

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marjeta LISJAK

**KARAKTERIZACIJA MEŠIČKOV Z VODNIMI  
KANALI AKVAPORINI 4**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marjeta LISJAK

**KARAKTERIZACIJA MEŠIČKOV Z VODNIMI KANALI  
AKVAPORINI 4**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**CHARACTERIZATION OF VESICLES CARRYING AQUAPORIN 4  
WATER CHANNEL**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za nevroendokrinologijo – molekularno celično fiziologijo na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je dne 6. 2. 2013 odobrila naslov magistrskega dela in za mentorja imenovala prof. dr. Roberta Zorca, za somentorico znan. sod. dr. Majo Potokar ter za recenzenta prof. dr. Marka Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Robert ZOREC

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Članica: znan. sod. dr. Maja POTOKAR

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Član: prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 8. 1. 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.

Marjeta Lisjak

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2  
DK UDK 6:577.2:543.456(043.2)=163.6  
KG vodni kanali/akvaporin 4/AQP4/AQP4b/AQP4d/AQP4e/astrociti/velikost mešičkov /superločljivostna fluorescenčna mikroskopija/SIM  
AV LISJAK, Marjeta, diplomirana biologinja (UN)  
SA ZOREC, Robert (mentor)/POTOKAR, Maja (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2015  
IN KARAKTERIZACIJA MEŠIČKOV Z VODNIMI KANALI AKVAPORINI 4  
TD Magistrsko delo (magistrski študij – 2. stopnja Strukturna in funkcionalna biologija)  
OP XI, 47 str., 2 pregl., 18 sl., 102 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Vodni kanal akvaporin 4 (AQP4) obstaja v šestih izooblikah in se po citoplazmi transportira v membrani mešičkov. V podganjih astrocitih smo raziskali lastnosti treh slabo poznanih izooblik AQP4. Namen naloge je bil oceniti velikost in delež mikrodomen z AQP4b, AQP4d in AQP4e v plazmalemi ter preveriti vpliv hipoosmotskih razmer na razporeditev mikrodomen (tj. območij z AQP4) v plazmalemi. V celice smo vnesli plazmidne DNA, ki kodirajo fuzijske beljakovine med izooblikami AQP4 in GFP. AQP4 v plazmalemi smo označili imunocitokemijsko s specifičnimi protitelesi, ki se vežejo na zunajcelične domene AQP4. Nativni AQP4 smo označili s protitelesi, ki se vežejo na znotrajcelične domene AQP4. Za detekcijo mikrodomen smo uporabili superločljivostno mikroskopijo s strukturirano osvetlitvijo. Premer mikrodomen smo izmerili kot širino fluorescentnega signala na polovici najvišje intenzitete. Mikrodomene z AQP4e so bile nekoliko manjše od mikrodomen z AQP4b in AQP4d, kar smo pripisali različni znotrajcelični razporeditvi izooblik in deležu v plazmalemi. Delež AQP4 v plazmalemi smo izračunali kot razmerje števila mikrodomen v plazmalemi proti vsem mikrodomenam v celici. Ugotovili smo, da je samo AQP4e prisoten v plazmalemi, AQP4b in AQP4d sta izključno znotrajcelični izoobliki. Po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino se je povečal delež mikrodomen z nativnim AQP4 in AQP4e v plazmalemi, najbolj verjetno zaradi povečane eksocitoze. V hipoosmotskih razmerah so se povečale tudi velikosti mikrodomen z AQP4 v plazmalemi (t.i. ortogonalnih skupkov). Mikrodomene v plazmalemi so se lahko povečale zaradi zlivanja mešičkov z AQP4 na mestu obstoječih ortogonalnih skupkov ali prerazporejanja teh skupkov v plazmalemi. Menimo, da bi lahko imela izooblika AQP4e pomembno vlogo pri uravnavanju velikosti ortogonalnih skupkov v astrocitih.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDC 6:577.2:543.456(043.2)=163.6  
CX water channels/aquaporin 4/AQP4/AQP4b/AQP4d/AQP4e/astrocytes/vesicle sizes/  
super-resolution fluorescence microscopy/SIM  
AU LISJAK, Marjeta  
AA ZOREC, Robert (supervisor)/POTOKAR, Maja (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
PY 2015  
TI CHARACTERIZATION OF VESICLES CARRYING AQUAPORIN 4 WATER  
CHANNEL  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Structural and functional biology)  
NO XI, 47 p., 2 tab., 18 fig., 102 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Water channel aquaporin 4 (AQP4) exists in six isoforms and is transported through the cytoplasm in the membrane-bound vesicles. We investigated characteristics of three until now poorly studied AQP4 isoforms in rat astrocytes. Our aim was to evaluate the size and the proportion of AQP4b, AQP4d and AQP4e microdomains in the plasma membrane and to test whether hypoosmotic stimulation affects the distribution of microdomains (areas with AQP4) in the plasma membrane. Cells were transfected with plasmid DNAs encoding the fusion protein between AQP4 and GFP. AQP4 in the plasma membrane were labeled immunocytochemically with specific antibodies, which target the extracellular domain of AQP4 molecule. Endogenous AQP4 were labeled with antibodies, which target the intracellular domain of AQP4. Microdomains were detected with structured illumination microscopy. The diameter of the microdomains was measured as the full width of the fluorescence signal at half maximum intensity. AQP4e microdomains were slightly smaller from AQP4b and AQP4d microdomains, probably due to different intracellular localization and plasma membrane proportion. AQP4 plasma membrane proportion was calculated as the ratio of plasma membrane microdomains against all microdomains in the cell. We have found that only AQP4e is present in the plasma membrane, while AQP4b and AQP4d are exclusively intracellular. The proportion of endogenous AQP4 and AQP4e microdomains increased in the plasma membrane after hypoosmotic stimulation, probably due to increased exocytosis. Hypoosmotic conditions triggered an increase in the size of AQP4 plasma membrane microdomains (in the literature known as orthogonal arrays of particles; OAPs). This increase may be attributed to the fusion of AQP4 vesicles at the sites of the existing OAPs or to the redistribution of OAPs in the plasma membrane. Our results show that AQP4e isoform may have an important role in the regulation of OAP size in astrocytes.

## KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VIII
	OKRAJŠAVE	X
	SLOVARČEK	XI
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	NAMEN	1
1.2	HIPOTEZE	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1	AKVAPORINI	4
<b>2.1.1</b>	<b>Akvaporini v možganih</b>	<b>5</b>
2.2	AKVAPORIN 4	6
<b>2.2.1</b>	<b>Strukturne značilnosti akvaporina 4</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Akvaporin 4 je primarno prisoten v možganih</b>	<b>6</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Vloga akvaporina 4 v možganih</b>	<b>7</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Izooblike akvaporina 4</b>	<b>8</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Tvorjenje ortogonalnih skupkov</b>	<b>8</b>
2.3	ASTROCITI	9
2.4	HOMEOSTAZA VODE V MOŽGANIH	10
<b>2.4.1</b>	<b>Možganski edem</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b>	<b>12</b>
3.1	CELIČNE KULTURE	12
<b>3.1.1</b>	<b>Primarne kulture podganjih astrocitov</b>	<b>12</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Primarne kulture mišjih astrocitov</b>	<b>12</b>
3.2	HRANILNI MEDIJ IN RAZTOPINE	12
<b>3.2.1</b>	<b>Priprava hranilnega medija za gojenje podganjih in mišjih astrocitov</b>	<b>12</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Priprava zunajcelične raztopine</b>	<b>13</b>

<b>3.2.3</b>	<b>Priprava hipoosmolarne raztopine</b>	13
3.3	PLAZMIDNA DNA	13
3.4	METODE	14
<b>3.4.1</b>	<b>Priprava krovnih stekelc</b>	14
<b>3.4.2</b>	<b>Nasajanje astrocitov na krovnike</b>	14
<b>3.4.3</b>	<b>Pomnoževanje, izolacija in vnos plazmidne DNA v celice</b>	14
3.4.3.1	Nacepljanje bakterij v tekoče gojišče	14
3.4.3.2	Izolacija plazmidne DNA iz bakterij	15
3.4.3.3	Vnos plazmidne DNA v astrocite	15
<b>3.4.4</b>	<b>Fiksacija astrocitov z vnešenimi plazmidnimi DNA</b>	15
<b>3.4.5</b>	<b>Imunocitokemija</b>	15
3.4.5.1	Optimizacija koncentracije primarnih protiteles	15
3.4.5.1.1	Človeška primarna protitelesa NMO	15
3.4.5.1.2	Komercialna zajčja primarna protitelesa proti AQP4	16
3.4.5.2	Označevanje akvaporinov 4	16
<b>3.4.6</b>	<b>Stimulacija s hipoosmolarno raztopino</b>	17
<b>3.4.7</b>	<b>Superločljivostna mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo</b>	17
3.5	ANALIZA	18
<b>3.5.1</b>	<b>Merjenje velikosti mikrodomen</b>	18
<b>3.5.2</b>	<b>Določitev deleža mikrodomen v plazmalemi astrocitov</b>	18
3.6	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	19
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	20
4.1	ZNAČILNOSTI MIKRODOMEN Z IZOBLIKAMI AQP4b, AQP4d IN AQP4e	20
<b>4.1.1</b>	<b>Mikrodomene z AQP4e so v povprečju manjše od mikrodomen z AQP4b in AQP4d</b>	20
<b>4.1.2</b>	<b>AQP4e je prisoten tudi v plazmalemi, AQP4b in AQP4d pa sta izključno znotrajcelična</b>	23
4.2	VPILV HIPOOSMOTSKIH RAZMER NA RAZPOREDITEV AQP4 V PLAZMALEMI ASTROCITOV	26
<b>4.2.1</b>	<b>Po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino se v plazmalemi poveča število mikrodomen z AQP4 in AQP4e</b>	26

<b>4.2.2</b>	<b>Po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino se v plazmalemi povečajo mikrodomene z AQP4</b>	30
4.3	V MIŠJIH ASTROCITIH Z UTIŠANIM GENOM <i>Gdi1</i> OSTANE DELEŽ AQP4 V PLAZMALEMI NESPREMENJEN	32
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	34
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	38
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	39
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	41
	<b>ZAHVALA</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Pregl. 1:</b>	Sestava hranilnega medija	12
<b>Pregl. 2:</b>	Sestava zunajcelične raztopine	13

## KAZALO SLIK

<b>Sl. 1:</b>	Zgradba akvaporina	5
<b>Sl. 2:</b>	Predeli možganov, kjer je AQP4 najpogostejši	7
<b>Sl. 3:</b>	Razporeditev AQP4a in AQP4c v ortogonalnih skupkih	9
<b>Sl. 4:</b>	Mehanizma možganskega edema	11
<b>Sl. 5:</b>	AQP4 je prisoten v astrocitih	21
<b>Sl. 6:</b>	Različne izooblike AQP4 izražene v astrocitih	22
<b>Sl. 7:</b>	Povprečne velikosti mikrodomen z nativnim AQP4 in z izooblikami AQP4b, AQP4d, AQP4e	23
<b>Sl. 8:</b>	AQP4, ki so dvojno označeni, predstavljajo mikrodomene v plazmalemih	24
<b>Sl. 9:</b>	Izooblika AQP4e je prisotna v plazmalemih astrocitov	25
<b>Sl. 10:</b>	Po dvominutni stimulaciji s hipoosmolarno raztopino pride do statistično značilnega povečanja števila mikrodomen z AQP4 v plazmalemih	27
<b>Sl. 11:</b>	Razporeditev AQP4b ostaja po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino znotrajcelična	28
<b>Sl. 12:</b>	Razporeditev AQP4d ostaja po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino znotrajcelična	29
<b>Sl. 13:</b>	Delež AQP4e v plazmalemih astrocitov se po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino poveča	29
<b>Sl. 14:</b>	Delež izooblike AQP4e v plazmalemih astrocitov se po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino značilno poveča, deleža izooblik AQP4b in AQP4d pa ostaneta nespremenjena	30
<b>Sl. 15:</b>	Hipoosmotske razmere povzročijo takojšnje povečanje mikrodomen z AQP4 v plazmalemih astrocitov	31
<b>Sl. 16:</b>	Mikrodomene (ortogonalni skupki) z AQP4e v plazmalemih astrocitov se povečajo po izpostavljenosti hipoosmotskim razmeram	32
<b>Sl. 17:</b>	Razporeditev AQP4 v plazmalemih je podobna v mišjih astrocitih <i>Gdil</i> WT in <i>Gdil</i> KO	33
<b>Sl. 18:</b>	Delež AQP4 v plazmalemih mišjih astrocitov se ob odsotnosti beljakovine $\alpha$ GDI ne spremeni	33

## OKRAJŠAVE

<b>A. E.</b>	arbitrarna enota (angl. arbitrary unit)
<b>AQP</b>	vodni kanal, akvaporin (angl. aquaporin)
<b>BSA</b>	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
<b>DMEM</b>	Eaglov medij, modificiran po Dulbeccu (angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>EDTA</b>	etilendiaminotetraoetna kislina
<b>FBS</b>	fetusni serum goveda (angl. fetal bovine serum)
<b>FWHM</b>	širina signala na polovici najvišje intenzitete (angl. full width at half maximum)
<b>GDI1</b>	GDP disociacijski inhibitor 1 (angl. GDP dissociation inhibitor-1)
<b><math>\alpha</math>GDI</b>	$\alpha$ GDP disociacijski inhibitor (angl. alpha GDP dissociation inhibitor)
<b>GDP</b>	gvanozin difosfat
<b>GFP</b>	zelena fluorescentna beljakovina (angl. green fluorescent protein)
<b>HEPES</b>	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
<b>I<sub>max</sub></b>	najvišja intenziteta fluorescence
<b>KO</b>	organizmi z utišanim genom (angl. gene knockout)
<b>LB</b>	Luria-Bertanijevo gojišče
<b>NMO</b>	nevromielitis vidnega živca (angl. neuromyelitis optica)
<b>pDNA</b>	plazmidna deoksiribonukleinska kislina
<b>PBS</b>	fosfatni pufer s soljo (angl. phosphate buffered saline)
<b>PLL</b>	poli-L-lizin
<b>RNAza</b>	ribonukleaza
<b>SIM</b>	mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo vzorca (angl. structured illumination microscopy)
<b>WT</b>	divji tip (angl. wild type)

## SLOVARČEK

<b>Akvaporini</b>	Skupina membranskih proteinov - kanalov, ki lajšajo prehod vode v celice in iz nje (Slovenski medicinski slovar, 2012).
<b>Imunocitokemija</b>	Veja citokemije, ki z imunološkimi metodami proučuje zgradbo celic. Uporablja specifična protitelesa, označena s fluorokromom ali encimom, ki da obarvan reakcijski produkt (Slovenski medicinski slovar, 2012).
<b>Izooblika</b>	Vsaka od nekoliko različnih oblik iste beljakovine, ki se razlikuje po zaporedju aminokislin, vendar ima isto funkcijo. Nastane kot produkt izražanja različnih genov ali kot produkt alternativnega spajanja eksonov v primarnem prepisu RNA iz istega gena (Slovenski medicinski slovar, 2012).
<b>Mikrodomena z AQP4</b>	Mikrodomena je vsak točkast fluorescentni signal, ki označuje akvaporine 4 (AQP4) v plazmalem, membrani mešičkov in drugih celičnih organelih.
<b>Mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo</b>	Je ena izmed superločljivostnih fluorescenčnih mikroskopskih tehnik. Prednost te tehnike je strukturirana osvetlitev vzorca, ki nam omogoča do dvakrat boljšo ločljivost, kot jo dosežemo z običajnimi optičnimi mikroskopi. Ločljivost v <i>x</i> - in <i>y</i> -smeri je ~100 nm, v <i>z</i> -smeri pa ~300 nm (Gustafsson, 2000; Schermelleh in sod., 2008).
<b>Možganski edem</b>	Je stanje, ki nastane zaradi prekomernega prehajanja tekočine iz žilja v možganovino. Tekočina se začne kopičiti v tkivu, kar privede do otekanja možganov (Slovenski medicinski slovar, 2012).
<b>Nativni AQP4</b>	Izvorni AQP4 v celicah.
<b>Nevromielitis vidnega živca</b>	Je bolezen, pri kateri prihaja do vnetja živcev in poškodb mielinske ovojnice. Najbolj prizadene vidni živec in hrbtenjačo. Značilnost bolezni je nastajanje avtoprotiteles, ki se vežejo na zunajcelične domene AQP4 in sprožijo vnetni odziv (Verkman in sod., 2011).
<b>Ortogonalni skupki</b>	So pravokotne strukture v plazmalem celic, zgrajene iz AQP4 (Verkman in sod., 2011).
<b>Rekombinantna pDNA</b>	Je pDNA, narejena s tehnologijo rekombinantne DNA.
<b>Rekombinantna beljakovina</b>	Je beljakovina, ki jo kodira rekombinantna pDNA.

## 1 UVOD

Akvaporini (AQP) so vodni kanali, ki omogočajo hitro prehajanje vode skozi celične membrane (Preston in sod., 1992). V možganih so odkrili tri tipe akvaporinov, in sicer AQP1, AQP4 in AQP9 (Nielsen in sod., 1993; Jung in sod., 1994; Elkjaer, 2000), izmed katerih je AQP4 najpogostejši (Amiry-Moghaddam in Ottersen, 2003). Izraža se predvsem v astrocitih (Nielsen in sod., 1997), ki so najštevilčnejše celice glije v možganih (Nedergaard in sod., 2003). AQP4 se pojavlja zlasti na izrastkih astrocitov, ki obdajajo žile in so v neposredni bližini možgansko-hrbtenjačne tekočine (Nielsen in sod., 1997) (Slika 2). Takšna razporeditev AQP4 kaže, da imajo astrociti poleg podporne in regulacijske vloge pri uravnavanju delovanja nevronov (Nedergaard in sod., 2003), ključno vlogo tudi pri uravnavanju vodnega ravnovesja v možganih (Amiry-Moghaddam in sod., 2003; Nagelhus in Ottersen, 2013).

Možgani potrebujejo stabilno osmotsko okolje za normalno delovanje, zato mora biti transport vode dobro reguliran (Agre in sod., 2004). Že majhne spremembe volumna možganskih celic ali zunajceličnega prostora lahko motijo prenos signalov med nevroni in obdelavo informacij v možganih (Strange, 1992). V nekaterih primerih nevroloških motenj (možganski tumor, kap, meningitis, poškodbe glave) in bolezenskih stanjih, ki sekundarno prizadenejo možgane (odpoved jeter, sepsa), pride do spremenjenega transporta vode, ki vodi v razvoj možganskega edema (Papadopoulos in sod., 2004), tj. nabiranja vode v možganih. Voda se lahko nabira v zunajcelični tekočini (vazogeni edem oz. edem intersticija) ali v celicah (citotoksični edem oz. intracelularni edem), običajno pa gre za kombinacijo (Papadopoulos in Verkman, 2007). Glede na obseg je lahko možganski edem lokaliziran ali generaliziran. Generalizirani edemi, kjer otekanje zajema vse možgane, so še posebej nevarni, saj so možgani obdani z lobanjskimi kostmi in v primeru nabrekanja nimajo dovolj prostora, kar vodi v razvoj hudih nevroloških poškodb (Strange, 1992), pogosto pride tudi do smrti (Agre in sod., 2004). Poznavanje regulacije transporta vode je pomembno za učinkovito zdravljenje možganskega edema.

Prehajanje vode skozi vodni kanal AQP4 je lahko regulirano na več načinov. Regulacija lahko poteka na ravni konformacijskih sprememb AQP4 (Gunnarson in sod., 2008; Nicchia in sod., 2011), gostote AQP4 v plazmali in ureditve AQP4 v ortogonalne skupke (Hirt in sod., 2011). V najnovejši raziskavi se je izkazalo, da se lahko spremembe v dinamiki transporta mešičkov, ki nosijo AQP4, odražajo v spremenjeni gostoti AQP4 v plazmali (Potokar in sod., 2013).

### 1.1 NAMEN

Namen naloge je bil raziskati lastnosti mikrodomen z vodnimi kanali AQP4 v podganjih astrocitih. V mikrodomenah so posamezne molekule AQP4 med seboj oddaljene manj kot 100 nm (mejna ločljivost superločljivostne mikroskopije, ki smo jo uporabljali) zaradi

česar izgledajo kot samostojne enote. Mikrodomene so lahko v membrani mešičkov in drugih celičnih organelov ali v plazmalemi.

Prvi dve opisani izoobliki AQP4 sta bili M1 (AQP4a) in M23 (AQP4c) (Jung in sod., 1994). Pred kratkim so v podganah odkrili še štiri nove izooblike AQP4 (Moe in sod., 2008), izmed katerih smo nameravali bolj raziskati izooblike AQP4b, AQP4d in AQP4e. Naš namen je bil oceniti velikost in delež mikrodomen treh izbranih izooblik AQP4 v plazmalemi, da bi ugotovili, katere so pomembne za transport vode skozi plazmalemo. V ta namen smo uporabili specifično imunocitokemijsko metodo označevanja AQP4 v plazmalemi in superločljivostno mikroskopijo SIM.

Nadalje smo s stimulacijo s hipoosmolarno raztopino posnemali razmere, ki so podobne tistim ob razvoju možganskega edema, da bi ugotovili, ali hipoosmotske razmere vplivajo na delež in velikost mikrodomen z AQP4 v plazmalemi.

## 1.2 HIPOTEZE

- 1) V plazmalemi podganjih astrocitov so od novo odkritih izooblik AQP4 prisotne le nekatere.
- 2) Na stimulacijo s hipoosmolarno raztopino se najbolj robustno odzove izooblika AQP4, ki je v plazmalemi najbolj zastopana.
- 3) Velikost mikrodomen z AQP4 v plazmalemi astrocitov se razlikuje v spontanah in hipoosmotskih razmerah.

