000. SYNCRIP, a Cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 13: 9823–9831
- Moghadam P. K., Jackson M. B. 2013. The functional significance of synaptotagmin diversity in neuroendocrine secretion. *Frontiers of Endocrinology*, 4, 124: 7 str.
- Montag-Sallaz M., Montag D. 2003 Learning-induced arg 3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. *Learning & Memory* 10, 2: 99–107
- Montana V., Malarkey E. B., Verderio C., Matteoli M., Parpura V. 2006. Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia*, 54, 7: 700–715
- Monterrat C., Grise F., Benassy M. N., Hemar A., Lang J. 2007. The calcium-sensing protein synaptotagmin VII is expressed on different endosomal compartments in endocrine, neuroendocrine cells or neurons but not on large dense core vesicles. *Histochemie Cell Biology*, 127, 6: 625–632
- Nelson D. L., Cox M. M. 2005. Principles of biochemistry. 4th ed. New York, W. H. Freeman & Company: 1119 str.
- Osborne S. L., Wallis T. P., Jimenez J. L., Gorman J. J., Meunier F. A. 2007. Identification of secretory granule phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate interacting proteins using an affinity pulldown strategy. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 7: 1158–1169
- Pal R., Živin M., Milutinovič A., Jernej B., Glavan G. 2007. Effect of apomorphine on striatal synaptotagmin 7 mRNA levels in reserpinized rats. *Neuroscience Letters*, 424, 3: 194–198
- Paxinos G., Watson C. 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Elsevier Academic Press: 210 str.
- Pearsall J. Neuropil. Oxford Dictionaries Online. Oxford University Press. <http://www.oxforddictionaries.com/definition/english/neuropil> (30. 10. 2014)

- Pollard T. D., Earnshaw W. C. 2004. *Cell biology*. Philadelphia, Elsevier Science: 813 str.
- Potokar M., Lacovich V., Chowdhury H. H., Kreft M., Zorec R. 2012. Rab4 and Rab5 GTPase are required for directional mobility of endocytic vesicles in astrocytes. *Glia*, 60, 4: 594–604
- Rekart J. L., Sandoval C. J., Bermudez-Rattoni F., Routtenberg A. 2007. Remodeling of hippocampal mossy fibers is selectively induced seven days after the acquisition of a spatial but not a cued reference memory task. *Learning & Memory*, 14, 6: 416–421
- Segovia M., Ales E., Angeles Montes M., Bonifas I., Jemal I., Lindau M., Maximov A., Südhof T. C., Alvarez de Toledo G. 2010. Push-and-pull regulation of the fusion pore by synaptotagmin-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 44: 19032–19037
- Schnapp B. J., Arn E. A., Deshler J. O., Highett M. I. 1997. RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Cell & Developmental Biology*, 8, 6: 529–540
- Schonn J. S., Maximov A., Lao Y., Südhof T. C., Sørensen J. B. 2008. Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca^{2+} sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 10: 3998–4003
- Sugita S., Han W., Butz S., Liu X., Fernandez-Chacon R., Lao Y., Südhof T. C. 2001. Synaptotagmin VII as a Plasma Membrane Ca^{2+} Sensor in Exocytosis. *Neuron*, 30, 2: 459–473
- Sunahara R. K., Dessauer C. W., Gilman A. G. 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36, 1: 461–480
- Stephan J., Friauf E. 2014. Functional analysis of the inhibitory neurotransmitter transporters GlyT1, GAT-1, and GAT-3 in astrocytes of the lateral superior olive. *Glia*, 62, 12: 1992–2003
- Strgar J. 2002. *Biologija; Zbirka, tematski leksikon*. Tržič, Učila internacional: 489 str.
- Südhof T. C., Rizo J. 2011. Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 12: a005637: 15 str.
- Tang V. W. 2006. Proteomic and bioinformatic analysis of epithelial tight junction reveals an unexpected cluster of synaptic molecules. *Biology Direct*, 1, 37, doi: 10.1186/1745-6150-1-37: 30 str.

- Tsuboi T., Fukuda M. 2007. Synaptotagmin VII modulates the kinetics of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Genes to Cells*, 12, 4: 511–519
- Virmani T., Han W., Liu X., Südhof T. C., Kavalali E. T. 2003. Synaptotagmin VII splice variants differentially regulate synaptic vesicle recycling. *European Molecular Biology Organization Journal*, 22, 20: 5347–5357
- von Poser C., Zhang J. Z., Mineo C., Ding W., Ying Y., Südhof T. C., Anderson R. G. W. 2000. Synaptotagmin regulation of coated pit assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 40: 30916–30924
- Voogd J., Shinoda Y., Ruigrok T. J. H., Sugihara I. 2013. Cerebellar nuclei and the inferior olivary nuclei: organization and connections. *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*, 377-436
- Zhang L., Lou D., Jiao H., Zhang D., Wang X., Xia Y., Zhang J., Xu M. 2004. Cocaine-induced intracellular signaling and gene expression are oppositely regulated by the dopamine D1 and D3 receptors. *The Journal of Neuroscience*, 24, 13: 3344–3354
- Zinchuk V., Zinchuk O., Okada T. 2007. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochemica et Cytochemica*; 40, 4: 101–111
- Wesson D. W., Wilson D. A. 2011. Sniffing out the contributions of the olfactory tubercle to the sense of smell: hedonics, sensory integration, and more? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35, 3: 655–668
- Wishart T. M., Parson S. H., Gillingwater T. H. 2006. Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65, 8: 733–773

