

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tina SMOLIČ

**VPLIV EKSPRESIJE GENA FAMILIARNEGA TIPA  
ALZHEIMERJEVE BOLEZNI *PS1ΔE9* NA  
MOBILNOST IN SEKRECIJSKO AKTIVNOST  
ASTROCITOV PODGANE V KULTURI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tina SMOLIČ

**VPLIV EKSPRESIJE GENA FAMILIARNEGA TIPA  
ALZHEIMERJEVE BOLEZNI *PS1ΔE9* NA MOBILNOST IN  
SEKRECIJSKO AKTIVNOST ASTROCITOV PODGANE V  
KULTURI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2.stopnja

**THE EFFECT OF EXPRESSION OF FAMILIAL ALZHEIMER  
DISEASE GENE *PS1ΔE9* ON VESICLE MOBILITY AND  
SECRETORY ACTIVITY OF CULTURED RAT ASTROCYTES**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Delo je zaključek magistrskega študijskega programa Molekulska in funkcionalna biologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Magistrsko delo sem opravljala na Inštitutu za patološko fiziologijo, Zaloška 4, v Laboratoriju za nevroendokrinologijo in molekulske celično fiziologijo na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje oz. Senat oddelka je z dnem 11. 3. 2016 odobrila naslov magistrskega dela Vpliv ekspresije gena familiarnega tipa Alzheimerjeve bolezni *PSIΔE9* na mobilnost in sekrecijsko aktivnost astrocitov podgane v kulturi. Za mentorja je bil imenovan viš. znan. sod. dr. Matjaž Stenovec, za somentorja pa prof. dr. Marko Kreft.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter MAČEK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: viš. znan. sod. dr. Matjaž STENOVEC  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

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

Član: prof. dr. Robert ZOREC  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo 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.