1) AQP4 je eden izmed akvaporinov, ki selektivno povečajo prepustnost vode skozi plazmalemo (Preston in sod., 1992; King in sod., 2004). Identificirano je bilo šest izooblik AQP4 (Moe in sod., 2008). Poleg dveh do danes najbolj raziskanih izooblik, AQP4a (M1) in AQP4c (M23), so v podganjih možganih identificirali še štiri nove izooblike AQP4 (Hasegawa in sod., 1994; Jung in sod., 1994; Yang in sod., 1996; Moe in sod., 2008). Kje v astrocitih so posamezne nove izooblike AQP4 ni raziskano. Moe in sod. (2008) so z imunocitokemijsko metodo pokazali, da se AQP4b nahaja znotraj HeLa celic, v plazmalemi pa ni prisoten. Tudi za AQP4d so ugotovili, da se nahaja v celicah HeLa samo znotrajcelično, medtem ko je bil AQP4e prisoten tudi v plazmalemi. Le v primeru AQP4e so opazili tudi povečan transport vode skozi plazmalemo oocit žabe *Xenopus laevis* (Moe in sod., 2008). V podganjih astrocitih je bilo imunocitokemijsko pokazano, da bi lahko bila v plazmalemi astrocitov zastopana AQP4d in AQP4e, ob tem, da je bil AQP4d pretežno prisoten v znotrajceličnih predelkih (Potokar in sod., 2013). Pri tej študiji je bilo za označevanje plazmaleme uporabljeno lipidno membransko barvilo, ki je obarvalo celotno plazmalemo. Način označevanja plazmaleme in pa dejstvi, da so astrociti v kulturi izredno tanke celice, do okoli 2  $\mu\text{m}$  (Potokar in sod., 2005), ter da je ločljivost konfokalnega mikroskopa (s katerim so bile meritve izvedene) v z-smeri okoli 500 nm, bi lahko

prispevali k nenatančnemu odčitavanju prisotnosti izooblik AQP4 v plazmalemi. Zato smo predvidevali, da bomo s specifično imunocitokemijsko metodo označevanja AQP4 v plazmalemi in v kombinaciji s superločljivostno mikroskopijo pokazali, katere novo odkrite izooblike AQP4 so tudi v celični membrani astrocitov.

2) V hipoosmotskih razmerah, s katerimi posnemamo razmere ob možganskem edemu, se poveča transport vode v astrocite, ki začnejo nabrekati (Nase in sod., 2008). K temu bi lahko pripomogla večja lokalizacija AQP4 v plazmalemi astrocitov, do katere pride po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino (Potokar in sod., 2013). Zato smo predvidevali, da bodo opazne izrazite spremembe v membranskem deležu mikrodomen z AQP4 v primeru izooblike, ki je v plazmalemi najbolj zastopana.

3) AQP4 se v plazmalemi pojavljajo v ortogonalnih skupkih (Yang in sod., 1996). V Hensenovih celicah so opazili različne oblike in velikosti ortogonalnih skupkov (Hirt in sod., 2011), kar bi lahko bil eden od načinov regulacije prehajanja vode. Ali hipoosmotske razmere povzročijo spremembe v velikosti mikrodomen z AQP4 v plazmalemi, še ni bilo raziskano. Domnevali smo, da se bo po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino velikost mikrodomen z AQP4 v plazmalemi spremenila.

## 2 PREGLED OBJAV

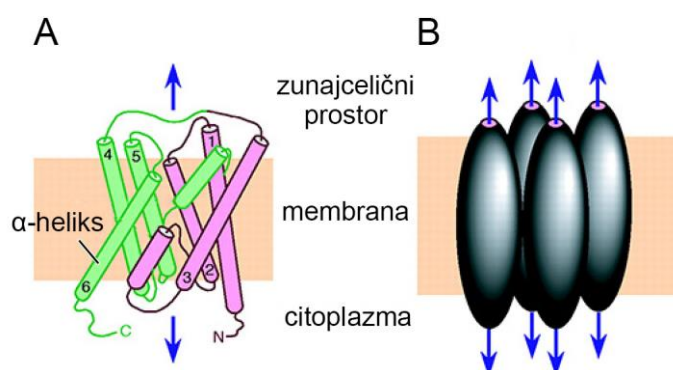
Voda je temeljna sestavina celic in zunajceličnega prostora večceličarjev (metazojev). Uravnavano prehajanje vode skozi celične membrane je življenjsko pomemben proces, ki poteka v procesih prebave, dihanja, kroženja telesnih tekočin, uravnavanja telesne temperature in številnih drugih (Agre in sod., 1993). V celice lahko prehaja z difuzijo neposredno skozi celično membrano, vendar je takšen način prehajanja počasen in nenadzorovan (Amiry-Moghaddam in Ottersen, 2003). Voda lahko počasi prehaja plazmalemo tudi prek membranskih prenašalcev v plazmalemi, npr. Na<sup>+</sup>/glukoze kotransporterja (Loo in sod., 2002). V nekaterih celicah so opazili hitrejšo izmenjavo vode z okolico. Npr. v eritrocitih je bil izmerjen permeabilnostni koeficient za prenos vode  $5,3 \times 10^{-3}$  cm/s, ki je bil od 30 do 250-krat višji kot v drugih celicah (celice v koži, celice jajčnika) (Paganelli in Solomon, 1957). V eritrocitih so tudi opazili, da je bil transport vode v osmotskih razmerah za 2,5-krat hitrejši kot v isoozmotskih (Paganelli in Solomon, 1957; Sidel in Solomon, 1957). To je nakazovalo, da obstaja mehanizem, ki omogoča pospešen transport vode skozi plazmalemo. Domneve so potrdili, ko so v plazmalemi eritrocitov odkrili prvi vodni kanal akvaporin 1 (Preston in Agre, 1991; Preston in sod., 1992).

### 2.1 AKVAPORINI

Akvaporini so transmembranske beljakovine, pomembne pri uravnavanju vsebnosti vode v celicah (Agre in sod., 1993). Sestavljeni so iz štirih enakih monomerov (Slika 1) (Verbavatz in sod., 1993). Vsak monomer je velik okoli 30 kDa in zgrajen iz šestih  $\alpha$ -heliksov ter centralnega kanala (Preston in Agre, 1991; Amiry-Moghaddam in Ottersen, 2003). Zaradi steričnih in elektrostatskih ovir v kanalu lahko prehaja le po ena molekula vode naenkrat (Tajkhorshid in sod., 2002). Prehajanje vode je pasivno in lahko poteka v obe smeri, glede na koncentracijski gradient (Papadopoulos in Verkman, 2013). Skozi nekatere tipe akvaporinov prehaja izključno voda, drugi tipi pa lahko prepuščajo tudi nekatere ione in sečnino ter glicerol (King in sod., 2004).

Akvaporine so odkrili v živalih, rastlinah in mikrobih (Amiry-Moghaddam in Ottersen, 2003). V sesalcih je poznanih 13 tipov vodnih kanalov (AQP0–12). Različni tipi akvaporinov so se razvili, ker imajo celice in organi različne fiziološke zahteve po regulaciji transporta vode. Med njimi obstajajo razlike v prepustnosti vode, regulaciji prepisovanja genov, posttranslacijskih modifikacijah, stabilnosti in znotrajcelični razporeditvi (King in sod., 2004).





**Slika 1: Zgradba akvaporina.** (A) Monomer AQP, zgrajen iz šestih transmembranskih  $\alpha$ -heliks (označeni z 1-6). (B) AQP sestavljajo štirje monomeri, skozi katere prehaja voda. (prirejeno po Verkman, 2005)

Razdelimo jih lahko v tri skupine (Badaut in sod., 2014):

- akvaporini 0, 1, 2, 4, 5, 6 in 8, skozi katere lahko prehaja samo voda;
- akvagliceroporini 3, 7, 9 in 10, ki lahko poleg vode prepuščajo tudi glicerol, sečnino in nekatere monokarboksilate;
- super-akvaporina 11 in 12, ki sta v citoplazmi in verjetno uravnava transport vode med organeli in citoplazmo ter mešički.

### 2.1.1 Akvaporini v možganih

V centralnem živčnem sistemu so potrdili prisotnost več tipov akvaporinov (AQP1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12). Med njimi je fiziološka in patološka vloga v možganih najbolj raziskana pri AQP1, AQP4 in AQP9 (Badaut in sod., 2014).

AQP1 se v možganih glodalcev in primatov nahaja v epitelnih celicah horoidnega pleteža (Nielsen in sod., 1993; Arcienega in sod., 2010). Poskusi na miših, ki so imele utišan gen za izražanje AQP1, so pokazali, da se je tvorjenje možgansko-hrbtenjačne tekočine zmanjšalo za 20–25 %, kar kaže na pomembno vlogo AQP1 pri nastajanju možgansko-hrbtenjačne tekočine (Oshio in sod., 2004).

Najbolj pogost vodni kanalček v možganih je AQP4 (Saadoun in Papadopoulos, 2010; Arcienega in sod., 2010). Nahaja se v astrocitih in endimskih celicah (Nielsen in sod., 1997; Arcienega in sod., 2010). Največ ga je na mestih, ki mejijo na žile in notranjo možgansko ovojnico pio (možganska žilnica) (Nielsen in sod., 1997). Ima pomembno vlogo predvsem pri izmenjavi vode med možgani, možgansko-hrbtenjačno tekočino in žilami (Amiry-Moghaddam in sod., 2003).

AQP9 se v centralnem živčnem sistemu pojavlja v endimskih celicah, tanicitah (Elkjaer in sod., 2000), astrocitih (Badaut in sod., 2001; Arcienega in sod., 2010) in nevronih, ki sproščajo kateholamin (Badaut in sod., 2004; Arcienega in sod., 2010). Skozi AQP9 lahko prehajajo voda, sečnina (Ishibashi in sod., 1998), nekateri monokarboksilati (Tsukaguchi in sod., 1998) in glicerol (Carbrey in sod., 2003), zato ga uvrščamo v skupino akvagliceroporinov (Carbrey in sod., 2003). Njegova vloga v možganih še ni popolnoma

pojasnjena. Verjetno je udeležen pri uravnavanju presnovnih procesov v nevronih (Badaut in sod., 2008) in astrocitih (Badaut in sod., 2012), saj omogoča prehajanje glicerola in nekaterih monokarboksilatov, ki so substrat za nastanek energijsko bogatih molekul (McKenna in sod., 1986; Badaut in sod., 2004).

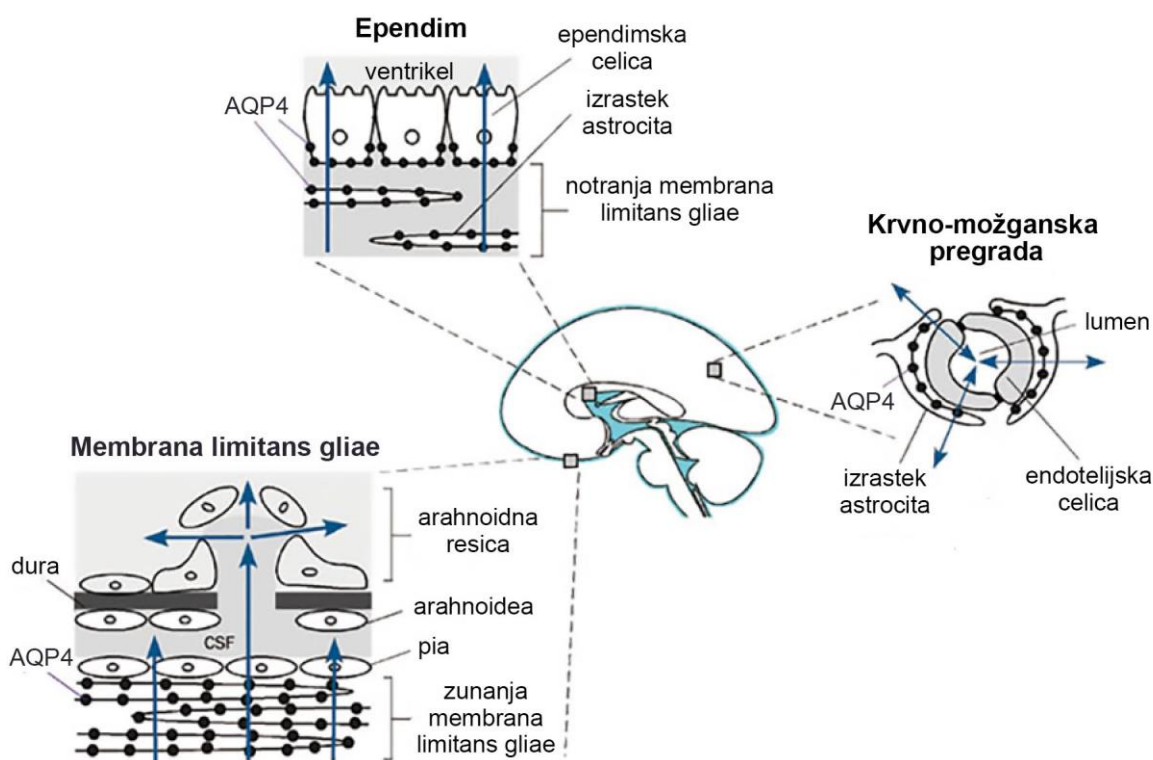
## 2.2 AKVAPORIN 4

### 2.2.1 Strukturne značilnosti akvaporina 4

AQP4 je zgrajen iz štirih monomerov, sestavljenih iz šestih  $\alpha$ -heliksov, ki obdajajo centralni kanal (Tani in sod., 2009). Spada v skupino vodnih kanalov, skozi katere lahko prehajajo le vodne molekule (Hasegawa in sod., 1994; Jung in sod., 1994). Selektivno prehajanje vode omogoča posebna zgradba kanala. Centralni kanal se proti sredini zožuje do premera  $\sim 2,8$  Å, s čimer je onemogočen prehod molekul večjih od molekule vode (Walz in sod., 2009, cit. po Nagelhus in Ottersen, 2013). Na vhodu kanala so ostanki arginina, ki preprečujejo vstop kationom v kanal (Beitz in sod., 2006), pozitivno nabite regije v sredini centralnega kanala pa preprečujejo prehajanje protonov in usmerjajo molekule vode skozi kanal (Murata in sod., 2000; Nagelhus in Ottersen, 2013).

### 2.2.2 Akvaporin 4 je primarno prisoten v možganih

AQP4 se nahaja predvsem v možganih (Hasegawa in sod., 1994; Jung in sod., 1994), najdemo ga tudi v pljučih, ledvicah (Hasegawa in sod., 1994; Jung in sod., 1994), skeletnih mišicah (Frigeri in sod., 1998), hrbtenjači (Rash in sod., 1998), mrežnici (Nagelhus in sod., 1998) in notranjem ušesu (Takumi in sod., 1998). V možganih je prisoten v celicah glije, in sicer v endodimskih celicah in astrocitih, v katerih je najpogostejši. Največ ga je na izrastkih astrocitov, ki so v bližini ali neposrednem stiku z žilami, možgansko ovojnico in endodimskimi celicami (Slika 2). AQP4 je tako kot v astrocitih tudi v endodimskih celicah razporejen polarizirano. Endodimske celice obdajajo ventrikle, ki so napolnjeni z možgansko-hrbtenjačno tekočino. AQP4 imajo razporejene na bazolateralni membrani, proti kateri se iztezajo izrastki astrocitov, medtem ko jih v apikalni membrani ni. AQP4 se močno izraža tudi v osmosenzoričnih regijah v hipotalamusu, kjer je prisoten na izrastkih astrocitov, ki so v stiku z nevroni. Njihova gostota na mestu sinaps je manjša (Nielsen in sod., 1997).



**Slika 2: Predeli možganov, kjer je AQP4 najpogostejši.** AQP4 je pogost na izrastkih astrocitov, ki so v bližini možganske ovojnice pie, ependimskih celic in na izrastkih, ki obdajajo žile. Puščice prikazujejo prehajanje vode med možganovino in zunajmožganskimi tekočinami. Membrana limitans gliae – pregrada iz astrocitov in njihovih izrastkov, CSF – možgansko-hrbtenjačna tekočina (prirejeno po Verkman in sod., 2011)

### 2.2.3 Vloga akvaporina 4 v možganih

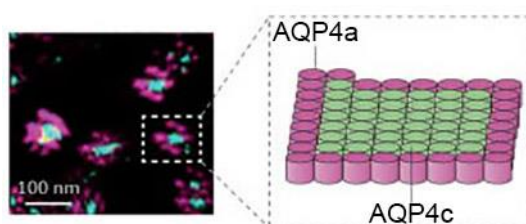
Najbolj raziskana in ključna vloga AQP4 je zagotavljanje homeostaze vode v možganih z uravnavanjem transporta vode med možganovino in zunajmožganskimi tekočinami. To mu omogoča edinstvena lega v astrocitih ob žilah in možgansko-hrbtenjačni tekočini (Amiry-Moghaddam in sod., 2003; Amiry-Moghaddam in Ottersen, 2003). Akvaporini omogočajo prehajanje vode glede na koncentracijski gradient in tako lahko pride ob porušenju osmotskega ravnotežja do neuravnoteženega transporta vode, ki vodi v razvoj možganskega edema (Amiry-Moghaddam in Ottersen, 2003). Vloga AQP4 je bila opisana npr. pri odvajanju tkivne tekočine iz možganov (Papadopoulos in sod., 2004), uravnavanju volumna zunajceličnega prostora (Haj-Yasein in sod., 2012; Nagelhus in Ottersen, 2013), kar lahko vpliva na prenos signalov v sinapsi (Agre in sod., 2004). AQP4 naj bi bil udeležen tudi pri premikanju astrocitov, npr. na mesto poškodb (Saadoun in sod., 2005) in pri uravnavanju privzema  $K^+$  v astrociti (Nagelhus in sod., 1999; Nagelhus in Ottersen, 2013).

#### 2.2.4 Izooblike akvaporina 4

Do sedaj je bilo odkritih šest izooblik AQP4 (Jung in sod., 1994; Moe in sod., 2008). Prvi opisani izoobliki sta bili M1 in M23 (Jung in sod., 1994). Kasneje so z metodo alternativnega spajanja eksonov odkrili še štiri nove, ki so jih poimenovali AQP4b, AQP4d, AQP4e (Mz) in AQP4f. Klasični izoobliki M1 in M23 so preimenovali v AQP4a in AQP4c (Moe in sod., 2008). Izooblike so različno velike. Najmanjša je AQP4d z molekulsko maso 27 kDa, največja pa AQP4e z 39 kDa (Moe in sod., 2008). Poskusi na oocitah žabe vrste *Xenopus laevis* so pokazali, da voda prehaja plazmalemo skozi AQP4a, AQP4c in AQP4e (Jung in sod., 1994; Moe in sod., 2008). Prisotnost AQP4e v plazmalemi so potrdili tudi imunocitokemijsko v HeLa celicah (Moe in sod., 2008) in podganjih astrocitih (Potokar in sod., 2013). Znotrajcelično se AQP4e nahaja v Golgijevem aparatu in celičnih predelkih, v katerih potekajo procesi razgradnje (Potokar in sod., 2013). AQP4b, AQP4d in AQP4f ne prevajajo vode skozi plazmalemo, kar pomeni, da najverjetneje ostajajo znotraj celice (Moe in sod., 2008). AQP4d je v primerjavi z AQP4e bolj pogost v Golgijevem aparatu in organelih, v katerih poteka razgradnja (Potokar in sod., 2013). Podobno so v celicah HeLa opisali lokalizacijo AQP4b, d in f v Golgijevem aparatu (Moe in sod., 2008). Njihova lokalizacija v astrocitih še ni dobro raziskana. Potokar in sod. (2013) so opisali, da bi lahko bila izooblika AQP4d v astrocitih prisotna tudi v plazmalemi, kar je v nasprotju z rezultati Moe in sod. (2008). Nekatere izooblike AQP4 tvorijo v plazmalemi t.i. ortogonalne skupke (Silberstein in sod., 2004; Rossi in sod., 2012b).

#### 2.2.5 Tvorjenje ortogonalnih skupkov

Ortogonalni skupki so pravokotne strukture, ki so jih v 70. letih opazili na celičnih membranah, pripravljenih z metodo zamrzovalnega lomljenja pri elektronski mikroskopiji (Verkman in sod., 2011). Zgrajeni so iz vodnih kanalov AQP4 (Yang in sod., 1996; Verbavatz in sod., 1997; Rash in sod., 1998). Do tega odkritja so jih pripeljale raziskave, ki so pokazale prisotnost AQP4 na izrastkih astrocitov in v drugih celicah, kjer je bila dokazana prisotnost ortogonalnih skupkov (Verkman in sod., 2011). Prisotni so samo v plazmalemi, medtem ko se v membranah celičnih organelov, kot sta endoplazmatski retikulum in Golgijev aparat, ne tvorijo. Ena izmed lastnosti plazmaleme, ki omogoča tvorbo ortogonalnih skupkov, je majhna lokalna ukrivljenost membrane. Predvideva se tudi, da obstajajo v plazmalemi specifični faktorji, ki sodelujejo pri njihovi tvorbi (Rossi in sod., 2012a). Tvori jih krajša izooblika AQP4c. Lahko jih oblikujeta tudi AQP4a in AQP4e, ampak samo v povezavi z AQP4c (Silberstein in sod., 2004; Strand in sod., 2009). Osrednji del ortogonalnih skupkov tvori AQP4c, obrobni del pa AQP4a (Slika 3) (Rossi in sod., 2012b). Velikost ortogonalnih skupkov je uravnavana z razmerjem med AQP4c in AQP4a oz. AQP4e, ki omejujeta njihovo širjenje (Furman in sod., 2003; Strand in sod., 2009). Vloga povezovanja AQP4 v ortogonalne skupke ostaja v veliki meri še nepojasnjena. Najverjetneje omogočajo hitrejši transport vode (Silberstein in sod., 2004). Pomembni naj bi bili tudi pri celični adheziji, zaradi tvorjenja močnejših povezav med celicami (Hiroaki in sod., 2006), čemur pa v članku Zhang in Verkman (2008) nasprotujejo.



**Slika 3: Razporeditev AQP4a in AQP4c v ortogonalnih skupkih.** Prikazani so ortogonalni skupki v glioblastomski celici, ki izraža izooblike AQP4a (rdeč signal) in AQP4c (zelen signal). Celica je bila posneta z dSTORM fluorescenčno mikroskopijo. Na desni strani je shematsko prikazana razporeditev izooblik v ortogonalnem skupku. Osrednji del tvori AQP4c, AQP4a pa je razporejena na obrobju ortogonalnega skupka. (prirejeno po Papadopoulos in Verkman, 2013)

### 2.3 ASTROCITI

Astrociti so najštevilčnejše celice glije v centralnem živčnem sistemu. Razporejeni so po celotnih možganih (Simard in Nedergaard, 2004). Iz njih izhajajo številni izrastki, s katerimi se povezujejo z nevroni in drugimi celicami glije ali pa se iztezajo proti okoliškim strukturam, kot so bazalna lamina, vezivna možganska ovojnica pia (možganska žilnica) in proti možgansko-hrbtenjačni tekočini, ki napolnjuje ventrikle (Parpura in sod., 2012).