ZAHVALA

Najprej bi se zahvalila mentorici, doc. dr. Gordani Glavan. Hvala za natančno spremljanje mojega dela, za pripravljenost prisluhniti in pomagati, za vse strokovne nasvete pri praktičnem delu in pisanju naloge ter vse prijazne in tople besede.

Posebna zahvala gre tudi asist. dr. Larisi Tratnjek in asist. dr. Tanji Višnjar. Ves čas opravljanja raziskovalnega dela sta mi stali ob strani z neprecenljivimi nasveti ter popravki in stalno pripravljenostjo za praktično pomoč v laboratoriju.

Zahvaljujem se prof. dr. Marku Živinu, ki mi je omogočil opravljanje magistrskega dela v Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete.

Prof. Tatjani Lukovnjak se zahvaljujem za lektoriranje magistrske naloge. Recenzentu prof. dr. Marku Kreftu in predsednici komisije, prof. dr. Kristini Sepčič se zahvaljujem za pregled naloge ter dane popravke in komentarje.

Nenazadnje bi se želela zahvaliti še staršema, Karmen in Marjanu Jerenko. Hvala, da sta me ves čas izobraževanja podpirala z brezpogojno ljubeznijo in mi omogočila doseganje zastavljenih ciljev.

PRILOGA

Vrednosti Pearsonovih korelacijskih koeficientov (PK)

CA1 hipokampus	n1	n2	n3	n skupaj
1	-0,35	-0,169	-0,378	
2	-0,310	-0,087	-0,306	
3	-0,348	0,068	-0,299	
4	-0,337	0,046	-0,285	
5	-0,243	0,017	-0,266	
6	-0,252	-0,231	-0,308	
7	-0,405	-0,207	-0,369	
8	-0,288	-0,024	-0,346	
9	-0,426	-0,273	-0,308	
10	-0,405	-0,221	-0,323	
PK	-0,336	-0,108	-0,319	-0,254
± SD	0,031	0,061	0,019	0,037

CA3 hipokampus	n1	n2	n3	n skupaj
1	-0,30	-0,241	-0,375	
2	-0,374	-0,240	-0,400	
3	-0,408	-0,254	-0,359	
4	-0,301	-0,194	-0,342	
5	-0,290	-0,231	-0,302	
6	-0,326	-0,317	-0,352	
7	-0,393	-0,328	-0,296	
8	-0,351	-0,210	-0,268	
9	-0,374	-0,142	-0,270	
10	-0,379	-0,237	-0,235	
PK	-0,351	-0,239	0,320	-0,090
± SD	0,023	0,026	0,027	0,025

DG hipokampus	n1
1	-0,058
2	-0,216
3	-0,071
4	-0,084
5	-0,239
6	-0,022
7	-0,187
8	-0,222
9	-0,229
10	-0,193
PK	-0,152
± SD	0,042

Skorja velikih možganov	n1	n2	n3	n skupaj
1	-0,155	-0,061	-0,079	
2	-0,193	0,063	-0,089	
3	0,114	0,035	-0,153	
4	0,182	-0,033	-0,092	
5	-0,127	0,022	-0,079	
6	-0,185	0,046	-0,033	
7	-0,185	0,003	-0,062	
8	-0,307	-0,040	-0,028	
9	-0,156	-0,062	-0,038	
10	-0,158	0,052	0,023	
PK	-0,117	0,003	-0,063	-0,059
± SD	0,070	0,025	0,023	0,039

Striatum	n1	n2	n3	n skupaj
1	0,340	0,196	-0,176	
2	-0,042	0,098	-0,175	
3	-0,121	0,030	-0,094	
4	0,136	0,137	-0,152	
5	-0,076	0,039	-0,165	
6	0,125	0,180	-0,153	
7	0,205	0,089	-0,114	
8	0,142	0,047	-0,099	
9	0,275	0,270	0,025	
10	0,253	0,077	-0,142	
PK	0,124	0,116	-0,125	-0,039
± SD	0,081	0,039	0,030	0,050

Skorja malih možganov	Granularni sloj	Some Purkinjejevih celic	Molekularni sloj
1	0,201	0,682	0,078
2	0,249	0,471	-0,021
3	0,208	0,617	0,119
4	0,146	0,56	0,189
5	0,137	0,559	0,119
6	0,059	0,573	0,044
7	0,196	0,584	-0,092
8	0,126	0,682	0,072
9	0,116	0,466	0,137
10	0,121	0,286	0,014
PK	0,156	0,548	0,066
± SD	0,028	0,059	0,042