Tina Smolič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577.2(043.2)
KG	mobilnost mešičkov/astrociti/FAB/PS1ΔE9/ANP/VGLUT1/kalcijeva signalizacija
AV	SMOLIČ, Tina, diplomirana biologinja (UN)
SA	STENOVEC, Matjaž (mentor)/KREFT, Marko (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	VPLIV EKSPRESIJE GENA FAMILIARNEGA TIPA ALZHEIMERJEVE BOLEZNI <i>PS1ΔE9</i> NA MOBILNOST IN SEKRECIJSKO AKTIVNOST ASTROCITOV PODGANE V KULTURI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	VIII, 49 str., 13 sl., 161 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Astrociti v možganih zagotavljajo presnovno in trofično podporo nevronom. Motnje v zagotavljanju homeostaze lahko privedejo do nastanka nevrodegenerativnih bolezni, tudi Alzheimerjeve bolezni (AB). V nalogi smo raziskali vpliv izražanja mutiranega presenilina 1 ( <i>PS1ΔE9</i> ) na mobilnost sekrecijskih mešičkov in na elementarne dogodke sekrecije peptidov izzvane s purinergično kalcijevo signalizacijo. Z lipofekcijo smo v astrocite vnesli plazmid z zapisom za <i>PS1ΔE9</i> in za atrijski natriuretični peptid označen s fluorescentnim proteinom (ANP.emd) ali glutamatni prenašalec membrane mešička 1 označen s fluorescentnim proteinom (VGLUT1-EGFP). Premike mešičkov smo opazovali s konfokalnim mikroskopom in v časovnih sekvencah na mikrografijah izmerili spontano mobilnost ter njeno spremembo po aplikaciji ATP, ki je aktiviral ionotropne in metabotropne purinoreceptorje v plazmalemi astrocitov ter mobiliziral $Ca^{2+}$ v citosol celic. Spremembe $[Ca^{2+}]_i$ smo izmerili s fluorescentnim kalcijevim indikatorjem Fluo-4. V spontanah razmerah je bila mobilnost (prepotovana pot (TL), največji odmik na poti (MD), indeks usmerjenosti (DI) in hitrost) peptidergičnih in glutamatergičnih mešičkov značilno zmanjšana ( $p < 0,001$ ) v <i>PS1ΔE9</i> glede na kontrolne astrocite. Purinergično draženje astrocitov je izzvalo bifazičen odziv aktivnosti kalcija. Hipno in izrazito povečanje $[Ca^{2+}]_i$ je sovpadalo z izrazitim zmanjšanjem mobilnosti mešičkov. Med postopnim zmanjševanjem $[Ca^{2+}]_i$ proti bazalni ravni se je mobilnost mešičkov deloma vrnila na osnovno raven. Število z ATP izzvanih sekrecijskih dogodkov je bilo manjše v <i>PS1ΔE9</i> kot v kontrolnih astrocitih, domnevno zaradi zmanjšane mobilnosti mešičkov in posledično manj učinkovite dostave mešičkov do specifičnih celičnih lokalitet. Ugotovljene motnje v transportu astrocitnih mešičkov lahko dolgoročno oslabijo učinkovitost signalizacije s prenašalci glije in prispevajo k nastanku Alzheimerjeve bolezni.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
 DC UDC 577.2(043.2)  
 CX vesicle mobility/astrocytes/FAB/PS1ΔE9/ANP/VGLUT1/Ca<sup>2+</sup>-signaling  
 AU SMOLIČ, Tina  
 AA STENOVEC, Matjaž (supervisor)/KREFT, Marko (co-advisor)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programmes in Molecular and Functional Biology  
 PY 2016  
 TI THE EFFECT OF EXPRESSION OF FAMILIAL ALZHEIMER DISEASE GENE *PS1ΔE9* ON VESICLE MOBILITY AND SECRETORY ACTIVITY OF CULTURED RAT ASTROCYTES  
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
 NO VIII, 49 p., 13 fig., 161 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB In the brain, astrocytes provide metabolic and trophic support to neurons. Failure in executing complex homeostatic functions may contribute to the initiation and propagation of diseases, including Alzheimer disease (AD). Here, we examined whether astrocytes, transfected to express mutated presenilin 1 (*PS1ΔE9*), associated with familial AD, exhibit alterations in vesicle traffic and vesicular peptide release evoked by purinergic calcium signaling. Secretory vesicles were labelled by astrocyte transfection with plasmid encoding atrial natriuretic peptide tagged with mutant green fluorescent protein (ANP.emd) or by vesicular glutamate transporter 1 tagged with enhanced fluorescent protein (VGLUT1-EGFP), respectively. Fluorescent vesicles were monitored by confocal microscopy and the motion patterns were analyzed in time sequences of confocal micrographs; in resting conditions and after ATP application to cells that activated ionotropic and metabotropic purinoreceptors, and mobilized Ca<sup>2+</sup> into their cytosol. The intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration was monitored with fluorescent calcium indicator Fluo-4. In resting conditions, the mobility (the track length (TL), maximal displacement (MD), directionality index (DI) and speed) of peptidergic and glutamatergic vesicles was significantly reduced (p<0.001) in PS1ΔE9 astrocytes. Purinergic stimulation evoked biphasic calcium response; ATP-evoked increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> coincided with diminished mobility of secretory vesicles. During the post-stimulation period, increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> diminished and the vesicle mobility partially restored towards the initial, resting values. The number of ATP-evoked ANP discharge events was reduced in PS1ΔE9 astrocytes, likely due to diminished vesicle mobility resulting in insufficient vesicle delivery towards the specific cellular locations. Dysfunctional astrocytic vesicle transport on longer term may reduce the effectiveness of gliosignalling and contribute to the development of AD.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 ASTROCITI	2
<b>2.1.1 Glavne značilnosti in funkcije astrocitov</b>	<b>2</b>
2.2 ALZHEIMERJEVA BOLEZEN IN PRESENILINI	3
<b>2.2.1 Alzheimerjeva bolezen</b>	<b>3</b>
<b>2.2.2 Presenilini</b>	<b>3</b>
2.3 KALCIJEVA VZDRAŽNOST V ASTROCITIH IN VPLETENOST PRESENILINOV	5
2.4 SEKRECIJSKI MEŠIČKI IN URAVNAVANA EKSO-CITOZA V ASTROCITIH	7
<b>2.4.1 Eksocitoza</b>	<b>7</b>
<b>2.4.2 Citoskelet</b>	<b>7</b>
<b>2.4.3 Peptidergični sekrecijski mešički v astrocitih</b>	<b>8</b>
<b>2.4.4 Glutamatergični sekrecijski mešički v astrocitih</b>	<b>9</b>
2.5 NAMEN DELA	10
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>11</b>
3.1 GOJIŠČA IN RAZTOPINE	11
<b>3.1.1 Hranilno gojišče za astrocite</b>	<b>11</b>
<b>3.1.2 Lipofekcijsko gojišče</b>	<b>11</b>
<b>3.1.3 Zunajcelična raztopina za astrocite</b>	<b>11</b>
<b>3.1.4 Založna raztopina ATP</b>	<b>11</b>
<b>3.1.5 Plazmidi</b>	<b>11</b>
3.1.5.1 Plazmid ANP.emd	11
3.1.5.2 Plazmid VGLUT1-EGFP	11
3.1.5.3 Plazmid PS1ΔE9	11
3.2 PRIPRAVA KROVNIH STEKELC PREMAZANIH S POLI-L-LIZINOM (PLL)	12
3.3 CELIČNA KULTURA ASTROCITOV	12
3.4 NASADITEV ASTROCITOV NA KROVNA STEKELCA PREMAZANA S PLL	12
3.5 ENOJNA IN DVOJNA LIPOFEKCIJA ASTROCITOV V KULTURI	12
3.6 LASERSKA KONFOKALNA MIKROSKOPIJA	13