V možganih opravljajo različne naloge. So podporne celice nevronom, ki jim zagotavljajo primerne razmere za normalno delovanje. Pomembne so pri vzdrževanju ionskega ravnotežja, uravnavanju pH in oskrbovanju nevronov z glukozo ter drugimi substrati. Odstranjujejo tudi odpadne snovi okrog nevronov in živčne prenašalce iz sinaps (Nedergaard in sod., 2003). Astrociti imajo glavno vlogo pri regulaciji izmenjave vode med krvjo in možgani ter v zunajceličnih prostorih možganovine (Verkhatsky in Parpura, 2014: 37), kar jim omogoča posebna lega okrog žil in ventriklov (Parpura in sod., 2012). Na izrastkih, s katerimi obdajajo žile, je velika gostota AQP4 (Nielsen in sod., 1997), ki zagotavljajo pospešen transport vode (Nagelhus in Ottersen, 2013). V manjšem obsegu se AQP4 nahajajo tudi na izrastkih, ki so v stiku s sinapsami (Nielsen in sod., 1997). Z razporeditvijo astrocitov med nevroni in žilami lahko astrociti uravnavajo transport snovi med temi deli (Parpura in sod., 2012). Tako se lahko voda učinkovito odstranjuje iz sinaptičnih prostorov in se transportira do vaskulturnih območij. Transport vode skozi celične membrane je lahko reguliran s spreminjanjem prepustnosti vode skozi AQP4, urejenostjo AQP4 v ortogonalne skupke in z mobilnostjo mešičkov, ki nosijo AQP4 proti plazmalem ali se od nje odcepljajo (Potokar in sod., 2013). Izrastki astrocitov so tudi glavno mesto pojavljanja  $K^+$  kanalov Kir4.1, ki se nahajajo poleg AQP4. Privzemanje  $K^+$  v astrocitate je tesno povezano s transportom vode. Med sinaptično aktivnostjo pride do povišane koncentracije  $K^+$  v zunajceličnem prostoru. Zaradi spremenjenega osmotskega ravnotežja prehaja voda skozi AQP4 v astrocitate, čemur sledi tudi privzem  $K^+$  skozi Kir4.1. Da astrociti ne nabreknejo, se odvečna voda odstrani v velike zunajcelične prostore okrog žil in na površini možganov (Wolburg in sod., 2012).

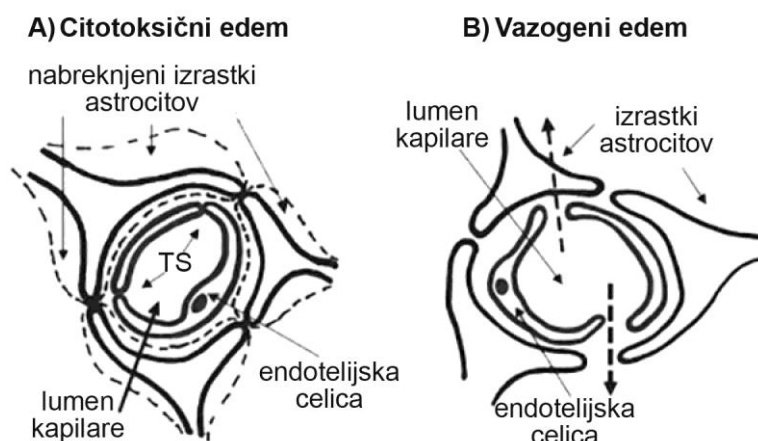
## 2.4 HOMEOSTAZA VODE V MOŽGANIH

Transport vode je tesno povezan s številnimi možganskimi funkcijami (Agre in sod., 2004). Uravnavan transport vode je pomemben pri tvorjenju možgansko-hrbtenjačne tekočine (Oshio in sod., 2004), regulaciji celičnega volumna in zunajceličnega prostora. Spreminjanje transporta vode okrog nevronov in celic glije vpliva na koncentracijo ionov in drugih snovi v zunajceličnem prostoru ter posledično na delovanje sinaps. Je tudi del številnih procesov, ki zagotavljajo homeostazo vode v možganih. Pomemben je npr. pri privzemanju glutamata, odstranjevanju  $K^+$  in transportu monokarboksilatov (Agre in sod., 2004). Voda prehaja med različnimi deli možganov na osnovi koncentracijskega gradienta in razlik v hidrostatskem tlaku (Papadopoulos in Verkman, 2007). Pri uravnavanju vodne homeostaze v možganih v normalnih in patoloških razmerah je najbolj vpleten AQP4 (Nagelhus in Ottersen, 2013). Izkazalo se je, da ima pomembno vlogo pri razvoju možganskega edema (Papadopoulos in sod., 2004), pa tudi pri avtoimunskih boleznih, kot je nevromielitis vidnega živca in nevrodegenerativnih boleznih (Badaut in sod., 2014).

### 2.4.1 Možganski edem

Možganski edem je pogosto bolezensko stanje, ki nastane zaradi prekomernega kopičenja vode v možganih, do katerega pride zaradi motenj v osmotskem ravnovesju (Badaut in sod., 2014). Pojavi se v nekaterih primerih možganskih poškodb, ishemiji, tumorjih in vnetjih. Glavna posledica edema je otekanje možganov. Možgani imajo znotraj lobanje omejen prostor za večanje v primeru edema. Zaradi tega pride ob otekanju možganov do povečanega intrakranialnega pritiska, zmanjšanega pretoka krvi v možganih in nazadnje do herniacije, kar pogosto vodi v smrt bolnika (Zador in sod., 2009).

Poznana sta dva mehanizma možganskega edema, citotoksični in vazogeni edem (Slika 4). Pri citotoksičnem edemu prihaja do nabrekanja celic zaradi povečanega privzemanja vode, medtem ko je za vazogeni edem značilno, da se voda nabira v zunajceličnem prostoru zaradi poškodovane krvno-možganske pregrade. Pojavljata se ob različnih poškodbah. Citotoksični edem se razvije ob ishemični kapi in poškodbah možganov, vazogeni edem pa prevladuje v primeru tumorjev in možganskih abscesov (Zador in sod., 2009).



**Slika 4: Mehanizma možganskega edema.** Prikazani so izrastki astrocitov, ki obdajajo kapilaro. (A) Pri citotoksičnem edemu se poveča privzemanje vode v astrocite, zaradi česar začnejo izrastki nabrekati. TS – tesni stiki (B) Zaradi poškodovane krvno-možganske pregrade pride do izliva krvi iz kapilar v zunajcelični prostor, kar privede do nastanka vazogenega edema. (prirejeno po Benga in Huber, 2012)

Pri razvoju obeh vrst edemov je bila dokazana vloga AQP4. AQP4 je najbolj prisoten na izrastkih astrocitov, ki ležijo ob kapilarah in možganski žilni ovojnici. Zaradi edinstvene lege in visoke prepustnosti za vodo predstavlja AQP4 glavno pot za privzemanje vode v možgane in izhajanje iz njih. Med razvojem možganskega edema je odgovoren za nabrekanje astrocitov in reabsorpcijo vode v zunajcelični prostor (Zador in sod., 2009).

Učinkovitih metod zdravljenja, s katerimi bi omejili ali preprečili razvoj edema, še niso odkrili, saj je bilo tudi znanje o razvoju tega stanja na molekularnem in celičnem nivoju pomanjkljivo. Zato je odkritje, da je AQP4 udeležen pri razvoju edema, pomembna usmeritev za razvoj novih terapij (Badaut in sod., 2014).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 CELIČNE KULTURE

##### 3.1.1 Primarne kulture podganjih astrocitov

Uporabili smo primarne kortikalne astrocite, ki smo jih izolirali iz 2-3 dni starih podgan seva Wistar. Protokol izolacije in priprave astrocitov za gojenje je podrobno opisan v Pangršič in sod. (2006), prilagojen po protokolu avtorjev Schwartz in Wilson (1992). Pripravljene primarne kulture astrocitov smo gojili v hranilnem mediju (Preglednica 1) pri 37 °C, 95 % zračni vlagi in 5 % CO<sub>2</sub>.

##### 3.1.2 Primarne kulture mišjih astrocitov

Primarne kulture mišjih astrocitov smo pridobili iz sodelujočega laboratorija dr. Patrizie D'Adamo z inštituta San Raffaele, Milano, Italija. To so bili mišji astrociti divjega tipa (WT) in mišji astrociti z utišanim genom *Gdil* (angl. GDP dissociation inhibitor-1), ki kodira beljakovino GDI $\alpha$  (D'Adamo in sod., 1998). Protokol izolacije in priprave astrocitov za gojenje je enak kot za podganje astrocite, opisan v Pangršič in sod. (2006).

#### 3.2 HRANILNI MEDIJ IN RAZTOPINE

##### 3.2.1 Priprava hranilnega medija za gojenje podganjih in mišjih astrocitov

**Preglednica 1:** Sestava hranilnega medija

Sestavine medija	Količina za 100 ml medija	Koncentracija
DMEM (angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z visoko vsebnostjo glukoze (4500 mg/l) (Sigma-Aldrich, Nemčija)	88 ml	
Fetusni serum goveda (FBS) (Biocrom AG, Nemčija)	10 ml	10-odstotni
L-glutamin (200 mM) (Sigma-Aldrich, Nemčija)	1 ml	2 mM
Na-piruvat (100 mM) (Sigma-Aldrich, Nemčija)	1 ml	1 mM
Penicilin in streptomycin	50 $\mu$ l	25 $\mu$ g/ml

Hranilni medij smo prefiltrirali s filtrom s premerom por 0,2  $\mu$ m (Sarstedt, Nemčija).



### 3.2.2 Priprava zunajcelične raztopine

**Preglednica 2:** Sestava zunajcelične raztopine

Sestavine raztopine	Količina za 100 ml raztopine	Koncentracija
CaCl <sub>2</sub> (nasičena raztopina) (Honeywell Riedel-de Haën, Nemčija)	30 µl	2 mM
D-glukoza (Sigma-Aldrich, Nemčija)	180 mg	10 mM
HEPES (Sigma-Aldrich, Nemčija)	238 mg	10 mM
KCl (Sigma-Aldrich, Nemčija)	37 mg	5 mM
MgCl <sub>2</sub> (nasičena raztopina)	12 µl	1 mM
MiliQ voda	100 ml	
NaCl (Sigma-Aldrich, Nemčija)	761 mg	130 mM

Zunajcelični raztopini smo uravnali pH do vrednosti 7,2. Za merjenje smo uporabili pH meter MP 220 (Mettler Toledo GmbH, Švica). Osmolarnost smo izmerili trikrat z osmometrom Osmomat030 (Gonotech GmbH, Nemčija) in izračunali povprečje. Osmolarnost zunajcelične raztopine je bila ~300 mOsm.

### 3.2.3 Priprava hipoosmolarne raztopine

Sestava hipoosmolarne raztopine je bila enaka zunajcelični raztopini (Preglednica 2). Razlikovala se je le v koncentraciji NaCl, ki je bila 30 mM. Po pripravi smo ji uravnali pH na vrednost 7,2. Osmolarnost raztopine je bila ~100 mOsm.

Celice smo stimulirali s hipoosmolarno raztopino, ki smo jo pripravili iz 100 mOsm hipoosmolarne in 300 mOsm zunajcelične raztopine v razmerju (v/v) 1:1. Tako je bila njena končna osmolarnost ~200 mOsm.

Hranilni medij in druge pripravljene raztopine smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

## 3.3 PLAZMIDNA DNA

Uporabili smo plazmidne DNA (pDNA), ki kodirajo tri izooblike vodnega kanala AQP4, in sicer AQP4b, AQP4d in AQP4e (Potokar in sod., 2013; Moe in sod., 2008). Vse pDNA kodirajo fuzijske beljakovine med AQP4 in zeleno fluorescentno beljakovino (GFP; angl. green fluorescent protein). Bile so narejene v laboratoriju prof. dr. O. P. Ottersena (Center for Molecular Biology and Neuroscience, University of Oslo, Norway).

### 3.4 METODE

#### 3.4.1 Priprava krovnih stekelc

Krovnike (premer 22 mm; Thermo Scientific, ZDA) smo sterilizirali v mikrovalovni pečici (5 min) in jih inkubirali 10 min v 70 % etanolu (Kefo, Slovenija). Po dvakratnem spiranju v redestilirani vodi (pH = 5,0-7,0) (Univerzitetni klinični center Ljubljana, Slovenija), je sledila 15 min inkubacija v 1 % (v/v) poli-L-lizinu (PLL) (Sigma, ZDA). Nato smo jih trikrat sprali v redestilirani vodi, osušili in vsakega shranili v svojo petrijevko (premer 35 mm × višina 10 mm) (Sarstedt, Nemčija). Do uporabe smo jih hranili v hladilniku pri 4 °C.

#### 3.4.2 Nasajanje astrocitov na krovnike

Celice smo nasadili na krovnike dva do tri dni pred poskusi. Celicam v gojitveni centrifugirki smo odstranili hranilni medij in jih sprali z 2 ml DMEM. Dodali smo jim 2 ml Tripsina-EDTA (Sigma, Nemčija) in inkubirali pet minut pri 36,5 °C, da so se odlepili od podlage. Vsebino centrifugirke smo prenesli v dve 1,5 ml mikrocentrifugirki ter centrifugirali pet minut pri 900 g. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in dodali 1 ml hranilnega medija za astrocite. Skupke celic smo razdružili z uporabo igel (BD, ZDA) na 2 ml injekcijski brizgi (BD, ZDA). Najprej smo uporabili iglo premera 1,1 mm, s katero smo vsebino mikrocentrifugirke (Sarstedt, Nemčija) tri do petkrat prevlekli skozi iglo. Postopek smo ponovili z iglami premera 0,8 in 0,6 mm. Na krovnik smo enakomerno nanesti 50–100 µl (odvisno od gostote celic) resuspendiranih celic tako, da so bili posamezni astroцитi dovolj narazen. Po potrebi smo celice v mikrocentrifugirki dodatno redčili. Krovnike s celicami smo inkubirali 45 min pri 36,5 °C, da so se celice oprijele podlage. Po inkubaciji smo jim dodali 2 ml hranilnega medija za astrocite in jih naprej inkubirali v inkubatorju (Heal Force, Smart cell, Kitajska) pri 36,5 °C, 95 % vlažnosti in 5 % CO<sub>2</sub>. Porabili smo jih v treh do štirih dneh od priprave. Hranilni medij smo jim zamenjali vsake dva dni.

#### 3.4.3 Pomnoževanje, izolacija in vnos plazmidne DNA v celice

##### 3.4.3.1 Nacepljanje bakterij v tekoče gojišče

V erlenmajerico smo dali 60 ml medija za gojenje bakterij Luria-Bertani (LB) in 60 µl antibiotika ampicilin končne koncentracije 100 µg/ml. S sterilnim nastavkom za pipete smo zajeli bakterijsko kulturo, shranjeno v mikrocentrifugirki na -80 °C, ki je vsebovala pDNA, in nastavek dodali v pripravljeno gojišče. Erlenmajerico smo stresali čez noč (~16 ur) v stresalniku (Unitron, ZDA) pri 250 obr./min in 37 °C.

#### 3.4.3.2 Izolacija plazmidne DNA iz bakterij

Z reagenti kompleta PureYield Plasmid Midiprep System (Promega, ZDA) smo izolirali pDNA iz bakterij po navodilih proizvajalca. Izolirani pDNA smo dodali deionizirano vodo, ki ne vsebuje RNAz (100x redčenje) in ji s spektrofotometrom Ultrospec 3100 pro (Amersham Bioscience, Švedska) izmerili koncentracijo ter čistost. Koncentracijo smo izmerili trikrat in izračunali povprečje. Nato smo pDNA alikvotirali in do uporabe shranili v zamrzovalnik pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.3.3 Vnos plazmidne DNA v astrocite

Za vnos pDNA v celice smo uporabili transfekcijski reagent Lipofectamine LTX (Invitrogen, ZDA) in medij Opti-MEM (Life Technologies, ZDA). V mirocentrifugirko smo napipetirali 100  $\mu\text{l}$  Opti-MEM, 2,5  $\mu\text{l}$  Lipofectamina LTX in 1  $\mu\text{g}$  pDNA (mešanica zadostuje za celice na enem krovniku). Sledila je 30 min inkubacija na sobni temperaturi. Iz petrijevk, v katerih so bili krovniki z nasajenimi celicami, smo odstranili hranilni medij. Na krovnik smo nanесли 100  $\mu\text{l}$  pripravljene mešanice s pDNA in na rob petrijevke dodali 900  $\mu\text{l}$  Opti-MEMa. Nato smo celice inkubirali tri ure pri  $36,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po inkubaciji smo jim odstranili medij. Dodali smo jim po 1,5 ml hranilnega medija za astrocite in 20  $\mu\text{l}$  seruma UltroserG (BioSeptra, Francija). Izražanje pDNA je bilo 24-urno. Če smo celice v nadaljnjih poskusih označili še s primarnimi protitelesi nevromielitisa vidnega živca (NMO), je bilo izražanje pDNA 48-urno. V tem primeru smo po 24 urah celicam zamenjali hranilni medij. Do poskusov smo jih hranili pri  $36,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 95 % vlažnosti in 5 %  $\text{CO}_2$ .

### 3.4.4 Fiksacija astrocitov z vnešenimi plazmidnimi DNA

Celice smo fiksirali 24 ur po vnosu pDNA. Krovnike z nasajenimi astrociti smo najprej dvakrat sprali v fosfatnem pufri z NaCl (PBS) (Sigma, Nemčija). Spirali smo pri sobni temperaturi po tri minute. Nato smo jih 15 min inkubirali v 4 % formaldehidu (Thermo scientific, ZDA). Sledilo je trikratno spiranje v PBS po tri minute. Krovnike smo zalepili na objektna stekelca (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Nemčija) z reagentom SlowFade (Life Technologies, ZDA), ki preprečuje hitro bledenje flouorofor.

### 3.4.5 Imunocitokemija

#### 3.4.5.1 Optimizacija koncentracije primarnih protiteles

##### 3.4.5.1.1 Človeška primarna protitelesa NMO

Človeška protitelesa NMO (angl. neuromyelitis optica) smo uporabili za označevanje AQP4 v plazmalemi, saj se za razliko od komercialno dostopnih protiteles proti AQP4, vežejo na zunajcelično domeno AQP4 (Hinson in sod., 2007; Hinson in sod., 2012). Testirali smo tri redčitve primarnih protiteles NMO (Univerza v Bariju, Italija): 1:100,

1:200, 1:400. Protitelesa smo redčili v 3 % govejem serumskem albuminu (BSA) (Sigma, Nemčija), raztopljenem v PBS. Celice smo najprej inkubirali tri minute v 3 % BSA pri sobni temperaturi in jih nato 10 min inkubirali s primarnimi protitelesi NMO. Slepо kontrolo smo inkubirali 10 min v 3 % BSA brez dodanih primarnih protiteles. Potem smo jih trikrat sprali s PBS in inkubirali 20 min s človeškimi sekundarnimi protitelesi proti IgG Alexa Fluor 546 (1:600; Molecular Probes, ZDA). Sledilo je dvakratno spiranje v PBS in 10 min inkubacija v 2 % formaldehidu. Celice smo trikrat spirali v PBS. Krovnike smo zalepili na objektna stekelca z reagentom SlowFade. V PBS smo celice spirali po tri minute.

Primarna protitelesa NMO nam je podaril prof. dr. Antonio Frigeri (Department of Bioscience, Biotechnologies and Biopharmaceutic and Center of Excellence in Comparative Genomics, University of Bari "Aldo Moro", Bari, Italija).

#### 3.4.5.1.2 Komercialna zajčja primarna protitelesa proti AQP4

Komercialno dostopna zajčja primarna protitelesa proti AQP4 (Santa Cruz, ZDA) se vežejo na C-terminalni konec na znotrajcelični domeni AQP4. Testirali smo naslednje redčitve: 1:200, 1:400, 1:800. Celice smo sprali v PBS in jih 20 min fiksirali in permeabilizirali v 4 % formaldehidu. Nato smo jih trikrat spirali v PBS po dve minuti in jih eno uro inkubirali v raztopini 3 % BSA in 10 % kozjega seruma v PBS pri 36,5 °C. Celice smo štirikrat sprali v PBS. Potem smo jim dodali razredčena zajčja primarna protitelesa proti AQP4, razen slepi kontroli, ki smo ji dodali samo 3 % BSA in jih čez noč inkubirali pri 4 °C. Naslednji dan smo celice štirikrat sprali v PBS. Sledila je 45 min inkubacija z zajčjimi sekundarnimi protitelesi Alexa Fluor 488 (1:600; Molecular Probes, ZDA) pri 36,5 °C. Celice smo štirikrat sprali v PBS in krovnike zalepili na objektna stekelca z reagentom SlowFade. V PBS smo celice spirali po tri minute, razen če je navedeno drugače.

#### 3.4.5.2 Označevanje akvaporinov 4

Za označevanje AQP4 v plazmalemih smo uporabili metodo, ki se uporablja za označevanje beljakovin v živih celicah (Potokar in sod., 2008). Celice smo pri sobni temperaturi spirali tri minute v 3 % BSA, raztopljenem v PBS. AQP4 v plazmalemih živih astrocitov smo označili s človeškimi primarnimi protitelesi NMO (Univerza v Bariju, Italija), ki smo jih redčili 1:200 (v podganjih astrocitih) oz. 1:400 (v mišjih astrocitih) v 3 % BSA. Inkubacija je trajala 10 min pri sobni temperaturi. Slepо kontrolo smo inkubirali v 3 % BSA, brez dodanih primarnih protiteles. Nato smo celice trikrat spirali v PBS po dve minuti in inkubirali 20 min s sekundarnimi človeškimi protitelesi Alexa Fluor 546 (1:600) pri sobni temperaturi. Potem smo jih dvakrat spirali v PBS po dve minuti. Sledil je postopek označevanja AQP4 znotraj celic. Celice smo permeabilizirali in fiksirali s 4 % formaldehidom. Inkubacija je trajala 20 min na sobni temperaturi. Po trikratnem spiranju v PBS po dve minuti je sledila enourna inkubacija v raztopini 3 % BSA in 10 % kozjega

seruma v PBS pri 37 °C. Potem smo celice štirikrat spirali v PBS po tri minute in jih čez noč inkubirali z zajčjimi primarnimi protitelesi proti AQP4 (1:300, Alomone Labs, Izrael; 1:400, Santa Cruz, ZDA) pri 4 °C. Slepo kontrolo smo inkubirali samo v 3 % BSA. Naslednji dan smo celice štirikrat spirali v PBS po tri minute in jih inkubirali 45 min z zajčjimi sekundarnimi protitelesi Alexa Fluor 488 (1:600) pri 36,5 °C. Celice smo še štirikrat spirali v PBS po tri minute in krovnike zalepili na objektna stekelca z reagentom SlowFade.

V celicah z vnešenimi pDNA smo s protitelesi označili le AQP4 v plazmalemi po enakem postopku, kot je opisano zgoraj. Celice smo nato fiksirali 10 min v 2 % formaldehidu, jih trikrat spirali v PBS po tri minute in zalepili na objektna stekelca.

### **3.4.6 Stimulacija s hipoosmolarno raztopino**

Pri poskusih s hipoosmolarno raztopino smo uporabili serum s človeškimi primarnimi protitelesi NMO (Mayo Clinic, ZDA), ki nam ga je podaril dr. Thomas J. Kryzer (Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA).

Komplement v serumu smo inaktivirali tako, da smo razredčeni serum 30 min ogrevali na 56 °C v termomešalniki (Eppendorf, Nemčija). Pred označevanjem s serumom smo celice za nekaj sekund sprali v PBS. Nato smo jih inkubirali dve oz. deset minut v hipoosmolarni (200 mOsm) oz. v izoosmolarni zunajcelični (300 mOsm) raztopini s serumom s človeškimi primarnimi protitelesi NMO (1:200) pri 36,5 °C. Celice smo dvakrat sprali v PBS in 20 min inkubirali v 4 % formaldehidu pri sobni temperaturi. Sledilo je trikratno spiranje v PBS po dve minuti in enourni inkubacija v raztopini 3 % BSA in 10 % kozjega seruma v PBS pri 36,5 °C. Celice smo nato enkrat sprali v PBS in jih čez noč inkubirali z zajčjimi primarnimi protitelesi proti AQP4 (1:300, Alomone Labs; 1:400, Santa Cruz) pri 4 °C. Nato smo celice štirikrat spirali v PBS in jih 45 min inkubirali s človeškimi sekundarnimi protitelesi Alexa 546 (1:600) in zajčjimi protitelesi Alexa 488 (1:600) pri 36,5 °C. Celice smo štirikrat sprali v PBS in krovnike zalepili na objektna stekelca z reagentom SlowFade. V PBS smo celice spirali po tri minute, razen če je navedeno drugače.

Celice, v katere smo predhodno vnesli pDNA posameznih izooblik AQP4, smo 10 min fiksirali v 2-odstotnem formaldehidu in jih po štirikratnem spiranju v PBS inkubirali s človeškimi sekundarnimi protitelesi Alexa 456 (20 min, sobna temperatura). Po trikratnem spiranju v PBS smo krovnike s celicami zalepili na objektna stekelca z reagentom SlowFade. Vsa spiranja v PBS so potekala po tri minute.

### **3.4.7 Superločljivostna mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo**

Slike fluorescenčno označenih celic smo zajemali z mikroskopom Elyra PS.1 (Zeiss, Nemčija), z mikroskopom s strukturirano osvetlitvijo (SIM; angl. structured illumination microscopy). Uporabljali smo oljni imerzijski objektiv s 63× povečavo in numerično

aperturo 1,4 ter imerzijsko olje Immersol 518F (Zeiss, Nemčija). Slikali smo v programu ZEN 2011 (Zeiss, Nemčija).

Za vzbujanje GFP in Alexa Fluor 488 smo uporabljali laser z valovno dolžino 488 (488 nm Laser 100 mW ELYRA) in filter, ki je prepustil emisijo fluorescence valovnih dolžin v območju 495–560 nm. Za vzbujanje Alexa Fluor 546 smo uporabljali laser z valovno dolžino 561 (561 nm Laser 100 mW ELYRA) in filter s prepustnostjo fluorescence valovnih dolžin v območjih 570–650 in 750 nm. Za okularni filter smo izbrali FSet 77 HE. Zajeli smo več slik posamezne celice vzdolž z-osi z debelino optične rezine 0,5  $\mu\text{m}$ .

Na preparatu slepe kontrole smo optimizirali moč laserja in uporabljali isto moč laserja za zajemanje slik na nadaljnjih preparatih.

### 3.5 ANALIZA

#### 3.5.1 Merjenje velikosti mikrodomen

Velikost mikrodomen z nativnim AQP4 in z izooblikami AQP4b, AQP4d in AQP4e smo merili v programu ZEN 2011. Premer mikrodomen smo izmerili po sredini v dveh ortogonalnih smereh, in sicer tako, da smo izmerili razdaljo fluorescentnega signala (profil fluorescence čez sredino mikrodomene) na polovici najvišje intenzitete (Slika 5D). Izmerili smo vse mikrodome v eni četrtini celice, ki so imele intenziteto večjo od 5000 A. E., v naključno izbrani ravnini v sredini celice (2.–8. ravnina slike) ter izračunali povprečje. Če je bilo v eni četrtini celice manj kot 20 mikrodomen, smo izmerili tudi mikrodome v naslednji četrtini oz. v nekaterih primerih v celi ravnini celice, da smo zadostili pogoju vsaj 20 izmerjenih mikrodomen na celico. Mikrodome smo analizirali v ravnini, kjer so bile izostrene – v gorišču (v kateri so imele najvišjo intenziteto in najmanjši premer).

Velikost mikrodomen z AQP4 oz. AQP4e v plazmalemi v spontanah in hipoosmotskih razmerah smo izmerili v celotni ravnini celice. Izbrali smo ravnino, v kateri so bile mikrodome, označene s protitelesi NMO (mikrodome v plazmalemi), opazne samo na robovih celice in je bil izostren večji del celice (3.–6. ravnina slike). Kot ortogonalne skupke (mikrodome v plazmalemi) smo definirali tiste, ki so bili dvojno označeni, in sicer s protitelesi, ki so prepoznala znotrajcelično domeno nativnega AQP4 oz. GFP rekombinantnih izooblik (zelen signal) in s protitelesi NMO, ki so se vezala na AQP4 z zunajcelične strani (rdeč signal).

#### 3.5.2 Določitev deleža mikrodomen v plazmalemi astrocitov

Slike smo izvozili v zapis tif. Najprej smo prešteli vse mikrodome z zelenim signalom v analizirani ravnini celice s programom ImageJ (National Institutes of Health, USA; <http://imagej.nih.gov/ij/>). Za analizo smo izbrali ravnino celice, v kateri je bil izostren večji del celice, mikrodome, označene s protitelesi NMO (mikrodome v plazmalemi), pa so bile opazne samo na robovih celice. V programu ImageJ smo celico obrezali. V celicah, ki

so bile označene s protitelesi proti AQP4, smo v programu ImageJ zmanjšali šum s povečanjem kontrasta do vrednosti 7. V celicah, ki so izražale izooblike AQP4b, d oz. e, smo zmanjšali šum s povečanjem kontrasta do vrednosti 7 in zmanjšanjem svetlosti slike do vrednosti 15. Nato smo sliko pretvorili v binarno obliko in pod zavihkom Process, Binary izbrali nastavitev Watershed, ki loči stikajoče se mikrodomene. Prešteli smo mikrodomene, velikosti 9–3000 slikovnih elementov. V celicah, ki so izražale izooblike AQP4b, d in e, smo dodatno pregledali slike in ročno prešteli mikrodomene, ki jih ni avtomatsko analiziral ImageJ in so imele v analizirani ravnini najvišjo intenziteto.

Signale na plazmalemi smo prešteli ročno v programu Image J. Izmed vseh zelenih signalov, ki smo jih prešteli v prejšnjem koraku, smo šteli tiste, ki so bili hkrati tudi rdeči.

Lokalizacijo mikrodomen v plazmalemi smo izračunali kot delež mikrodomen, ki so imele rdeč in zelen signal, glede na število zelenih signalov (vseh mikrodomen).

### 3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke smo obdelali v programu Sigma Plot 11.0 (SYSTAT, ZDA). Rezultate smo podali kot povprečje  $\pm$  standardna napaka. Z ANOVA analizo enosmerne variance smo testirali, ali se povprečja med skupinami statistično značilno razlikujejo. Če smo med sabo primerjali le dve skupini, smo razlike med povprečji testirali s Studentovim t-testom. Razlike so bile statistično značilne pri vrednosti  $P < 0,05$ .

## 4 REZULTATI

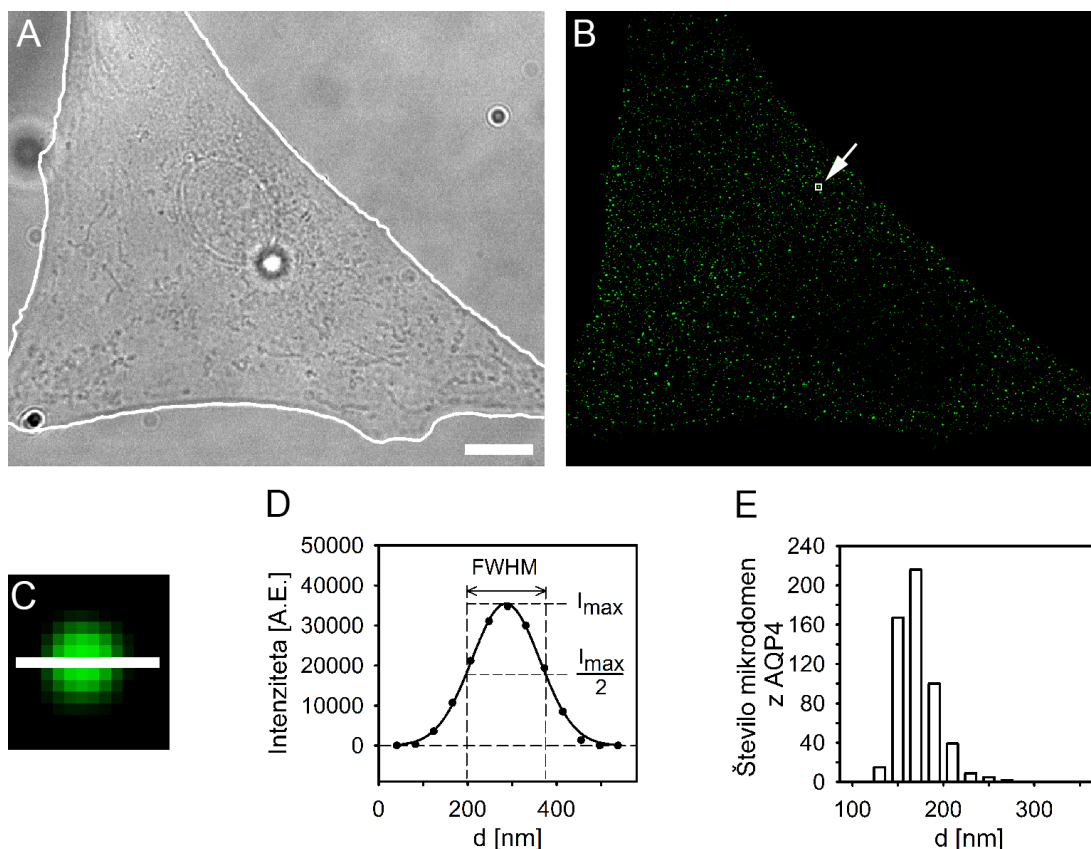
### 4.1 ZNAČILNOSTI MIKRODOMEN Z IZOBLIKAMI AQP4b, AQP4d IN AQP4e

V podganjih astrocitih je prisotnih šest izooblik akvaporinov 4 (AQP4), od katerih so bile štiri odkrite nedavno (Moe in sod., 2008). AQP4b, AQP4d in AQP4e so tri novoodkrite izooblike AQP4, ki smo jih želeli podrobneje raziskati. Zanimalo nas je, kakšna je velikost mikrodomen (tj. območij z AQP4) s posameznimi izooblikami AQP4 in če (ter v kakšnem deležu) se nahajajo v plazmalemi. Na vodno ravnovesje v celici lahko namreč vplivajo le izooblike AQP4, ki so prisotne v plazmalemi. Mikrodomena je vsak točkast fluorescentni signal, kjer so posamezne molekule AQP4 med seboj oddaljene manj kot 100 nm (mejna ločljivost superločljivostne mikroskopije SIM). Mikrodomene so lahko v membrani mešičkov in drugih celičnih organelov ali v plazmalemi.

#### 4.1.1 Mikrodomene z AQP4e so v povprečju manjše od mikrodomen z AQP4b in AQP4d

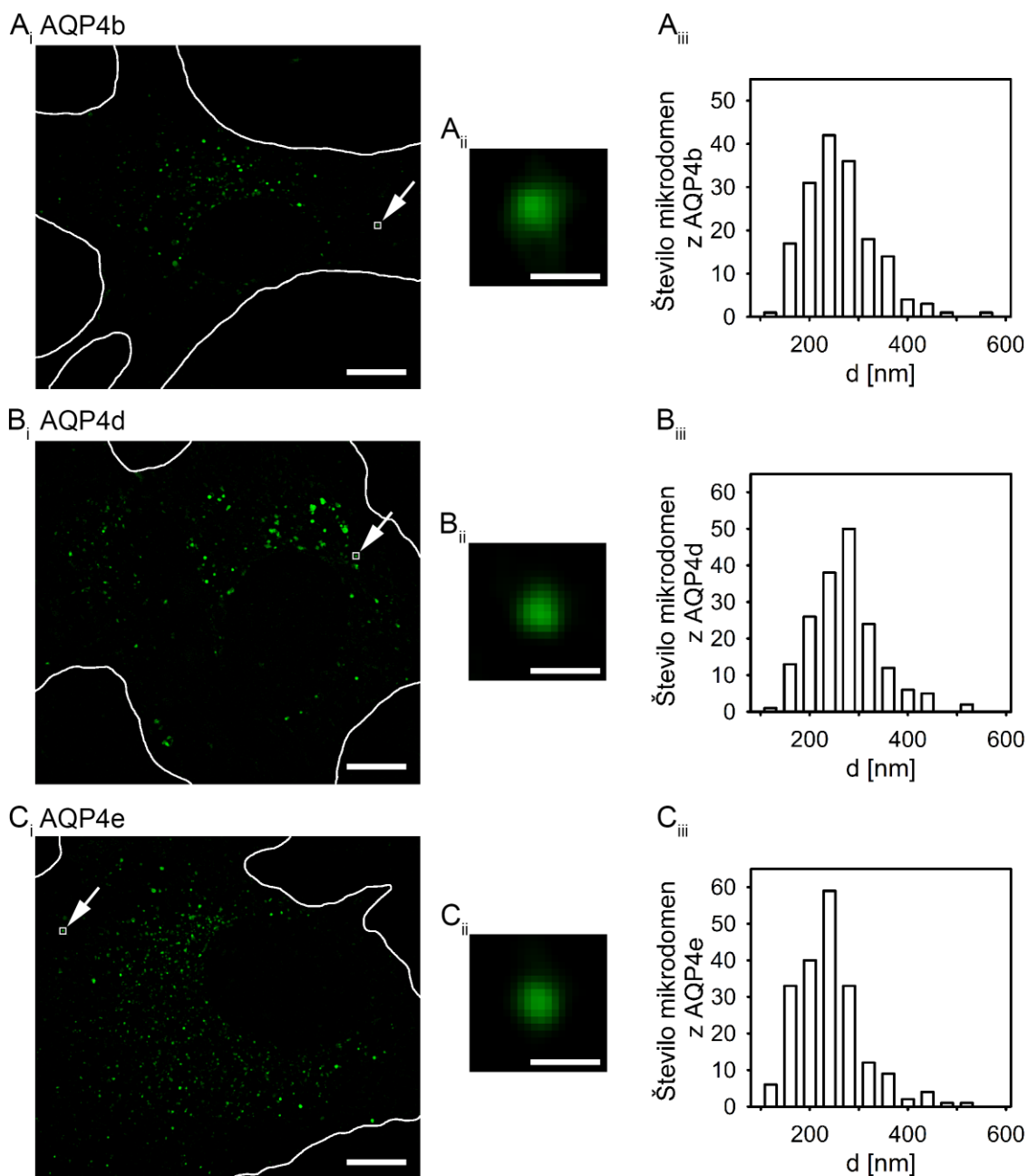
Velikost mikrodomen smo izmerili v astrocitih, ki so izražali native izooblike AQP4 in v astrocitih, v katere smo vnesli pDNA, ki kodirajo posamezne fluorescentno označene izooblike (glej Material in Metode). V celicah, fluorescentno označenih s protitelesi proti znotrajcelični domeni AQP4, ki prepozna vse native AQP4 (Slika 5B), smo izmerili 554 mikrodomen z AQP4 v petih celicah iz dveh različnih celičnih kultur. Velikost mikrodomen smo izmerili kot širino signala po sredini v dveh ortogonalnih smereh (Slika 5D), pri nadaljnji analizi pa smo upoštevali povprečje. Premeri mikrodomen z AQP4 so bili v območju 121–364 nm. Največ mikrodomen (39 %) je bilo velikih med 170 in 190 nm (Slika 5E).





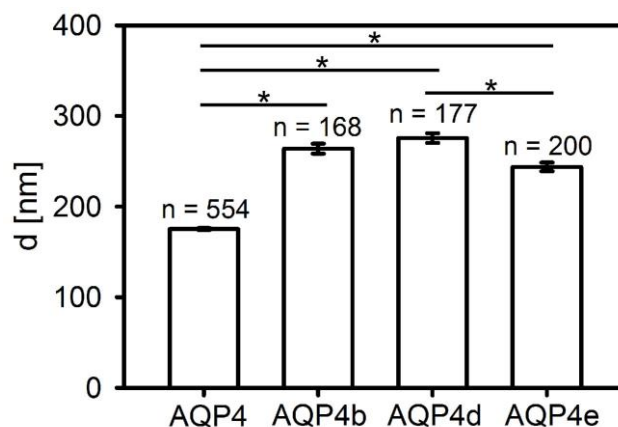
**Slika 5: AQP4 je prisoten v astrocitih.** (A) Na sliki je belo občrtan podganji astrocit iz primarne celične kulture, posnet s presevno svetlobo. Merilo: 10  $\mu\text{m}$ . (B) Isti astrocit kot na sliki A, označen s protitelesi proti AQP4, posnet s SIM superločljivostno mikroskopsko tehniko. Puščica označuje mikrodomeno, povečano na sliki C. (C) Povečana mikrodomena s slike B, označena s primarnimi protitelesi proti AQP4 in fluorescentnimi sekundarnimi protitelesi. S črto je označen presek mikrodomene, kjer smo izmerili intenziteto signala, ki je predstavljena na grafu D. Merilo: 400 nm. (D) Graf intenzitete fluorescence v odvisnosti od razdalje (d) ponazarja metodo, ki smo jo uporabili za določitev premera mikrodomene. Premer mikrodomene smo izmerili kot širino signala (angl. full width at half maximum (FWHM))n po sredini najvišje intenzitete ( $I_{max}$ ). A. E. – arbitrarna enota. (E) Graf porazdelitve velikosti mikrodomen z AQP4. Premeri mikrodomen z AQP4 so bili v območju 121–364 nm. Premer 364 nm je imela 1 mikrodomena. Izmerili smo 554 mikrodomen v petih celicah.

Nato smo v astrocite vnašali posamezne rekombinantne pDNA, ki so izražale rekombinantne fuzijske beljakovine med zeleno fluorescentno beljakovino (GFP) in izbrano izoobliko AQP4 (Slika 6Ai-Ci). Izmerili smo 168 mikrodomen z AQP4b v devetih celicah, 177 mikrodomen z AQP4d v sedmih celicah in 200 mikrodomen z AQP4e v šestih celicah. V vseh primerih so bile celice iz dveh različnih celičnih kultur. Razpon premerov mikrodomen je bil v podobnem velikostnem območju, in sicer 139–570 nm (AQP4b), 139–530 nm (AQP4d) in 138–538 nm (AQP4e). Največ mikrodomen z AQP4b (25 %) in z AQP4e (30 %) je bilo velikih med 240 in 260 nm, največ mikrodomen z AQP4d (28 %) pa med 280 in 300 nm (Slika 6Aiii–Ciii).



**Slika 6: Različne izooblike AQP4 izražene v astrocitih.** (Ai–Ci) Odseki podganjih astrocitov, v katere smo vnesli pDNA različnih izooblik AQP4 (AQP4b, AQP4d, AQP4e). S puščicami so označeni izseki, ki so povečani na slikah Aii–Cii. Merila: 10  $\mu\text{m}$ . (Aii–Cii) Povečane mikrodomene z izooblikami AQP4b, AQP4d in AQP4e. Premeri mikrodomen so: 258 nm (AQP4b na sliki Aii), 278 nm (AQP4d na sliki Bii), 240 nm (AQP4e na sliki Cii). Merila: 400 nm. (Aiii–Ciii) Grafi porazdelitev velikosti mikrodomen z AQP4b, AQP4d in AQP4e. Premeri mikrodomen z različnimi izooblikami AQP4 so bili v približno enakih velikostnih območjih: 139–570 nm (AQP4b), 139–530 nm (AQP4d) in 138–538 nm (AQP4e). Izmerjenih je bilo 168 mikrodomen z AQP4b v devetih celicah, 177 mikrodomen z AQP4d v sedmih celicah in 200 mikrodomen z AQP4e v šestih celicah.

Povprečen premer mikrodomen z nativnimi AQP4 je znašal  $175 \pm 1$  nm (povprečje  $\pm$  standardna napaka) in se je statistično značilno razlikoval (Dunnov test;  $P < 0,05$ ) od povprečnih premerov mikrodomen vseh treh izooblik AQP4. Povprečni premeri z izooblikami AQP4 so bili večji, in sicer  $264 \pm 6$  nm (AQP4b),  $276 \pm 5$  nm (AQP4d) in  $244 \pm 5$  nm (AQP4e). Premer mikrodomen z AQP4e je bil značilno manjši ( $P < 0,05$ ) od premera mikrodomen z AQP4d, medtem ko se velikosti mikrodomen z AQP4b in AQP4e ter AQP4b in AQP4d niso značilno razlikovale ( $P > 0,05$ ) (Slika 7).