3.7	ANALIZA MOBILNOSTI IN SEKRECIJSKE AKTIVNOSTI EKSOCITOTSKIH MEŠIČKOV	13
3.8	FLUORIMETRIČNE MERITVE ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE KALCIJEVIH IONOV Z INDIKATORJEM FLUO-4	14
3.9	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	15
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>16</b>
4.1	SPONTANA MOBILNOST PEPTIDERGIČNIH SEKRECIJSKIH MEŠIČKOV V PODGANJIH ASTROCITIH DIVJEGA TIPA (wt) IN ASTROCITIH PS1ΔE9	16
4.2	SPONTANA MOBILNOST GLUTAMATERGIČNIH SEKRECIJSKIH MEŠIČKOV V PODGANJIH ASTROCITIH DIVJEGA TIPA (wt) IN ASTROCITIH PS1ΔE9	19
4.3	VPLIV ATP NA ZNOTRAJCELIČNO KONCENTRACIJO KALCIJA ( $[Ca^{2+}]_i$ )	21
4.4	VPLIV ATP NA MOBILNOST PEPTIDERGIČNIH MEŠIČKOV V PODGANJIH ASTROCITIH DIVJEGA TIPA (wt) IN ASTROCITIH PS1ΔE9	22
4.5	VPLIV ATP NA MOBILNOST GLUTAMATERGIČNIH MEŠIČKOV V PODGANJIH ASTROCITIH DIVJEGA TIPA (wt) IN ASTROCITIH PS1ΔE9	25
4.6	VPLIV ATP NA IZZVANO EKSOCITOTSKO IZLOČANJE VSEBINE PEPTIDERGIČNIH MEŠIČKOV	28
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	<b>37</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematski prikaz presenilina 1 sesalcev (Honarnejad in Herms, 2012: 1984)	4
Slika 2:	Uravnavanje Ca <sup>2+</sup> homeostaze (Honarnejad in Herms, 2012: 1984)	6
Slika 3:	Prikaz analize mobilnosti fluorescentnih mešičkov	14
Slika 4:	Spontana mobilnost peptidergičnih mešičkov v astrocitih wt in astrocitih PS1ΔE9	17
Slika 5:	Spontana mobilnost peptidergičnih sekrecijskih mešičkov	18
Slika 6:	Spontana mobilnost glutamatergičnih mešičkov v astrocitih wt in v astrocitih PS1ΔE9	19
Slika 7:	Spontana mobilnost glutamatergičnih sekrecijskih mešičkov	20
Slika 8:	Ekscitacijsko draženje z ATP poveča [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> v astrocitih v kulturi	21
Slika 9:	Z ATP-izzvano zmanjšanje usmerjene mobilnosti peptidergičnih mešičkov	23
Slika 10:	Restavriranje mobilnosti peptidergičnih mešičkov po draženju astrocitov z ATP	24
Slika 11:	Z ATP-izzvano zmanjšanje usmerjene mobilnosti glutamatergičnih mešičkov	26
Slika 12:	Restavriranje mobilnosti glutamatergičnih mešičkov po draženju astrocitov z ATP	27
Slika 13:	Število z ATP-izzvanih eksocitotskih dogodkov sekrecije peptidov	29