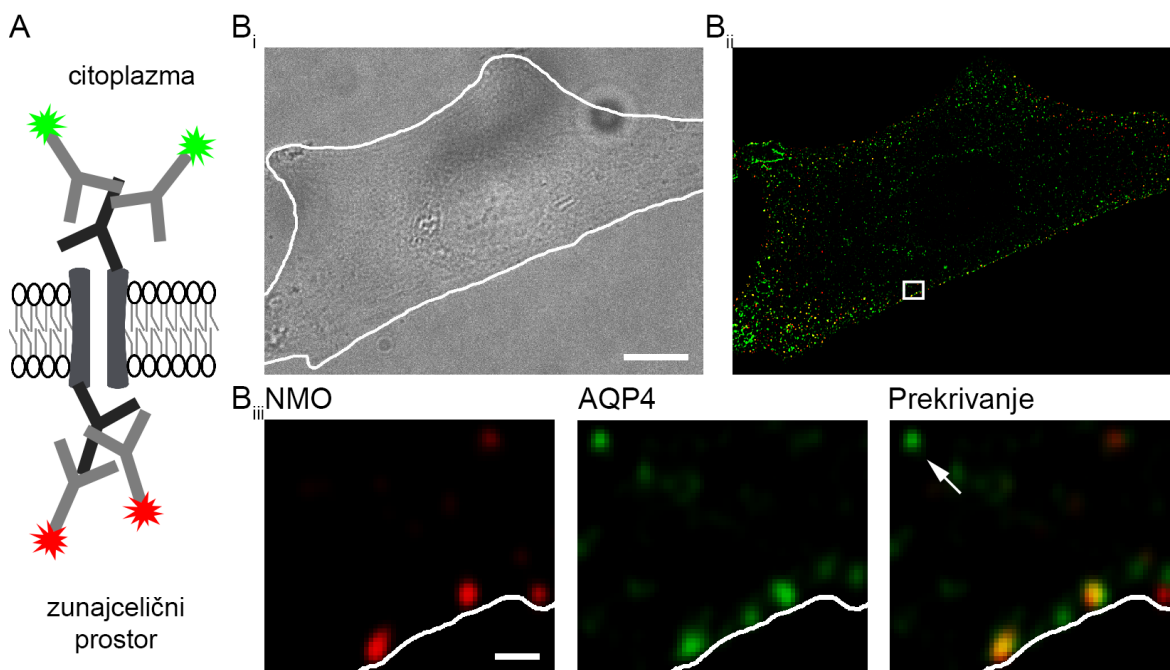


**Slika 7: Povprečne velikosti mikrodomen z nativnim AQP4 in z izooblikami AQP4b, AQP4d, AQP4e** (povprečje  $\pm$  standardna napaka, (n) – št. mikrodomen). Povprečja premerov mikrodomen so:  $175 \pm 1$  nm (AQP4),  $264 \pm 6$  nm (AQP4b),  $276 \pm 5$  nm (AQP4d),  $244 \pm 5$  nm (AQP4e). (\*) označuje statistično značilno razliko pri  $P < 0,05$ .

Torej, v primeru, ko smo označili mikrodomene po vsej celici, so bile tiste z izključno nativnim AQP4 najmanjše. Mikrodomene, ki so vsebovale rekombinantne izooblike AQP4, pa so bile večje. Ta razlika je zelo verjetno posledica prekomernega izražanja posameznih izooblik. Med mikrodomenami z rekombinantnimi izooblikami AQP4 so bile najmanjše tiste z izoobliko AQP4e. Razlika v velikosti lahko odraža različno porazdelitev izooblik znotraj celice in v plazmalemi. To smo v nadaljevanju preverili.

#### 4.1.2 AQP4e je prisoten tudi v plazmalemi, AQP4b in AQP4d pa sta izključno znotrajcelična

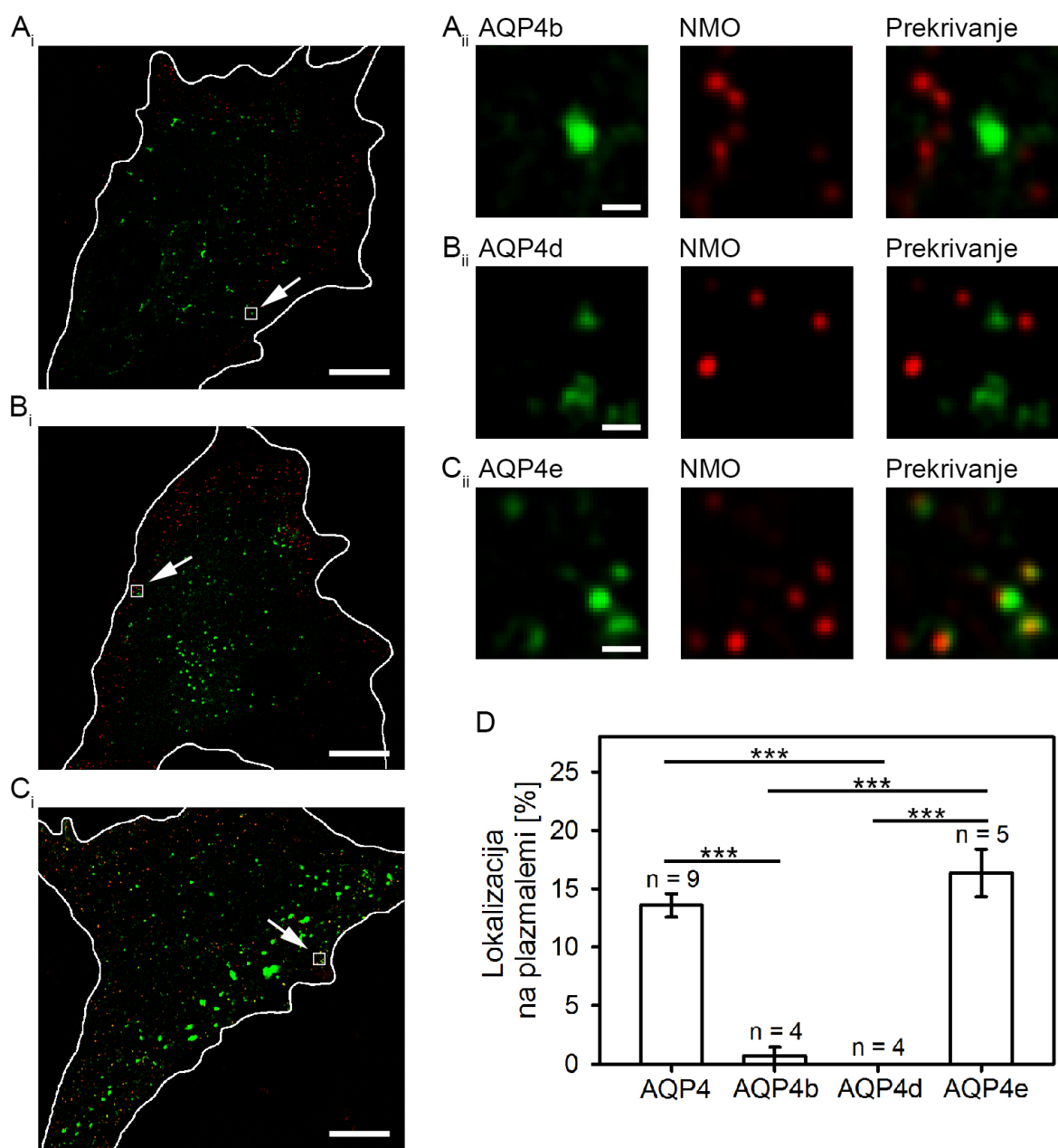
Najprej smo optimizirali metodo označevanja nativnega AQP4 v plazmalemi. V ta namen smo uporabili primarna protitelesa NMO, ki prepoznajo AQP4 izključno takrat, ko je vgrajen v ortogonalnih skupkih v plazmalemi (Nicchia in sod., 2009). Najprej smo AQP4 v plazmalemi (ortogonalne skupke) označili zunajcelično s protitelesi NMO, nato pa še znotrajcelično s komercialno dostopnimi protitelesi proti AQP4 (Slika 8A). Dvojno označeni fluorescentni signali predstavljajo AQP4 v plazmalemi (Slika 8B<sub>iii</sub>). Isti princip velja za ugotavljanje izooblik v plazmalemi, kjer znotrajcelični fluorescentni signal izhaja iz fluorescence beljakovine GFP.



**Slika 8: AQP4, ki so dvojno označeni, predstavljajo mikrodomene v plazmalemi. (A)** Shema (ni v merilu) prikazuje dvojno označevanje AQP4 s protitelesi. Zunajcelično zanko AQP4 smo označili s človeškimi primarnimi protitelesi NMO v kombinaciji z rdečimi fluorescentnimi sekundarnimi protitelesi. Isti AQP4 smo označili tudi z zajčjimi primarnimi protitelesi proti AQP4, ki se vežejo na C-terminalni konec na znotrajcelični strani AQP4, v kombinaciji z zelenimi fluorescentnimi sekundarnimi protitelesi. **(Bi)** Presečna slika podganjega astrocita iz primarne celične kulture. Merilo: 10  $\mu\text{m}$ . **(Bii)** Isti astrociti kot na sliki **Bi**, označeni s protitelesi NMO (rdeča fluorescenca) in s protitelesi proti AQP4 (zelen fluorescenca). Kvadrat označuje izsek, ki je povečan na sliki **Biii**. **(Biii)** Povečan izsek s slike **Bii** prikazuje posamezne mikrodomene z AQP4, označene s protitelesi NMO (rdeč signal) in s protitelesi proti AQP4 (zelen signal) ter prekrivanje signalov (rumen signal). Črta predstavlja rob plazmaleme, ki smo ga določili na presečni sliki. Puščica označuje označen AQP4 v notranjosti celice. Merilo: 400 nm.

Nato smo v celicah, kjer smo označili nativni AQP4, in v celicah, v katerih smo izrazili izbrane izooblike AQP4, ugotavljali prisotnost AQP4 v plazmalemi. Slika 9 prikazuje astrocite, v katerih so s protitelesi NMO označeni AQP4 v plazmalemi (rdeč signal) in rekombinantne izooblike AQP4 (zelen signal).

Ugotovili smo, da se protitelesa NMO lahko vezala le na izoobliko AQP4e (Slika 9Cii), iz česar lahko zaključimo, da se izmed preverjenih izooblik, le izooblika AQP4e vgrajuje v plazmalemo. Izoobliki AQP4b in AQP4d nismo opazili v plazmalemi (Slika 9Ai-Aii, Slika 9Bi-Bii) in se torej pojavljata znotrajcelično.



**Slika 9: Izooblika AQP4e je prisotna v plazmalemni astrocitov. (Ai–Ci)** Podganji astrociti v katere smo vnesli pDNA posameznih izooblik AQP4b, AQP4d, AQP4e (zelena fluorescenca) in jih označili s človeškimi primarnimi protitelesi NMO (rdeča fluorescenca). S puščico so označeni izseki, ki so povečani na slikah **Aii–Cii**. Merila: 10  $\mu$ m. **(Aii–Cii)** Povečani izseki s slik **Ai–Ci** prikazujejo posamezne mikrodomene z izraženimi izooblikami AQP4 (zelen signal) in označene s protitelesi NMO (rdeč signal) ter prekrivanje signalov (rumen signal). Signala sta se prekrivala le pri izoobliki AQP4e. Merila: 400 nm. **(D)** Graf lokalizacije AQP4 in izooblik AQP4b, AQP4d, AQP4e v plazmalemni (povprečje  $\pm$  standardna napaka, (n) – št. celic). Povprečja lokalizacije mikrodomen v plazmalemni astrocitov, prikazana v procentih: 14  $\pm$  1 (AQP4), 0,7  $\pm$  0,7 (AQP4b), 0,0  $\pm$  0,0 (AQP4d), 16  $\pm$  2 (AQP4e). (\*\*\*) označuje statistično značilno razliko pri P < 0,001.

Delež AQP4 v plazmalemih smo nato izračunali kot razmerje števila mikrodomen v plazmalemih (rumen signal) proti vsem mikrodomenam v celici in v plazmalemih (zelen signal). Rezultati izračunov lokalizacije mikrodomen v plazmalemih so pokazali, da je izooblike AQP4e značilno največ v plazmalemih, in sicer je bilo  $16 \pm 2$  % (povprečje  $\pm$  standardna napaka) mikrodomen z AQP4e lociranih v plazmalemih. Enosmerna analiza variance (Holm-Sidak) je pokazala statistično značilno podobnost ( $P = 0,112$ ) med lokalizacijo AQP4e in mikrodomen z nativnim AQP4, katerih lokalizacija v plazmalemih je znašala  $14 \pm 1$  %. Statistično značilno podobnost ( $P = 0,738$ ) smo dobili tudi v primeru AQP4b in AQP4d, ki v plazmalemih praktično nista bila prisotna. Lokalizacija AQP4b v plazmalemih je  $1 \pm 1$  %, kar je najverjetnejša posledica lokalizacije AQP4b blizu plazmaleme po z-osi. To velja tudi za AQP4d, katerega lokalizacija v plazmalemih je bila  $0 \pm 0$  % (Slika 9D). Pri vseh skupinah so bile analizirane celice iz dveh različnih celičnih kultur.

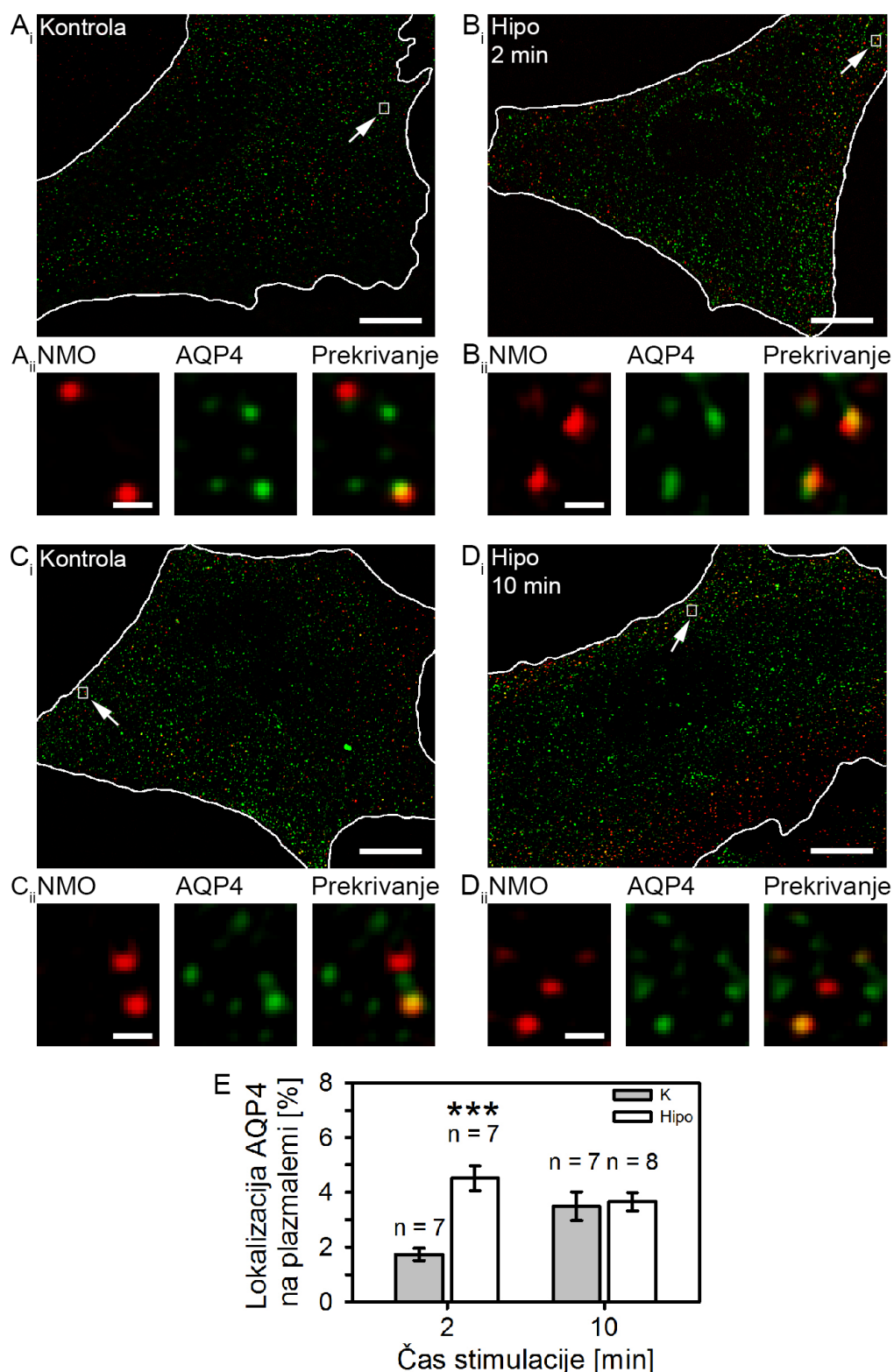
## 4.2 VPILV HIPOOSMOTSKIH RAZMER NA RAZPOREDITEV AQP4 V PLAZMALEMI ASTROCITOV

V nadaljevanju smo ugotavljali, ali se delež AQP4 v plazmalemih spremeni v hipoosmotskih razmerah. S hipoosmolarno stimulacijo smo posnemali razmere, ki se pojavijo pri možganskem edemu. V nedavni raziskavi so Potokar in sod. (2013) pokazali, da se po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino prehodno poveča lokalizacija nativnega AQP4 z markerji, ki označujejo plazmalemo. V tej raziskavi smo preverili, ali in kako hipoosmotsko okolje vpliva neposredno na lokalizacijo treh izbranih izooblik AQP4 v plazmalemih.

### 4.2.1 Po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino se v plazmalemih poveča število mikrodomen z AQP4 in AQP4e

Delež zastopanosti AQP4 v plazmalemih astrocitov smo merili v različnih časovnih intervalih po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino (Slika 10). Delež mikrodomen z AQP4 v plazmalemih je bil po 2-minutni hipoosmotski stimulaciji  $5 \pm 1$  % (povprečje  $\pm$  standardna napaka), kar je za 150 % višji od kontrole, pri kateri je bil delež  $2 \pm 0$  %. Razlika je bila značilna (t-test;  $P < 0,001$ ) (Slika 10E). Po 10-minutni izpostavljenosti hipoosmotskim razmeram je bila lokalizacija AQP4 v plazmalemih ( $4 \pm 0$  %) podobna kontrolni skupini ( $4 \pm 0$  %,  $P = 0,788$ ). Podoben trend spreminjanja deleža AQP4 v plazmalemih so zaznali tudi v članku Potokar in sod. (2013). Ker sta se kontrolni skupini 2-minutne in 10-minutne hipoosmotske stimulacije značilno razlikovali (t-test;  $P = 0,023$ ), smo med sabo primerjali le podatke istega časa stimulacije.

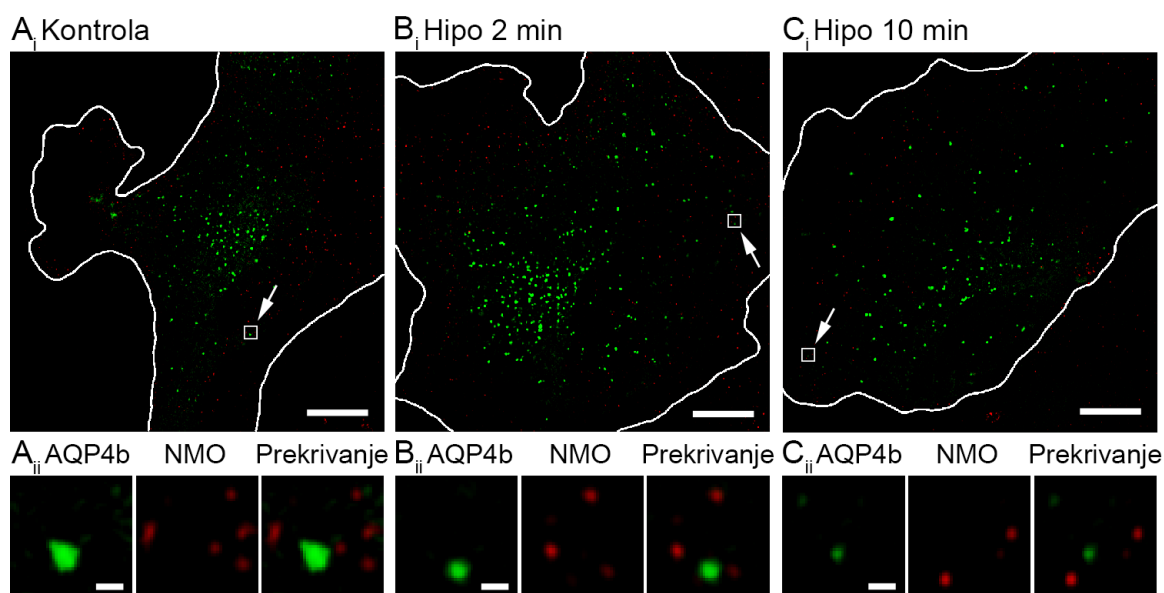




**Slika 10:** Po dvominutni stimulaciji s hipoosmolarno raztopino pride do statistično značilnega povečanja števila mikrodomen z AQP4 v plazmalemi. (Ai–Di) Podganji astrociti označeni s protitelesi NMO (rdeča fluorescenca) in s protitelesi proti AQP4 (zelena fluorescenca). Celici na sliki Ai in Ci prikazujeta razporeditev AQP4 v spontanah razmerah z 2-minutno (Ai) oz. 10-minutno (Ci) inkubacijo v zunajcelični raztopini. Slika Bi prikazuje razporeditev AQP4 po 2-minutni, slika Di pa po 10-minutni

stimulaciji s hipoosmolarno raztopino. Puščice označujejo izseke, ki so povečani na slikah **Aii–Dii**. Merila: 10  $\mu\text{m}$ . (**Aii–Dii**) Povečan izseki prikazujejo posamezne AQP4 mikrodomene, označene s protitelesi NMO (rdeči signal) in s protitelesi proti AQP4 (zeleni signal) ter prekrivanje signalov (rumeni signal). Merila: 400 nm. (**E**) Graf lokalizacije AQP4 v plazmalemi podganjih astrocitov v spontanah razmerah (K) in po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino (Hipo) (povprečje  $\pm$  standardna napaka, (n) – št. celic). Po 2-minutni stimulaciji se poveča število mikrodomen z AQP4 v plazmalemi, po 10-minutni stimulaciji pa je lokalizacija mikrodomen v plazmalemi podobna kontroli. Delež mikrodomen z AQP4 v plazmalemi astrocitov, prikazan v procentih:  $2 \pm 0$  (K, 2 min),  $5 \pm 1$  (Hipo, 2 min),  $4 \pm 1$  (K, 10 min),  $4 \pm 0$  (Hipo, 10 min). Celice so bile iz treh različnih celičnih kultur. (\*\*\*) označuje statistično značilno razliko pri  $P < 0,001$ .

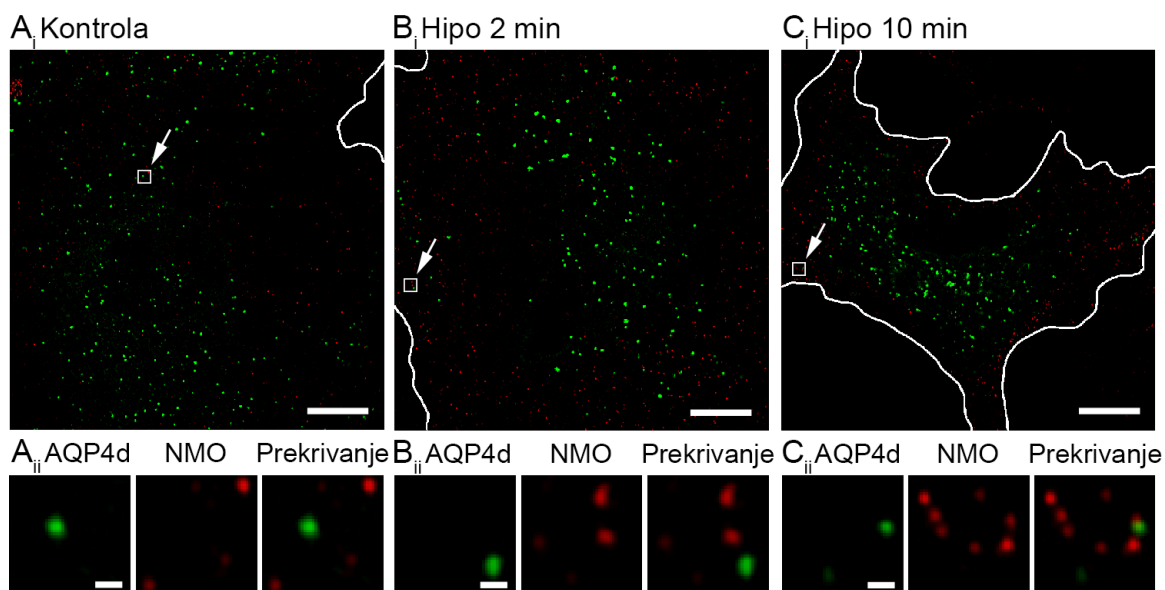
Nato smo preverili, kako se posamezne izooblike odzivajo na stimulacijo s hipoosmolarno raztopino. V astrocitih smo izrazili različne rekombinantne izooblike AQP4 (AQP4b, AQP4d in AQP4e) in jih v različnih časovnih intervalih po hipoosmotski stimulaciji označili s protitelesi NMO, ki prepoznajo AQP4 v plazmalemi.



**Slika 11: Razporeditev AQP4b ostaja po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino znotrajcelična. (Ai–Ci)** Podganji astrociti v katere smo vnesli pDNA, ki kodira izoobliko AQP4b (zeleno fluorescenca) in označeni s človeškimi primarnimi protitelesi NMO (rdeča fluorescenca). Na sliki **Ai** je prikazana celica v spontanah razmerah, na sliki **Bi** dve minuti po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino, na sliki **Ci** deset minut po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino. Puščice označujejo izseke, ki so povečani na slikah **Aii–Cii**. Merila: 10  $\mu\text{m}$ . (**Aii–Cii**) Posamezne mikrodomene z AQP4b (zelen signal) in označene s protitelesi NMO (rdeč signal) niso prekrite. Merila: 400 nm.

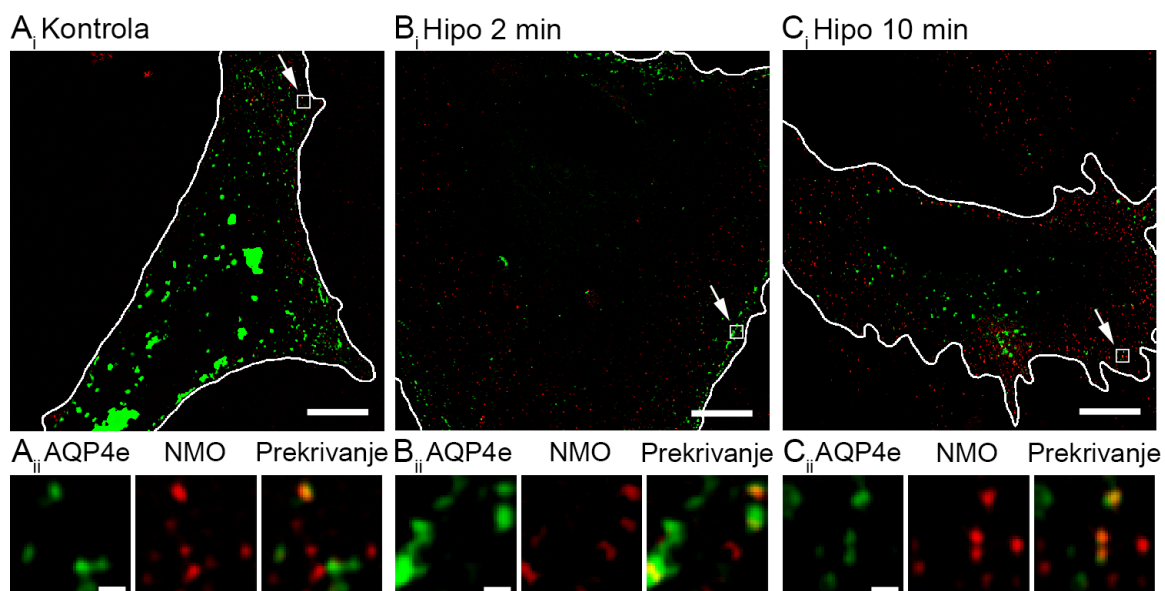
Pri izoobliki AQP4b in AQP4d tudi po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino ni bilo prekrivanja med fluorescentnim signalom AQP4b in protitelesi NMO (Sliki 11 in 12).





**Slika 12: Razporeditev AQP4d ostaja po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino znotrajcelična. (Ai–Ci)** Podganji astrociti v katere smo vnesli pDNA, ki kodira izoobliko AQP4d (zelena fluorescenca) in označeni s človeškimi primarnimi protitelesi NMO (rdeča fluorescenca). Na sliki **Ai** je prikazana celica v spontanah razmerah, na sliki **Bi** dve minuti po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino, na sliki **Ci** deset minut po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino. Puščice označujejo izseke, ki so povečani na slikah **Aii–Cii**. Merila: 10  $\mu$ m. (**Aii–Cii**) Povečani izseki posameznih mikrodomen z AQP4d (zelen signal) in označene s protitelesi NMO (rdeč signal), prekrivanja zelene in rdeče fluorescence ni. Merila: 400 nm.

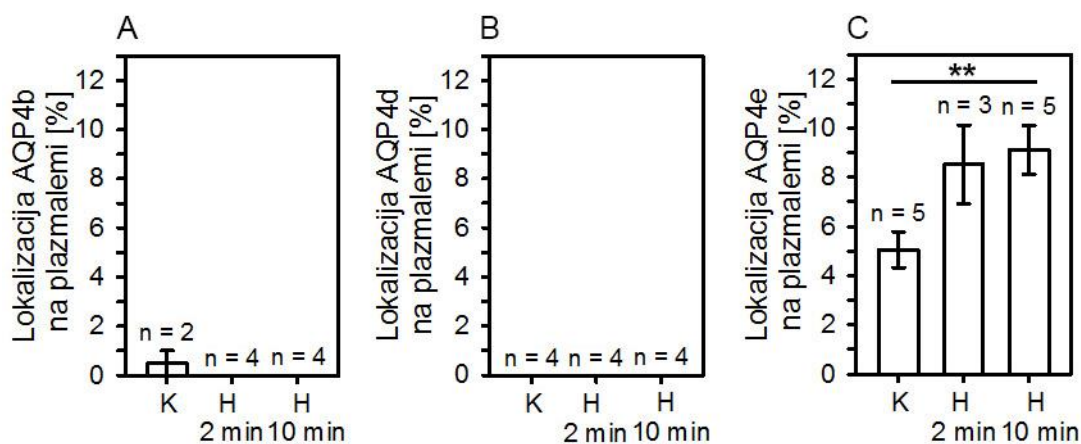
Pri izoobliki AQP4e pa so hipoosmotske razmere sprožile spremembe v lokalizaciji v plazmalem astrocitov, razvidne kot več prekritega signala med AQP4e in NMO protitelesi (Slika 13C<sub>ii</sub>).



**Slika 13: Delež AQP4e v plazmalem astrocitov se po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino poveča. (Ai–Ci)** Podganji astrociti v katere smo vnesli pDNA, ki kodira izoobliko AQP4e (zelena fluorescenca) in označeni s človeškimi primarnimi protitelesi NMO (rdeča fluorescenca). Na sliki **Ai** je prikazana celica v spontanah razmerah, na sliki **Bi** dve minuti po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino, na sliki **Ci** deset minut

po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino. Puščice označujejo izseke, ki so povečani na slikah **Aii–Cii**. Merila: 10  $\mu$ m. (**Aii–Cii**) Posamezne mikrodomene z AQP4e (zelen signal) in označene s protitelesi NMO (rdeč signal) ter prekrivanje signalov (rumen signal). Merila: 400 nm.

Rezultati deležev vseh izooblik AQP4 v plazmalemii po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino so predstavljeni v Sliki 14. Delež mikrodomen z AQP4b v plazmalemii kontrolnih celic je bil zanemarljivo majhen  $1 \pm 1$  % in se ni značilno (Kruskal-Wallis;  $P = 0,651$ ) razlikoval od deleža v stimuliranih celicah, ki je bil  $0 \pm 0$  % (Slika 14A). Delež mikrodomen z AQP4d je bil pri kontroli in po stimulaciji  $0 \pm 0$  % (Slika 14B). Po 2-minutni stimulaciji se je delež AQP4e v plazmalemii povečal iz  $5 \pm 1$  % na  $9 \pm 2$  %, vendar ta razlika ni bila statistično značilna (Holm-Sidak;  $P = 0,051$ ). Lokalizacija AQP4e v plazmalemii je ostala visoka ( $9 \pm 1$  %) tudi po 10-minutni stimulaciji in se je značilno ( $P = 0,013$ ) razlikovala od kontrole (Slika 14C).

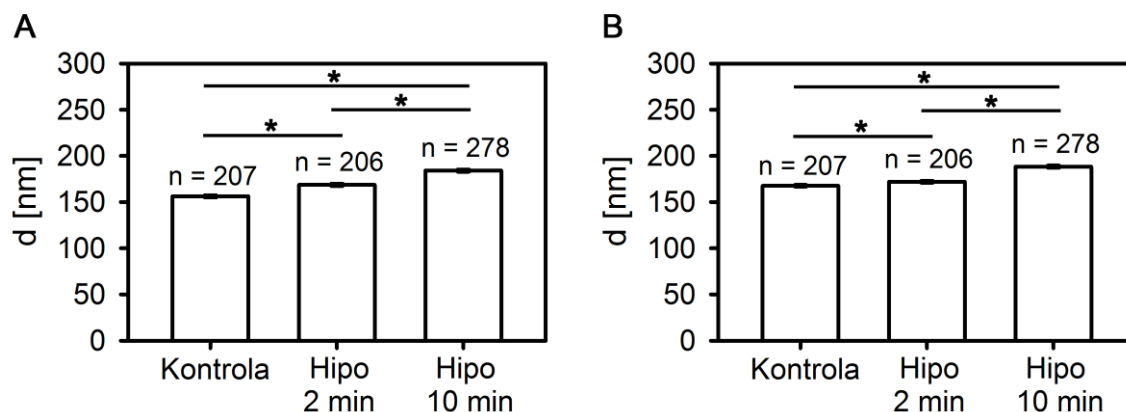


**Slika 14:** Delež izooblike AQP4e v plazmalemii astrocitov se po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino značilno poveča, deleža izooblik AQP4b in AQP4d pa ostaneta nespremenjena (povprečje  $\pm$  standardna napaka, (n) – št. celic). Število mikrodomen z AQP4b in AQP4d se v plazmalemii po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino (H) ni povečalo (**A**, **B**, glej tudi **Sliki 11** in **12**). Delež AQP4e pa je v plazmalemii višji v hipoosmotskih (**C**), kot v spontanah razmerah (K). Povprečja lokalizacije izooblik AQP4 v plazmalemii astrocitov, prikazane v procentih:  $1 \pm 1$  (AQP4b, K),  $0 \pm 0$  (AQP4b, H 2 min),  $0 \pm 0$  (AQP4b, H 10 min);  $0 \pm 0$  (AQP4d, K),  $0 \pm 0$  (AQP4d, H 2 min),  $0 \pm 0$  (AQP4d, H 10 min);  $5 \pm 1$  (AQP4e, K),  $9 \pm 2$  (AQP4e, H 2 min),  $9 \pm 1$  (AQP4e, H 10 min). Celice so bile iz ene celične kulture. (\*) označuje statistično značilno razliko pri  $P = 0,013$ .

#### 4.2.2 Po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino se v plazmalemii povečajo mikrodomene z AQP4

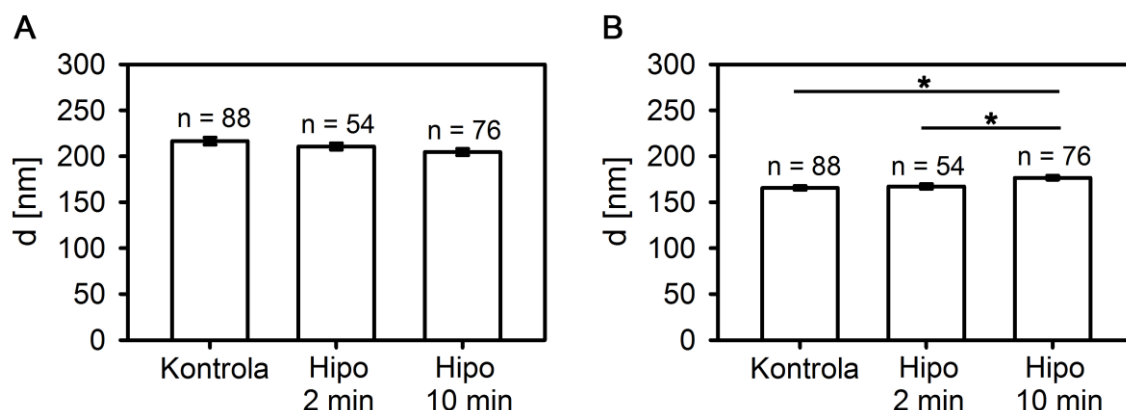
Ko opazujemo lokalizacijo AQP4 v plazmalemii pomeni, da pravzaprav opazujemo t.i. ortogonalne skupke, v katere se AQP4 v plazmalemii združijo (Yang in sod., 1996). Želeli smo ugotoviti, ali lahko hipoosmotsko okolje vpliva na spreminjanje velikosti ortogonalnih skupkov. V ta namen smo izmerili premer mikrodomen z AQP4 v plazmalemii v izoosmotskih razmerah (kontrola) in po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino. Mikrodomene smo označili z zunanje strani s protitelesi NMO in z notranje strani s protitelesi proti znotrajcelični domeni AQP4. Izmerili smo velikosti obeh signalov.

Izkazalo se je, da se premer mikrodomen z AQP4 značilno povečuje (Dunnov test;  $P < 0,05$ ) z daljšanjem hipoosmotske stimulacije v obeh primerih merjenja (Slika 15A in B). Velikost istih mikrodomen, merjenih na notranji strani celice, se je že po 2-minutni stimulaciji povečala za 8 %, po 10-minutni pa za 18 % v primerjavi s kontrolno (Slika 15A). Mikrodome, merjene na zunanji strani celice, so se po 2-minutni stimulaciji povečale za 2 %, po 10-minutni pa za 12 % (Slika 15B).



**Slika 15: Hipoosmotske razmere povzročijo takojšnje povečanje mikrodomen z AQP4 v plazmalemi astrocitov** (povprečje ± standardna napaka, (n) – št. mikrodomen). Že po 2-minutni stimulaciji se premeri mikrodomen z AQP4 v plazmalemi povečajo. Z daljšanjem izpostavljenosti hipoosmotskim razmeram se trend povečevanja velikosti mikrodomen v plazmalemi nadaljuje. (A) Povprečja premerov mikrodomen, označenih s protitelesi proti znotrajcelični domeni AQP4:  $156 \pm 1$  nm (Kontrola; 5 celic),  $169 \pm 1$  nm (Hipo, 2 min; 5 celic),  $184 \pm 1$  nm (Hipo, 10 min; 5 celic). (B) Povprečja premerov mikrodomen z AQP4, označenih z NMO protitelesi:  $168 \pm 1$  nm (Kontrola; 5 celic),  $172 \pm 1$  nm (Hipo, 2 min; 5 celic),  $188 \pm 1$  nm (Hipo, 10 min; 5 celic). Celice so bile iz treh različnih celičnih kultur. (\*) označuje statistično značilno razliko pri  $P < 0,05$ .

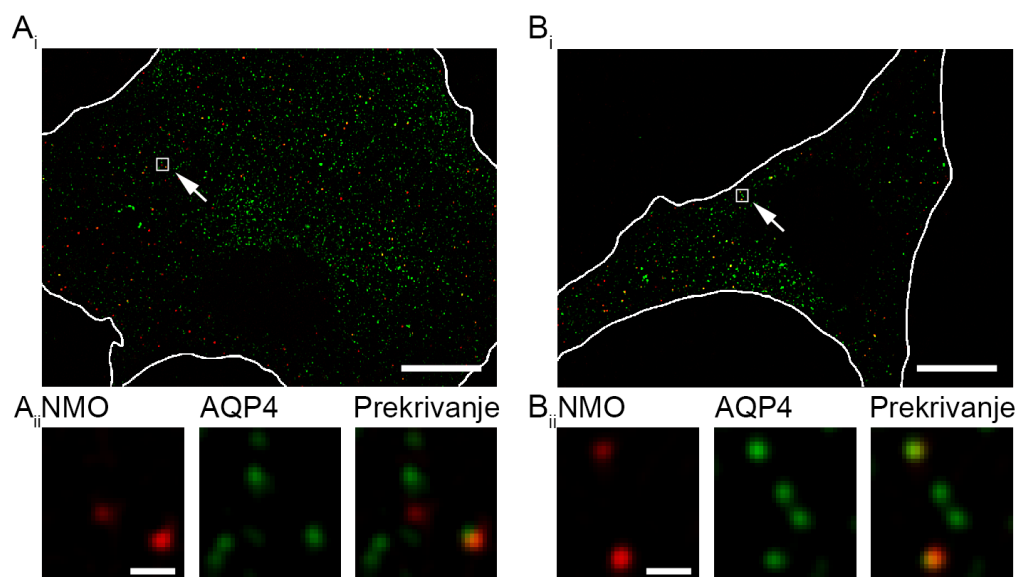
Nato smo izmerili še premer mikrodomen v plazmalemi, ki so vsebovale izoobliko AQP4e. Velikost mikrodomen označenih z znotrajceličnim signalom, ki izvira iz fluorescence GFP rekombinantne beljakovine AQP4e, se po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino ni spremenila (Kruskal-Wallis;  $P = 0,184$ , Slika 16A). Izmerili pa smo trend povečevanja velikosti istih mikrodomen v plazmalemi, označenih zunajcelično s protitelesi NMO. Po 2-minutni stimulaciji je bila velikost mikrodomen z AQP4e v plazmalemi podobna kontrolni skupini (Dunnov test;  $P > 0,05$ ). Do značilnega ( $P < 0,05$ ) povečanja mikrodomen z AQP4e v plazmalemi je prišlo po 10-minutni stimulaciji, in sicer so je premer mikrodomen povečal za 7 % v primerjavi s kontrolno (Slika 16B).



**Slika 16: Mikrodomene (ortogonalni skupki) z AQP4e v plazmalem astrocitov se povečajo po izpostavljenosti hipoosmotskim razmeram** (povprečje ± standardna napaka, (n) – št. mikrodomen). **(A)** Povprečja premerov mikrodomen AQP4 v plazmalem, ki so vsebovali izoobliko AQP4e. Vrednosti predstavljajo meritve znotrajceličnega signala AQP4e. Velikost premerov mikrodomen označenih z znotrajceličnim signalom AQP4e se po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino ni spremenila: 216 ± 4 nm (Kontrola; 5 celic), 211 ± 4 nm (Hipo, 2 min; 3 celice), 205 ± 4 nm (Hipo, 10 min; 6 celic). **(B)** Povprečja premerov mikrodomen AQP4 v plazmalem, ki so vsebovali izoobliko AQP4e. Vrednosti predstavljajo meritve zunajceličnega signala NMO. Po 2-minutni stimulaciji se premeri mikrodomen z AQP4e, označeni s protitelesi NMO, v plazmalem bistveno ne spremenijo, povečajo pa se po 10-minutni stimulaciji. Povprečja premerov mikrodomen z AQP4, označenih z NMO protitelesi: 166 ± 2 nm (Kontrola; 5 celic), 167 ± 3 nm (Hipo, 2 min; 3 celice), 177 ± 2 nm (Hipo, 10 min; 6 celic). Celice so bile iz ene celične kulture. (\*) označuje statistično značilno razliko pri  $P < 0,05$ .