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	znotrajcelična koncentracija Ca <sup>2+</sup>
Aβ	β-amiloid
AB	Alzheimerjeva bolezen
ANP	atrijski natriuretični peptid
ANP.emd	ANP označen z mutiranim zelenim fluorescentnim proteinom ( <i>angl.</i> »atrial natriuretic peptide tagged with emerald fluorescent protein«)
ATP	adenozin-3-fosfat
CŽS	centralni živčni sistem
DMEM	hranilno gojišče za astrocite ( <i>angl.</i> »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EGFP	okrepljeni zeleni fluorescentni protein ( <i>angl.</i> »enhanced green fluorescent protein«)
ER	endoplazemski retikulum
FAB	familiarni tip Alzheimerjeve bolezni
FBS	fetusni serum goveda ( <i>angl.</i> »fetal bovine serum«)
GABA	γ-aminomaslena kislina
HEPES	N-2-hidroksietilpiperazin-N-2-etansulfonska kislina
LTX	transfekcijski reagent ( <i>angl.</i> »Lipofectamine LTX«)
PLL	poli-L-lizin ( <i>angl.</i> »poly-L-lysine«)
PS1	presenilin 1
<i>PS1ΔE9</i>	mutacija presenilina 1 z delecijo 9. eksona
PS2	presenilin 2
VGLUT1	glutamatni prenašalec membrane mešička 1 ( <i>angl.</i> »vesicular glutamate transporter 1«)

## 1 UVOD

Astroцити so heterogene celice glije v osrednjem živčnem sistemu sesalcev, ki zagotavljajo presnovno in trofično podporo nevronom. Motnje in/ali odpovedi astrocitnih funkcij lahko vodijo do nastanka nevrodegenerativnih bolezni, kot je Alzheimerjeva bolezen (AB), za katero je značilen propad nevronov v časovnem obdobju več let. Alzheimerjeva bolezen je napredujoča, nepovratna in usodna bolezen, ki prizadene kognitivne zmogljivosti človeka. Ključni histopatološki znaki AB so fokalni zunajcelični depoziti  $\beta$ -amiloida ( $A\beta$ ) v možganovini poimenovani amiloidni plaki ali senilne lehe in kopičenje neurofibrilarnih pentelj iz hiperfosforiliranega proteina tau v nevronih (Selkoe, 2001). AB je večinoma sporadična in se pojavi v pozni starosti (>65 let), v maloštevilnih primeri pa lahko nastopi zgodaj in je gensko podedovana (t. i. familiarna AB). V 40 % znanih primerov so našli mutirane gene za presenilin 1 (PS1) in presenilin 2 (PS2) (Tandon in Fraser, 2002).

Presenilini so splošno izraženi proteini, vsajeni v membrano endoplazemskega retikuluma (ER) in Golgijevega aparata, in tvorijo katalitično podenoto  $\gamma$ -sekretaze, ki cepi amiloidni prekursorski protein v  $\beta$ -amiloid. Mutacije presenilinov spremenijo procesiranje amiloidnega prekursorskega proteina na eni in kalcijevo signalizacijo celic na drugi strani (Smith in sod., 2005), saj so holoproteini presenilinov tudi pasivni kalcijevi kanali v membranah ER (Tu in sod., 2006).

Citosolni  $Ca^{2+}$  v astroцитih so-uravnava številne funkcije, kot so mitogeni odziv celic na rastne faktorje (bradikinin, S100 $\beta$ ), odziv na živčne prenašalce (glutamat in ATP), izražanje genov, mobilnost sekrecijskih mešičkov (Stenovec in sod., 2014) in izločanje prenašalcev glije (glutamat, ATP, D-serin in sekrecijski peptidi) (Parpura in Zorec, 2010; Guček in sod., 2012). Še več, znotrajcelični kalcijevi valovi v astroцитih lahko modulirajo aktivnost nevronov in vplivajo na njihovo preživetje (Mattson in Chan, 2003).