#### 4.3 V MIŠJIH ASTROCITIH Z UTIŠANIM GENOM *Gdi1* OSTANE DELEŽ AQP4 V PLAZMALEM NESPREMENJEN

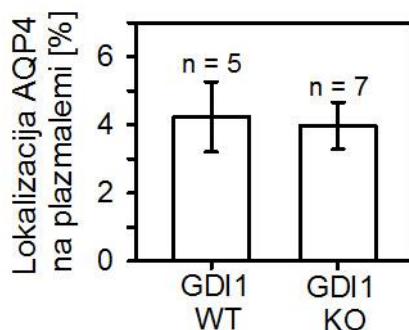
Beljakovine Rab uravnavajo celični transport med organeli in plazmalemo (Zerial in McBride, 2001). Nahajajo se na membranskih celičnih predelkih, in omogočajo njihov znotrajcelični transport, vključno s tvorbo z membrano obdanih mešičkov, njihovo premikanje in sidranje v tarčne membrane (Stenmark, 2009; Horgan in McCaffrey, 2011). Beljakovine Rab se nato v GDP (gvanozin difosfat) vezani obliki s tarčnih membran odcepijo in se vrnejo na donorske membrane. To jim omogočajo beljakovine GDI (GDP disociacijski inhibitor), ki usmerjajo njihov transport v citosolu. Poznamo dve obliki beljakovine GDI, in sicer  $\alpha$ GDI in  $\beta$ GDI (Pfeffer in sod., 1995). Gen *Gdi1* nosi zapis za beljakovino  $\alpha$ GDI. Ker znotrajcelični transport AQP4 poteka v z membrano obdanih mešičkih (Madrid in sod., 2001; Potokar in sod., 2013), bi lahko odsotnost te beljakovine v celici vplivala na lokalizacijo AQP4 v plazmalem astrocitov. V poskusih smo uporabili mišje astrocite, ki imajo utišan gen *Gdi1* (*Gdi1* KO) in kontrolne astrocite divjega tipa (*Gdi1* WT).



**Slika 17: Razporeditev AQP4 v plazmalemii je podobna v mišjih astrocitih *Gdi1* WT in *Gdi1* KO. (Ai, Bi) Mišja astrocita označena s protitelesi NMO (rdeča fluorescenca) in s protitelesi proti AQP4 (zelena fluorescenca). Astrocit s slike Ai je divji tip (*Gdi1* WT), astrocit s slike Bi pa ima utišan gen *Gdi1* (*Gdi1* KO). Puščici označujeta izseka, ki sta povečana na slikah Aii in Bii. Merili: 10  $\mu$ m. (Aii, Bii) Posamezne mikrodomene AQP4 označene s protitelesi NMO (rdeč signal) in s protitelesi proti AQP4 (zelen signal) ter prekrivanje signalov (rumen signal). Merili: 400 nm.**

Izkazalo se je, da odsotnost beljakovine  $\alpha$ GDI ne vpliva na zlivanje mešičkov z AQP4 s plazmalemii. Lokalizacija AQP4 v plazmalemii mišjih astrocitov, ki so imeli utišan gen *Gdi1*, je bila podobna (t-test;  $P = 0,831$ ), kot pri kontrolnih celicah divjega tipa. Delež mikrodomen z AQP4 v plazmalemii je bil v kontrolnih celicah in v celicah z utišanim genom *Gdi1*  $4 \pm 1\%$  (Sliki 17 in 18).

Ugotovili smo, da dolgotrajna odsotnost izražanja gena *Gdi1* ne vpliva na lokalizacijo AQP4 v plazmalemii, kar lahko pomeni, da  $\alpha$ GDI ni edina pomembna beljakovina za odcepljanje beljakovin Rab z AQP4 mešičkov oziroma, da je v odsotnosti beljakovine  $\alpha$ GDI regulacijo transporta mešičkov z AQP4 prevzela druga beljakovina GDI.



**Slika 18: Delež AQP4 v plazmalemii mišjih astrocitov se ob odsotnosti beljakovine  $\alpha$ GDI ne spremeni (povprečje  $\pm$  standardna napaka, (n) – št. celic). Delež mikrodomen z AQP4 je podoben v plazmalemii mišjih astrocitov *GDI1* WT in *GDI1* KO. Delež mikrodomen z AQP4 v plazmalemii:  $4 \pm 1\%$  (*GDI1* WT),  $4 \pm 1\%$  (*GDI1* KO). Celice so bile iz ene celične kulture.**

## 5 RAZPRAVA

V možganih predstavljajo vodni kanali AQP4 poglavitno pot za prehajanje vode med možganovino in krvjo tako v fizioloških, kot v patoloških razmerah (Amiry-Moghaddam in sod., 2003). V tkivu, ne pa tudi v izoliranih celičnih kulturah, so prisotni predvsem na izrastkih astrocitov okrog krvno-možganske pregrade (Nielsen in sod., 1997), manj pogosti so na stikih s sinapsami (Nielsen in sod., 1997). V podganjih astrocitih se izraža šest izooblik AQP4 (Jung in sod., 1994; Moe in sod., 2008). Raziskovali smo lastnosti mikrodomen (tj. območij z AQP4) treh izooblik, AQP4b, AQP4d in AQP4e. Te izooblike so bile odkrite nedavno (Moe in sod., 2008) in so njihove lastnosti še neraziskane. Mi smo preučevali velikosti mikrodomen znotraj celic in v plazmalemi ter njihov odziv na razmere, podobne tistim, ki se pojavijo pri možganskem edemu.

Primerjava povprečnih premerov mikrodomen izmerjenih po vsej celici je pokazala, da so mikrodomene z AQP4b ( $264 \pm 6$  nm) in z AQP4d ( $276 \pm 5$  nm) nekoliko večje od mikrodomen z AQP4e ( $244 \pm 5$  nm). Vse te mikrodomene pa so bile večje od mikrodomen z nativnim AQP4 v kontrolnih celicah ( $175 \pm 1$  nm). Razlag za razliko v velikostih med mikrodomenami s posameznimi izooblikami in nativnim AQP4 je lahko več. Gotovo nekoliko prispeva tudi povečano izražanje posameznih rekombinantnih izooblik. Predvsem pa lahko gre za različno znotrajcelično razporeditev izooblik in njihov različen delež v plazmalemi.

Velikosti premerov znotrajceličnih mikrodomen AQP4 so odvisne od velikosti celičnih razdelkov, na katerih se nahajajo. Moe in sod. (2008) so za izoobliko AQP4b pokazali, da se v celicah HeLa njena porazdelitev ujema z lokalizacijo Golgijevega aparata. Potokar in sod. (2013) so pokazali, da se je po 24-urnem izražanju večina izooblik AQP4d in AQP4e v podganjih astrocitih nahajala v večjih celičnih razdelkih. Ti razdelki so bili identificirani kot lizosomi in Golgijevev aparat, ki so relativno velike strukture s premeri od približno 300 do več kot 700 nm (Gruenberg in Maxfield, 1995; Ladinsky in sod., 1999; Marsh in sod., 2001; Ganley in sod., 2004; Moe in sod., 2008; Potokar in sod., 2013). Razponi premerov mikrodomen izooblik AQP4b, AQP4d in AQP4e, ki smo jih izmerili v naši raziskavi, so v skladu s temi velikostmi. Hkrati smo ugotovili, da imajo znotrajcelične mikrodomene povprečno večji premer kot ortogonalni skupki v plazmalemi. Razlika v velikosti je lahko posledica razporejanja tetramerov AQP4 v ortogonalne skupke.

Katere od izooblik AQP4b, AQP4d, AQP4e se razporejajo v plazmalemo, je bilo naslednje vprašanje. Ugotovili smo, da sta izoobliki AQP4b in AQP4d skoraj izključno znotrajcelični (Slika 9). V primeru izooblike AQP4b smo sicer zabeležili 1 % mikrodomen v plazmalemi. Glede na to, da smo opazili samo eno mikrodomeno z AQP4b v plazmalemi ene celice, bi lahko zaradi omejene ločljivosti mikroskopa videli prekrivanje signalov dveh različnih mikrodomen, ki sta locirani tesno skupaj – znotrajcelične z AQP4b in mikrodomene v plazmalemi (ki so jo prepoznala protitelesa NMO). V članku Potokar in sod. (2013) so nasprotno od naših rezultatov pokazali tudi prisotnost AQP4d v področjih, ki so se pokrivali z markerji za plazmalemo. Do različnih rezultatov je najverjetneje prišlo zaradi



uporabe različnih metod za označevanje AQP4 v plazmalemi. V raziskavi Potokar in sod. (2013) so z lipidnim barvilom označili celotno plazmalemo in izmerili kolokalizacijo AQP4d s plazmalemo, ki je bila ~40 %. Verjetno so bili v lokalizacijo v plazmalemi všteti tudi mešički z AQP4d, ki so bili tik pod plazmalemo. V našem primeru smo uporabili metodo, s katero smo s protitelesi NMO označili izključno posamezne mikrodomene v plazmalemi (ortogonalne skupke) tako, da so morali biti AQP4 vgrajeni v plazmalemo. Poleg tega smo uporabili mikroskopsko tehniko SIM, za katero je značilna do dvakrat boljša ločljivost kot je pri konfokalnem mikroskopu (Schermele in sod., 2008). Pokazali smo, da AQP4d ni prisoten v plazmalemi podganjih astrocitov.

Izmed novo odkritih izooblik AQP4 smo v plazmalemi astrocitov nedvoumno potrdili prisotnost le AQP4e (Slika 9). Delež mikrodomen z AQP4 (~14 %) v plazmalemi je bil podoben deležu mikrodomen z AQP4e (~16 %), kar kaže na to, da je izooblika AQP4e pomembno zastopana v plazmalemi astrocitov. Te vrednosti so približno štirikrat nižje od vrednosti, ki so bile izmerjene v raziskavi Potokar in sod. (2013), kjer so izmerili lokalizacijo v plazmalemi pri AQP4 ~58 % in pri AQP4e ~67 %. Razlika izhaja iz uporabe drugačne metode označevanja AQP4. Ugotovitev, da se izooblika AQP4e nahaja tudi v plazmalemi, se ujema z raziskavama Moe in sod. (2008) in Potokar in sod. (2013), kjer so v celicah HeLa, astrocitnih celičnih linijah in primarnih kulturah podganjih astrocitov pokazali lokalizacijo AQP4 v plazmalemi. Hkrati se rezultati ujemajo z raziskavo Strand in sod. (2009), kjer so ugotovili, da AQP4e v plazmalemi tvori ortogonalne skupke skupaj z izooblikama AQP4c in AQP4a. V prvem odstavku omenjene razlike v velikosti mikrodomen med izooblikami AQP4e in AQP4b ter AQP4d niso bile izrazite, ker je bil delež izooblike AQP4e v plazmalemi relativno majhen (Slika 9).

Kakšne so velikosti ortogonalnih skupkov AQP4? Do sedaj so bile izmerjene velikosti med 50 in 130 nm v premeru, podobnih vrednosti kot v astrocitnih izrastkih (Furman in sod., 2003; Rossi in sod., 2012b). Ti ortogonalni skupki so vsebovali rekombinantne izooblike AQP4a in AQP4c in ugotovili so, da je njihova velikost odvisna od razmerja med obema izooblikama (Rossi in sod., 2012b). Velikosti mikrodomen v plazmalemi z AQP4a, ki sama ne more tvoriti ortogonalnih skupkov, je bila v povprečju ~25 nm. Nasprotno so bile mikrodomene v plazmalemi (ortogonalni skupki), ki so bile sestavljene le iz AQP4c, znatno večje, s povprečnimi premeri ~127 nm (Rossi in sod., 2012b). Ko so izrazili skupaj AQP4a and AQP4c, so bili ortogonalni skupki manjši od tistih, ki so bili sestavljeni le iz AQP4c (Furman in sod., 2003; Rash in sod., 2004; Rossi in Verkman, 2011). V našem delu smo v plazmalemi izmerili nekoliko večje mikrodomene z AQP4 ( $168 \pm 1$  nm) in AQP4e ( $166 \pm 2$  nm) kot Rossi in sod. (2012b) (Sliki 15 in 16). Opažene razlike med obema raziskavama so lahko posledica heterogene sestave ortogonalnih skupkov AQP4. V našem primeru je v ortogonalnih skupkih zastopana še izooblika AQP4e. Poleg tega so iz podatkov pridobljenih iz trajnih celičnih linij glioblastomov razvili model, da sta velikost in oblika skupkov heterogena tudi pri stalnem razmerju izooblik AQP4a : AQP4c v ortogonalnih skupkih (Jin in sod., 2011).

Združevanje tetramerov AQP4 v ortogonalne skupke bi lahko pomembno vplivalo na optimizacijo izmenjave plinov med ožiljem in možganovino, adhezijo celic in predvsem na veliko kapaciteto za prehajanje vode skozi membrane astrocitov z namenom povečanja resorpcije vode iz zunajcelične tekočine ali pospešeno odstranjevanje makromolekul iz možganovine (van Hoek in sod., 2000; Silberstein in sod., 2004; Hiroaki in sod., 2006; Nagelhus in Ottersen, 2013). Regulacija združevanja AQP4 v ortogonalne skupke lahko poteka na več nivojih. Do zdaj je bilo ugotovljeno, da je tak nivo lahko kontrola translacije, ki uravnava razmerje med izooblikami (Pisani in sod., 2011). Na post-translacijskem nivoju lahko velikost ortogonalnih skupkov uravnava N-terminalna palmitoilacija (Suzuki in sod., 2008; Crane in Verkman, 2009; Rossi in sod., 2012b). Mi smo preverili, ali hipoosmotske razmere, ki nastopijo v nekaterih patoloških razmerah, npr. pri možganskem edemu (Papadopoulos in sod., 2004), vplivajo na velikost ortogonalnih skupkov v plazmalem. Omenjene patološke razmere smo posnemali tako, da smo celice izpostavili hipoosmolarni raztopini. Po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino se je v plazmalem spremenil delež ortogonalnih skupkov in tudi njihova velikost (Sliki 10 in 15). Delež mikrodomen z AQP4 v plazmalem (ortogonalnih skupkov) se je po dveh minutah povečal za 150 % glede na velikost v izoosmotskih razmerah, po 10-minutni stimulaciji pa je bil podoben kot v izoosmotskih razmerah (Slika 10). Podoben trend spreminjanja deleža AQP4 v plazmalem so opazili tudi v raziskavi Potokar in sod. (2013). V hipoosmotskih razmerah voda vdira v astrocite, ki začnejo nabrekati (Nase in sod., 2008; Pangršič in sod., 2006). Do povečanega števila mikrodomen z AQP4 v plazmalem pride zaradi povečane eksocitoze, kar so opazili v celicah, ki so bile izpostavljene hipoosmotskemu stresu (Pasantes-Morales in sod., 2002). V Pangršič in sod. (2006) z merjenjem kapacitivnosti plazmaleme astrocitov sicer niso zabeležili povečane eksocitoze. Verjetno spremembe v kapacitivnosti plazmaleme niso zaznali, ker je eksocitoza v astrocitih veliko počasnejša kot v nevronih (Kreft in sod., 2004) in bi se lahko uravnala z endocitozo. Glede na to, da pride do hitrih sprememb v lokalizaciji AQP4 v plazmalem, so mešički z AQP4 najverjetneje že zbrani ob plazmalem in se lahko ob ustreznem signalu hitro zlijejo s plazmalemo. Na zadrževanje mešičkov ob plazmalem bi lahko vplivalo tudi spremenjeno gibanje mešičkov (Potokar in sod., 2013). Mehanizem, kako koncentracija kalcijevih ionov v citoplazmi ( $[Ca^{2+}]_i$ ) regulira transport mešičkov, je še zelo nejasen (Potokar in sod., 2010). Ko se spremeni  $[Ca^{2+}]_i$ , se sprožijo spremembe v citoskeletnih elementih in vezavi mešičkov na citoskelet (Potokar in sod., 2013). Opazili so, da se v hipoosmotskih razmerah zviša  $[Ca^{2+}]_i$  (Thrane in sod., 2011; Pangršič in sod., 2006), kar bi lahko povzročilo zmanjšano premikanje mešičkov. Čez čas pride do reorganizacije filamentov, zato se mobilnost mešičkov poveča, kar je povezano z manjšo lokalizacijo AQP4 v plazmalem (Potokar in sod., 2013), ki smo jo opazili po 10-minutni stimulaciji s hipoosmolarno raztopino. Kontrolni skupini 2- in 10-minutne stimulacije sta se tudi razlikovali v deležu mikrodomen v plazmalem, česar nismo pričakovali. Do razlike je najverjetneje prišlo zaradi drugačnih razmer označevanja AQP4 v plazmalem s protitelesi NMO. Protitelesa NMO so imela toliko časa za vezavo, kot je trajala stimulacija, ker smo jih dodali v hipoosmolarno raztopino oz. v primeru kontrol v zunajcelično raztopino. Tako so imela pri 2-minutni stimulaciji manj časa za vezavo, kar se je odražalo tudi v manjšem deležu mikrodomen v plazmalem, kot v primeru 10-minutne stimulacije. V primerjavi z AQP4 se delež



mikrodomen z AQP4e v plazmalemii počasneje spreminja, kar kaže na to, da imajo posamezne izooblike različne mehanizme regulacije (Neely in sod., 1999). Do značilnega povišanja mikrodomen z AQP4e v plazmalemii je prišlo šele po 10-minutni hipoosmotski stimulaciji.

Po stimulaciji s hipoosmotsko raztopino smo poleg povečanja deleža AQP4 v plazmalemii opazili tudi povečanje velikosti AQP4 ortogonalnih skupkov. Menimo, da je do povečanja velikosti mikrodomen lahko prišlo zaradi zlivanja mešičkov, ki nosijo AQP4, na mestu že obstoječih mikrodomen v plazmalemii ali pa zaradi prerazporejanja in združevanja ortogonalnih skupkov v plazmalemii. Iz ločenega merjenja signalov, ki so izvirali iz zunajceličnega in znotrajceličnega označevanja istih ortogonalnih skupkov s protitelesi na obeh straneh, smo ugotovili, da so se ortogonalni skupki v hipoosmotskih razmerah značilno povečali. V primeru, ko so ortogonalni skupki izražali tudi rekombinantno AQP4e, je bilo povečanje velikosti ortogonalnih skupkov manjše (merjen zunajcelični signal, ki specifično označi ortogonalne skupke). Velikost znotrajceličnega signala AQP4e pa se v istih ortogonalnih skupkih ni povečala. Torej, če povzamemo, smo v hipoosmotskih razmerah opazili povečano lokalizacijo izooblike AQP4e v plazmalemii, medtem ko se velikost znotrajceličnega signala v istih skupkih ni povečala. Morda se je AQP4e v hipoosmotskih razmerah vgradila v novo nastale skupke ali pa so se ti prerazporedili. Prerazporejanje ortogonalnih skupkov so opazili Tajima in sod. (2010), in sicer v celicah ledvičnih epitelijskih celicah LLC-PK1, ki so izražale rekombinantno izoobliko M23. Če bi se AQP4e vgradila v iste ortogonalne skupke, bi to povečalo razmerje AQP4e : AQP4c in ortogonalni skupki bi se zmanjšali, kot lahko predvidimo iz raziskav vgrajevanja izooblike AQP4a v ortogonalne skupke, pri čemer se AQP4a obnaša podobno kot AQP4e (Strand in sod., 2009; Rossi in sod., 2012b). Ker smo označevali s protitelesi NMO, ki prepoznajo izključno ortogonalne skupke v plazmalemii, in izmerili večje velikosti ortogonalnih skupkov, bi to lahko pomenilo, da so se povečali na račun izooblike AQP4c. Te ugotovitve so v skladu s poročili, da zastopanost izooblike AQP4a v ortogonalnih skupkih, ki se podobno kot AQP4e ne more vgrajevati v skupke brez AQP4c, vpliva na velikost in obliko ortogonalnih skupkov (Furman in sod., 2003; Crane in Verkman, 2009; Rossi in sod., 2011; Rossi in sod., 2012b). Naši rezultati torej kažejo, da bi lahko imela izooblika AQP4e pomembno vlogo pri regulaciji velikosti ortogonalnih skupkov v astrocitih.

## 6 SKLEPI

- Izmed novo odkritih izooblik AQP4 je v plazmalemi podganjih astrocitov prisotna le izooblika AQP4e, izoobliki AQP4b in AQP4d sta znotrajcelični.
- Po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino (posnemanje razmer pri možganskem edemu), se delež izooblike AQP4e v plazmalemi zviša, izoobliki AQP4b in AQP4d se na stimulacijo s hipoosmolarno raztopino ne odzoveta s prerazporeditvijo v plazmalemo.
- Odkrili smo nov način uravnavanja velikosti ortogonalnih skupkov, in sicer s hipoosmolarnostjo.
- Velikost mikrodomen z AQP4 v plazmalemi (t.i. ortogonalnih skupkov) se v hipoosmotskih razmerah poveča. To povečanje je zelo verjetno povezano s spremembo razmerja različnih izooblik AQP4 v ortogonalnih skupkih.
- Izooblika AQP4e bi lahko imela pomembno vlogo pri uravnavanju velikosti ortogonalnih skupkov v astrocitih.

## 7 POVZETEK

Akvaporini so vodni kanali, ki pospešujejo prehajanje vode skozi plazmalemo. V možganih je prisotnih več tipov akvaporinov, najpogostejši je AQP4. AQP4 se pojavljajo predvsem v astrocitih, v katerih so najbolj gosto razporejeni na izrastkih, ki obdajajo žile. Ključna vloga AQP4 je uravnavanje transporta vode med možganovino in zunajmožganskimi tekočinami, vpleten pa je tudi v nekatera patološka stanja v možganih, kot je možganski edem. Do sedaj so odkrili šest izooblik AQP4. Nekatere izooblike AQP4 lahko tvorijo posebne strukture v plazmalemi, t.i. ortogonalne skupke. V nalogi smo raziskali lastnosti mikrodomen z nedavno odkritimi izooblikami AQP4b, AQP4d in AQP4e, ki so še slabo raziskane. Zanimale so nas velikosti mikrodomen, njihov delež v plazmalemi ter vpliv hipoosmotskih razmer na razporeditev mikrodomen v plazmalemi. Mikrodomeno smo definirali kot vsak točkast fluorescentni signal, kjer so posamezne molekule AQP4 med seboj oddaljene manj kot 100 nm.

Da smo lahko opazovali posamezne izooblike AQP4 v podganjih astrocitih, smo v celice vnesli plazmidne DNA, ki so kodirale fuzijske beljakovine med AQP4 in GFP. Celice smo posneli s superločljivostno mikroskopsko tehniko SIM. Premer mikrodomen smo izmerili kot širino fluorescentnega signala na polovici najvišje intenzitete v dveh ortogonalnih smereh in izračunali povprečje. Z uporabo imunocitokemijske metode smo s primarnimi protitelesi NMO označili AQP4 v plazmalemi, s komercialnimi protitelesi proti AQP4 pa vse znotrajcelične AQP4. V celicah, v katere smo vnesli plazmidne DNA posameznih izooblik, smo s protitelesi označili le AQP4 v plazmalemi. Delež AQP4 v plazmalemi smo izračunali kot razmerje števila mikrodomen v plazmalemi proti vsem mikrodomenam v celici. Nadalje smo celice stimulirali s hipoosmolarno raztopino (200 mOsm), s čimer smo posnemali razmere ob razvoju možganskega edema in pogledali, če je prišlo do sprememb v deležu in velikostih mikrodomen v plazmalemi.

Rezultati so pokazali, da so mikrodomene z AQP4e ( $244 \pm 5$  nm) nekoliko manjše od mikrodomen z AQP4b ( $264 \pm 6$  nm) in AQP4d ( $276 \pm 5$  nm), verjetno zaradi različne znotrajcelične razporeditve izooblik in deleža v plazmalemi. Ugotovili smo, da je le AQP4e prisoten v plazmalemi, AQP4b in AQP4d sta skoraj izključno znotrajcelični izoobliki. Delež mikrodomen z AQP4e ( $16 \pm 2$  %) v plazmalemi je podoben deležu mikrodomen z AQP4 ( $14 \pm 1$  %), kar kaže na to, da je AQP4e pomembno zastopan v plazmalemi in lahko vpliva na transport vode skozi plazmalemo. Po stimulaciji s hipoosmolarno raztopino se je v plazmalemi povečal delež mikrodomen z AQP4 in AQP4e, medtem ko se AQP4b in AQP4d tudi po stimulaciji nista prenesla v plazmalemo. Do večjega števila mikrodomen z AQP4 v plazmalemi najverjetneje pride zaradi povečane eksocitoze mešičkov z AQP4, ki poteka v hipoosmotskih razmerah pogosteje kot v normalnih. Poleg večjega deleža mikrodomen v plazmalemi smo po hipoosmotski stimulaciji opazili tudi povečanje velikosti mikrodomen z AQP4 (t.i. ortogonalnih skupkov), ki je najverjetneje povezano s spremembo razmerja različnih izooblik AQP4. Do povečanja ortogonalnih skupkov je lahko prišlo zaradi zlivanja mešičkov, ki nosijo AQP4, na mestu obstoječih mikrodomen v plazmalemi ali pa zaradi prerazporejanja in

združevanja ortogonalnih skupkov v plazmalemi. Menimo, da bi lahko imel AQP4e pomembno vlogo pri uravnavanju velikosti ortogonalnih skupkov v astrocitih.

## 8 VIRI

- Agre P., Preston G. M., Smith B. L., Jung J. S., Raina S., Moon C., Guggino W. B. Nielsen S. 1993. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *American Journal of Physiology*, 265, 4: F463-F476
- Agre P., Nielsen S., Ottersen O. P. 2004. Towards a molecular understanding of water homeostasis in the brain. *Neuroscience*, 129, 4: 849-850
- Amiry-Moghaddam M., Otsuka T., Hurn P. D., Traystman R. J., Haug F. M., Froehner S. C., Adams M. E., Neely J. D., Agre P., Ottersen O. P., Bhardwaj A. 2003. An  $\alpha$ -syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 4: 2106-2111
- Amiry-Moghaddam M., Ottersen O. P. 2003. The molecular basis of water transport in the brain. *Nature reviews Neuroscience*, 4, 12: 991-1001
- Arcienega I. I., Brunet J. F., Bloch J., Badaut J. 2010. Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain. *Neuroscience*, 167, 4: 1103-1114
- Badaut J., Hirt L., Granziera C., Bogousslavsky J., Magistretti P. J., Regli L. 2001. Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 21, 5: 477-482
- Badaut J., Petit J.-M., Brunet J.-F. Magistretti P. J., Charriaut-Marlangue C., Regli L. 2004. Distribution of Aquaporin 9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience*, 128, 1: 27-38
- Badaut J., Brunet J. F., Petit J.-M., Guerin C. F., Magistretti P. J., Regli L. 2008. Induction of brain aquaporin 9 (AQP9) in catecholaminergic neurons in diabetic rats. *Brain research*, 1188: 17-24
- Badaut J., Brunet J. F., Guerin C., Regli L., Pellerin L. 2012. Alteration of glucose metabolism in cultured astrocytes after AQP9-small interference RNA application. *Brain research*, 1473: 19-24
- Badaut J., Fukuda A. M., Jullienne A., Petry K. G. 2014. Aquaporin and brain diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 1840, 5: 1554-1565
- Beitz E., Wu B., Holm L. M., Schultz J. E., Zeuthen T. 2006. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 103, 2: 269-274
- Benga O., Huber V. J. 2012. Brain water channel proteins in health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 33: 562-578
- Carbrey J. M., Gorelick-Feldman D. A., Kozono D., Praetorius J., Nielsen S. Agre P. 2003. Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 5: 2945-2950
- Crane J. M., Verkman A. S. 2009. Determinants of aquaporin-4 assembly in orthogonal arrays revealed by live-cell single-molecule fluorescence imaging. *Jornal of Cell Science*, 122: 813-821

- D'Adamo P., Menegon A., Nigro C. L., Grasso M., Gulisano m., Tamanini F., Bienvenu T., Gedeon A. K., Oostra B., Wu S.-K., Tandon A., Valtorta F., Balch W. E., Chelly J., Toniolo D. 1998. Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nature genetics*, 19: 4-9
- Elkjær M. L., Vajda Z., Nejsum L. N., Kwon T. H., Jensen U. B., Amiry-Moghaddam M., Frøkiær J., Nielsen S. 2000. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 276, 3: 1118-1128
- Frigeri A., Nicchia G. P., Verbavatz J. M., Valenti G., Svelto M. 1998. Expression of aquaporin-4 in fast-twitch fibers of mammalian skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*, 102, 4: 695-703
- Furman C. S., Gorelick-Feldman D. A., Davidson K. G., Yasumura T., Neely J. D., Agre P., Rash J. E. 2003. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 13609-13614
- Ganley I. G., Carroll K., Bittova L., Pfeffer S. 2004. Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. *Molecular Biology of the Cell*, 15: 5420-5430
- Gruenberg J., Maxfield F. 1995. Membrane transport in the endocytic pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 7: 552-563
- Gustafsson M. G. L. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*, 198: 82-87
- Gunnarson E., Zelenina M., Axehult G., Song Y., Bondar A., Krieger P., Brismar H., Zelenin S., Aperia A. 2008. Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia*, 56, 6: 587-596
- Haj-Yasein N. N., Jensen V., Østby I., Omholt S. W., Voipio J., Kaila K., Ottersen O. P., Hvalby Ø., Negelhus E. A. 2012. Aquaporin-4 regulates extracellular space volume dynamics during high-frequency synaptic stimulation: a gene deletion study in mouse hippocampus. *Glia*, 60, 6: 867-874
- Hasegawa H., Ma T., Skach W., Matthay M. A., Verkman A. S. 1994. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *The Journal of biological chemistry*, 269, 8: 5497-5500
- Hinson S. R., Pittock S. J., Lucchinetti C. F., Roemer S. F., Fryer J. P., Kryzer T. J., Lennon V. A. 2007. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology*, 69, 24: 2221-2231
- Hinson S. R., Romero M. F., Popescu B. F. Gh., Lucchinetti C. F., Fryer J. P., Wolburg H., Fallier-Becker P., Noell S., Lennon V. A. 2012. Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 4: 1245-1250
- Hiroaki, Y., et al. 2006. Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *Journal of molecular biology*, 355: 628-639
- Hirt B., Gleiser C., Eckhard A., Mack A. F., Müller M., Wolburg H., Löwenheim H. 2011. All functional aquaporin-4 isoforms are expressed in the rat cochlea and contribute to the formation of orthogonal arrays of particles. *Neuroscience*, 189: 79-92

- Horgan C. P., McCaffrey M. W. 2011. Rab GTPases and microtubule motors. *Biochemical Society Transactions*, 39: 1202-1206
- Ishibashi K., Kuwahara M., Gu Y., Tanaka Y., Marumo F., Sasaki S. 1998. Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochemical and biophysical research communications*, 244, 1: 268-274
- Jin B. J., Rossi A., Verkman A. S. 2011. Model of aquaporin-4 supramolecular assembly in orthogonal arrays based on heterotetrameric association of M1-M23 isoforms. *Biophys Journal*, 100: 2936-2945
- Jung S. P., Bhat R. V., Preston G. M., Guggino W. B., Baraban J. M., Agre P. 1994. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: Candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 26: 13052-13056
- King L. S., Kozono D., Agre P. 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature reviews: Molecular cell biology*, 5, 9: 687-698
- Kreft M., Stenovec M., Rupnik M., Grilc S., Krzan M., Potokar M., Pangrsic T., Haydon P. G., Zorec R. 2004. Properties of Ca(2+)-dependent exocytosis in cultured astrocytes. *Glia*, 46: 437-445
- Ladinsky M. S., Mastronarde D. N., McIntosh J. R., Howell K. E., Staehelin L. 1999. A Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *Journal of Cell Biology*, 144: 1135-1149
- Loo D. D. F., Wright E. M., Zeuthen T. 2002. Water pumps. *The Journal of Physiology*, 542, 1: 53-60
- Madrid R., Le Maout S., Barrault M.B., Janvier K., Benichou S., Mérot J. 2001. Polarized trafficking and surface expression of the AQP4 water channel are coordinated by serial and regulated interactions with different clathrin-adaptor complexes. *The EMBO Journal*, 20: 7008-7021
- Marsh B. J., Mastronarde D. N., Buttle K. F., Howell K. E., McIntosh J. R. 2001. Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 2399-2406
- McKenna M. C., Bezold L. I., Kimatian S. J., Tildon J. T. 1986. Competition of glycerol with other oxidizable substrates in rat brain. *The Biochemical journal*, 237, 1: 47-51
- Moe S. E., Sorbo J. G., Sogaard R., Zeuthen T., Ottersen O. P., Holen T. 2008. New isoforms of rat Aquaporin-4. *Genomics*, 91, 4: 367-377
- Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J. B., Engel A., Fujiyoshi Y. 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407, 6804: 599-605
- Nagelhus E. A., Veruki M. L., Torp R., Haug F.-M., Laake J. H., Nielsen S., Agre P., Ottersen O. P. 1998. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *The Journal of neuroscience*, 18, 7: 2506-2519
- Nagelhus E. A., Horio Y., Inanobe A., Fujita A., Haug F.-M. Nielsen S., Kurachi Y., Ottersen O. P. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and

- water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia*, 54: 47-54
- Nagelhus E. A., Ottersen O. P. 2013. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiological reviews*, 93, 4: 1543-1562
- Nase G., Helm P. J., Enger R., Ottersen O. P. 2008. Water entry into astrocytes during brain edema formation. *Glia*, 56, 8: 895-902
- Nedergaard M., Ransom B., Goldman S. A. 2003. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences*, 26, 10: 523-530
- Neely J. D., Christensen B. M., Nielsen S., Agre P. 1999. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*, 38: 11156-11163
- Nicchia G. P., Mastrototaro M., Rossi A., Pisani F., Tortorella C., Ruggieri M., Lia A., Trojano M., Frigeri A., Svelto M. 2009. Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia*, 57: 1363-1373
- Nicchia G. P., Ficarella R., Rossi A., Giangreco I., Nicolotti O., Carotti A., Pisani F., Estivill X., Gasparini P., Svelto M., Frigeri A. 2011. D184E mutation in aquaporin-4 gene impairs water permeability and links to deafness. *Neuroscience*, 197: 80-88
- Nielsen S., Smith B. L., Christensen E. L., Agre P. 1993. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 15: 7275-7279
- Nielsen S., Nagelhus E. A., Amiry-Moghaddam M., Bourque C., Agre P., Ottersen O. P. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *The Journal of neuroscience*, 17, 1: 171-180
- Oshio K., Watanabe H., Song Y., Verkman A. S., Manley G. T. 2004. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *The FASEB Journal*, 18, 14: 76-78
- Paganelli C. V., Solomon A. K. 1957. The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *The Journal of general physiology*, 41, 2: 259-277
- Pangrsič T., Potokar M., Haydon P. G., Zorec R., Kreft M. 2006. Astrocyte swelling leads to membrane unfolding, not membrane insertion. *Journal of Neurochemistry*, 99: 514-523
- Papadopoulos M. C., Manley G. T., Krishna S., Verkman A. S. 2004. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *The FASEB Journal*, 18, 11: 1291-1293
- Papadopoulos M. C., Verkman A. S. 2007. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatric nephrology*, 22, 6: 778-784
- Papadopoulos M. C., Verkman A. S. 2013. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nature reviews: Neuroscience*, 14, 4: 265-277
- Parpura V., Heneka M. T., Montana V., Oliet S. H. R., Schousboe A., Haydon P. G., Stout Jr R. F., Spray D. C., Reichenbach A., Pannicke T., Penky M., Pekna M., Zorec R., Verkhratsky A. 2012. Glial cells in (patho)physiology. *Journal of neurochemistry*, 121, 1: 4-27



- Pasantes-Morales H., Franco R., Ochoa L., Ordaz B. 2002. Osmosensitive release of neurotransmitter amino acids: Relevance and mechanisms. *Neurochemical Research*, 27: 59–65
- Pfeffer S. R., Dirac-Svejstrup A. B., Soldati T. 1995. Rab GDP dissociation inhibitor: putting rab GTPases in the right place. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 17057-17059
- Pisani F., Rossi A., Nicchia G. P., Svelto M., Frigeri A. 2011. Translational regulation mechanisms of aquaporin-4 supramolecular organization in astrocytes. *Glia*, 59: 1923-1932
- Potokar M., Kreft M., Pangršič T., Zorec R. 2005. Vesicle mobility studied in cultured astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 329, 2: 678-683
- Potokar M., Stenovec M., Kreft M., Kreft M. E., Zorec R. 2008. Stimulation inhibits the mobility of recycling peptidergic vesicles in astrocytes. *Glia*, 56, 2: 135-144
- Potokar M., Stenovec M., Gabrijel M., Li L., Kreft M., Grilc S., Pekny M., Zorec R. 2010. Intermediate filaments attenuate stimulation-dependent mobility of endosomes/lysosomes in astrocytes. *Glia*, 10: 1208-1219
- Potokar M., Stenovec M., Jorgačevski J., Holen T., Kreft M., Ottersen O. P., Zorec R. 2013. Regulation of AQP4 surface expression via vesicle mobility in astrocytes. *Glia*, 61, 6: 917-928
- Preston G. M., Agre P. 1991. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 24: 11110-11114
- Preston G. M., Carrol T. P., Guggino W. B., Agre P. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 256, 5055: 385-387
- Rash J. E., Yasumura T., Hudson C. S. Agre P., Nielsen S. 1998. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 20: 11981-11986
- Rossi, A., Crane, J. M. Verkman A. S. 2011. Aquaporin-4 Mz isoform: brain expression, supramolecular assembly and neuromyelitis optica antibody binding. *Glia*, 59: 1056-1063
- Rossi A., Baumgart F., van Hoek A. N., Verkman A. S. 2012a. Post-Golgi supramolecular assembly of aquaporin-4 in orthogonal arrays. *Traffic*, 13: 43-53
- Rossi A., Moritz T. J., Ratelade J., Verkman A. S. 2012b. Super-resolution imaging of aquaporin-4 orthogonal arrays of particles in cell membranes. *Journal of Cell Science*, 15: 4405-4412
- Saadoun S., Papadopoulos M. C., Watanabe H., Yan D., Manley G. T., Verkman A. S. 2005. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *Journal of cell science*, 118, Pt 24: 5691-5698
- Saadoun S., Papadopoulos M. C. 2010. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience*, 168, 4: 1036-1046
- Schermelleh L., Carlton P. M. Haase S., Shao L., Winoto L., Kner P., Burke B., Cardoso M. C., Agard D. A., Gustafsson M. G. L. 2008. Subdiffraction multicolor imaging of

- the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science*, 320, 5881: 1332-1336
- Schwartz J. P., Wilson D. J. 1992. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia*, 5: 75–80
- Sidel V. W., Solomon A. K. 1957. Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *The Journal of general physiology*, 41, 2: 243-257
- Silberstein C., Bouley R., Huang Y., Fang P., Pastor-Soler N., Brown D., Van Hoek A. N. 2004. Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *American journal of physiology Renal physiology*, 287: F501-511
- Simard M., Nedergaard M. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 129, 4: 877-896
- Slovenski medicinski slovar. 2012. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta <http://www.termania.net/slovarji/95/slovenski-medicinski-slovar> (19. 11. 2014)
- Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 10: 513-525
- Strand L., Moe S. E., Solbu T. T., Vaadal M., Holen T. 2009. Roles of aquaporin-4 isoforms and amino acids in square array assembly. *Biochemistry*, 48: 5785-5793
- Strange K. 1992. Regulation of solute and water balance and cell volume in the central nervous system. *Journal of the American Society of Nephrology*, 3, 1: 12-27
- Suzuki H., Nishikawa K., Hiroaki Y., Fujiyoshi Y. 2008. Formation of aquaporin-4 arrays is inhibited by palmitoylation of N-terminal cysteine residues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778: 1181-1189
- Takumi Y., Nagelhus E. A., Eidet J., Matsubara A., Usami S., Shinkawa H., Nielsen S., Ottersen O. P. 1998. Select types of supporting cell in the inner ear express aquaporin-4 water channel protein. *The European journal of neuroscience*, 10, 12: 3684-3595
- Tani K., Mitsuma T., Hiroaki Y., Kamegawa A., Nishikawa K., Tanimura Y., Fujiyoshi Y. 2009. Mechanism of aquaporin-4's fast and highly selective water conduction and proton exclusion. *Journal of molecular biology*, 389, 4: 694-706
- Tajima, M., Crane J. M., Verkman A. S. 2010. Aquaporin-4 (AQP4) associations and array dynamics probed by photobleaching and single-molecule analysis of green fluorescent protein-AQP4 chimeras. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 8163-8817
- Tajkhorshid E., Nollert P., Jensen M. Ø., Miercke L. J. W., O'Connell J., Stroud R. M., Schulten K. 2002. Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science*, 296, 5567: 525-530
- Thrane A. S., Rappold P. M., Fujita T., Torres A., Bekar L. K., Takano T., Peng W., Wang F., Thrane V. R., Enger R., Haj-Yasein N. N., Skare Ø., Holen T., Klungland A., Ottersen O. P., Nedergaard M., Nagelhus E. A. 2011. Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling events elicited by cerebral edema. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2: 846-851
- Tsukaguchi H., Shayakul C., Berger U. V., Mackenzie B., Devidas S., Guggino W. B., Van Hoek A. N., Hediger M. A. Molecular Characterization of a Broad Selectivity Neutral Solute Channel. 1998. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 38: 24737-24743

- van Hoek A. N., Ma T., Yang B., Verkman A. S., Brown D. 2000. Aquaporin-4 is expressed in basolateral membranes of proximal tubule S3 segments in mouse kidney. *American journal of physiology Renal physiology*, 278: F310-316
- Verbavatz J.-M., Brown D., Sabolić I., Valenti G., Ausiello D. A., Van Hoek A. N., Ma t., Verkman A. S. 1993. Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study. *The Journal of cell biology*, 123, 3: 505-618
- Verbavatz J.-M., Ma T., Gobin R., Verkman A. S. 1997. Absence of orthogonal arrays in kidney, brain and muscle from transgenic knockout mice lacking water channel aquaporin-4. *Journal of cell science*, 110: 2855-2860
- Verkhatsky A., Parpura V. 2014. *Introduction to Neuroglia*. San Rafael, Morgan & Claypool Life Sciences: 74 str.
- Verkman A. S. 2005. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of cell science*, 118: 3225-3232
- Verkman A. S., Ratelade J., Rossi A., Zhang H., Tradtrantip L. 2011. Aquaporin-4: orthogonal array assembly, CNS functions, and role in neuromyelitis optica. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32, 6: 702-710
- Walz T., Fujiyoshi Y., Engel A. 2009. The AQP structure and functional implications. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 190: 31–56
- Wolburg H., Noell S., Fallier-Becker P., Mack A. F., Wolburg-Buchholz K. 2012. The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma. *Molecular aspects of medicine*, 33: 579-589
- Yang B., Brown D., Verkman A. S. 1996. The Mercurial Insensitive Water Channel (AQP-4) Forms Orthogonal Arrays in Stably Transfected Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 9: 4577-4580
- Zador Z., Stiver S., Wang V., Manley G. T. 2009. Role of Aquaporin-4 in Cerebral Edema and Stroke. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 190: 159-170
- Zerial M., McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews: Molecular cell biology*, 2: 101-117
- Zhang H., Verkman A. S. 2008. Evidence against involvement of aquaporin-4 in cell-cell adhesion. *Journal of molecular biology*, 382, 5: 1136-1143

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Robertu Zorcu, ki mi je omogočil izvedbo magistrskega dela ter za strokovne nasvete in spodbudne besede.

Somentorici znan. sod. dr. Maji Potokar se zahvaljujem za uvajanje v laboratorijsko delo, za vso pomoč in nasvete pri izdelavi naloge ter natančen pregled magistrskega dela.

Posebno se zahvaljujem dr. Jerneju Jorgačevskemu za usmerjanje pri delu, pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela in mikroskopiranju ter za pregled magistrskega dela. Hvala za koristne nasvete in spodbujanje.

Za pregled magistrske naloge se zahvaljujem tudi recenzentu prof. dr. Marku Kreftu.

Hvala vsem v Laboratoriju za nevroendokrinologijo – molekularno celično fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani za prijaznost, pomoč in prijetno vzdušje.

Hvala mojim domačim za vso podporo tekom študija in razumevanje.