V nalogi smo raziskali vpliv mutiranega presenilina 1 (*PS1ΔE9*) na učinkovitost znotrajceličnega transporta astrocitnih mešičkov v mirovanju in po draženju celic ter ocenili spremembe v jakosti izzvanega sekrecijskega odziva astrocitov podgane v kulturi. Naš namen je bil opraviti funkcionalno karakterizacijo sekrecijskih mešičkov astrocitov, ugotoviti vpliv izražanja *PS1ΔE9* na mobilnost ter izzvano eksocitotsko/sekrecijsko aktivnost mešičkov s prenašalci glije.

Glede na zastavljene delovne hipoteze pričakujemo, da bomo z rezultati raziskave prispevali k boljšemu razumevanju vpliva mutacije *PS1ΔE9*, ki jo povezujejo z zgodnjim nastopom familiarnega tipa Alzheimerjeve bolezni, na mobilnost in sekrecijsko aktivnost peptidrgičnih in glutamatergičnih mešičkov v astroцитih.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ASTROCITI

Astroцитi so specializirane celice glije, ki so-uravnavajo delovanje osrednjega živčnega sistema (CŽS) (Parpura in sod., 1995; Haydon, 2001; Christopherson, 2005), iz zunajceličnega okolja privzemajo in vanj izločajo različne snovi, ki vplivajo na fiziologijo nevronov in na prenos živčnih signalov (Martin, 1992; Parpura in sod., 1995; Haydon, 2001; Nedergaard in sod., 2003). Razumevanje mehanizmov komunikacije med astroцитi in sosednjimi celicami, zlasti nevroni, je ključnega pomena za razumevanje delovanja možganov.

#### 2.1.1 Glavne značilnosti in funkcije astrocitov

Astroцитi v CŽS sesalcev so po številu primerljivi z nevroni in so ključnega pomena za normalno delovanje CŽS in igrajo vlogo v sinaptičnem prenosu ter dvosmerni komunikaciji z nevroni (Sofroniew in Vinters, 2010). So izrazito heterogene celice z zvezdasto obliko. Glede na anatomsko lokacijo in celično morfologijo jih delimo na protoplazemske, ki imajo številne kratke, debele in zelo razvejane izrastke ter zapolnjujejo sivino CŽS in fibrilarne astroцитe, ki imajo daljše, vlaknaste in manj razvejane izrastke ter zapolnjujejo belino CŽS (Cajal, 1909). Skupaj z nevroni in drugimi celicami glije tvorijo presledkovne stike, obdajajo sinapse in Ranvierove zažemke (Peters in sod., 1991).

Astroцитi z izrastki obdajajo možganske žile in skupaj z endotelijskimi celicami, bazalno lamino in perivaskularnimi periciti sooblikujejo t.i. krvno-možgansko bariero (Abbott in sod., 2006; Ballabh in sod., 2004). Z izločanjem prostaglandinov, dušikovega monoksida in arahidonske kisline sodelujejo pri uravnavanju lokalnega pretoka krvi v CŽS (Gordon in sod., 2007; Iadecola in Nedergaard, 2007). Perisinaptični astroцитi uravnavajo ionsko ravnovesje, pH, homeostazo živčnih prenašalcev in vode (preko akvaporina 4) (Seifert in sod., 2006; Simard in Nedergaard, 2004; Zador in sod., 2009). V sinaptičnem prenosu sodelujejo z izločanjem prenašalcev glije, kot so glutamat, purini (ATP in adenzin), GABA in D-serin, ki se sprostijo iz astrocitov zaradi povečanja  $[Ca^{2+}]_i$  in lahko vplivajo na vzdražnost nevronov (Halassa in sod., 2007; Nedergaard in sod., 2003; Perea in sod., 2009; Shigetomi in sod., 2008). Tovrstna spoznanja o vlogi astrocitov so vodila do oblikovanja hipoteze o t. i. tripartitni sinapsi, v kateri je poleg pre- in postsinaptičnega nevrона soudeležen tudi perisinaptični astroцит (Araque in sod., 1999; Halassa in sod., 2007; Perea in sod., 2009).

Astroцитi v obliki glikogena skladiščijo glukozo, ki jo privzamejo iz krvnega obtoka, izločajo lahko laktat, ki ga privzamejo nevroni ter odstranjujejo produkte presnove iz beline in sivine možganov (Peters in sod., 1991; Phelps, 1972). So ključnega pomena za vzdrževanje homeostaze živčnih prenašalcev. Iz sinaptičnega prostora odstranjujejo glutamat in preprečijo njegovo nevrotoksičnost tako, da ga s pomočjo glutaminske sintetaze pretvarjajo v netoksični glutamin (Martinez-Hernandez in sod., 1977).

## 2.2 ALZHEIMERJEVA BOLEZEN IN PRESENILINI

### 2.2.1 Alzheimerjeva bolezen

Alzheimerjeva bolezen (AB) je napredujoča, nepovratna in usodna nevrodegenerativna bolezen, ki prizadene kognitivne zmogljivosti človeka; je najpogostejši vzrok demence pri odraslih (Selkoe, 2001). Klinične značilnosti Alzheimerjeve bolezni obsegajo upad spomina, predvsem kratkoročnega in delovnega, apatijo, depresijo, omejeno razsodnost, dezorientacijo, zmedenost, pogoste spremembe v razpoloženju in otežen govor, požiranje ter hojo. Ključni patološki znaki AB so obsežna nevrodegeneracija medianega temporalnega režnja (predvsem hipokampusa), parietalnega režnja, določenih predelov sprednjega režnja in cingulatnega girusa (Giannakopoulos in sod., 2009; Wenk, 2003); v možganovini so značilni fokalni zunajcelični depoziti  $\beta$ -amiloida poimenovani amiloidni plaki ali senilne lehe in kopičenje neurofibrilarnih pentelj iz hiperfosforiliranega proteina tau v nevronih (Selkoe, 2001).

Degeneracija in zmanjšanje števila sinaps nastopita pred propadom nevronov (DeKosky in Scheff, 1990; Scheff in sod., 1991) in sta pričakovano povezana z usihanjem umskih sposobnosti človeka. Nevrodegeneracija domnevno poteka postopoma in demenca verjetno odraža le končni stadij nakopičenih patoloških sprememb, ki se lahko začnejo pojavljati celo desetletje (ali več) pred nastopom kliničnih znakov (Jack in sod., 2010). Po trenutno uveljavljenem mnenju strokovnjakov, nevrodegeneracija odraža specifične okvare nevronov. Alternativno lahko nastopi z odpovedjo astroglije, ki je ključnega pomena za vzdrževanje homeostaze v možganih (celične, mikroarhitekturne, vaskularne, presnovne, živčnih prenašalcev, ionske) (Terry, 2000; Giaume in sod., 2007; Kano in Hashimoto, 2009; Heneka in sod., 2010; Nedergaard in sod., 2010).

Brookmeyer in sod. (2007) navajajo, da za Alzheimerjevo boleznijo v svetovnem merilu boleha 27 milijonov ljudi. Zdravila oziroma terapije, ki bi bolezen uspešno ozdravila ali upočasnila njeno napredovanje, trenutno še ne poznamo, zato napovedujejo, da se bo število obolelih za AB do leta 2050 početrilo.

Večina primerov AB je sporadičnih in se pojavi v pozni starosti (nad 60 let). V maloštevilnih primerih lahko bolezen nastopi zgodaj in je genetsko podedovana, t.i. familiarna AB (FAB). V 40 % znanih primerov FAB so našli mutirane gene za presenilin 1 (PS1) in presenilin 2 (PS2) (Tandon in Fraser, 2002).

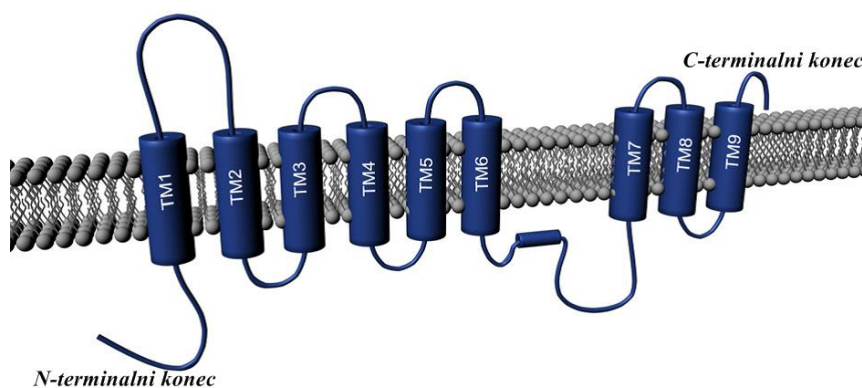
### 2.2.2 Presenilini

Presenilini so evolucijsko ohranjeni transmembranski proteini, ki spadajo v družino aspartatnih proteaz in so udeleženi pri uravnavani intramembranski proteolizi (*angl.* »regulated intramembrane proteolysis«, RIP), mehanizmu cepitve peptidnih vezi v proteinih znotraj lipidnega dvosloja (Brown in sod., 2000; Urban in sod., 2002). Vpleteni so tudi v uravnavanje  $\beta$ -kateninov, signalno transdukcijo, adhezijo celic, transport

proteinov, apoptozo, sinaptično plastičnost, fosforilacijo proteina tau in homeostazo kalcija (Hass in sod., 2009).

PS1 in PS2 sesalcev sta zelo podobna proteina, katerih gena sta zapisana na 14. (14q24.3) in 1. kromosomu (1q42.2) (De Strooper in sod., 2012). mRNA obeh genov sestavlja 10 eksonov, ki so podvrženi tkivno specifičnemu alternativnemu izrezovanju (Tandon in Fraser, 2002). Do danes so identificirali preko 180 različnih drugačnosmiselnih mutacij (*angl.* »missense mutations«) v genu za PS1 in 20 mutacij v genu za PS2, ki lahko vodijo v pojav FAB (Bezprozvanny, 2013).

Presenilini sesalcev so holoproteini z molekulsko maso 50 kDa, polipeptidna veriga domnevno devetkrat prehaja membrano endoplazemskega retikuluma (ER) (Laudon in sod., 2005). Po sintezi so podvrženi endoproteolizi v znotrajcelični zanki med šestim in sedmim transmembranskim segmentom; nastaneta ~30 kDa N-terminalni fragment usmerjen v citosol in ~20 kDa C-terminalni fragment usmerjen v lumen ER, oba ostaneta povezana kot heterodimer (De Strooper in sod., 2012).



**Slika 1: Shematski prikaz presenilina 1 (PS1) sesalcev** (Povzeto in prirejeno po Honarnejad in Herms, 2012: 1984). Holoprotein PS1 v membrani ER domnevno tvori 9 transmembranskih (TM1-9) območij. Polipeptidna veriga PS1 je podvržena endoproteolizi v predelu znotrajcelične zanke med segmentoma TM6 in TM7, tako, da nastaneta N- in C-terminalni fragment.

Skupaj z nikastrinom, Aph-1 (*angl.* »anterior pharynx defective 1«) in Pen-2 (*angl.* »presenilins enhancer 2«) tvorita multimerni kompleks z  $\gamma$ -sekretazno aktivnostjo, ki se prenese do površine celice in endosomalnih struktur za cepitev transmembranskih proteinov tipa I, kot so Notch in amiloidni prekuzorski protein (APP).  $\gamma$ -sekretaza cepi APP do  $\beta$ -amiloida ( $A\beta$ ), ki v možganih AB tvori amiloidne plake. Skladno z vlogo presenilinov kot katalitično podenoto  $\gamma$ -sekretaze lahko zaključimo (De Strooper in sod., 1998; Wolfe in sod., 1999), da FAB mutacije v genih za preseniline vplivajo na procesiranje APP (Tu in sod., 2006). Spremenjeno proteolitično procesiranje  $\beta$ -amiloidnega prekuzorskega proteina privede do povečanega kopičenja hidrofobnega  $\beta$ -amiloida z 42 aminokislinskimi ostanki, ki ima večjo težnjo h agregaciji in je v primerjavi s krajšim, 40 aminokislinskim  $\beta$ -amiloidom, tudi bolj toksičen (Mattson, 1997).

Mutant presenilina 1 (*PS1ΔE9*), na katerega smo se omejili v našem delu, je posledica insercije 18 nukleotidov v intronu 8 (TGGAATTTTGTGCTGTTG), ki privede do izgube prepisa eksona 9. *PS1ΔE9* v transgeni miši (Lee in sod., 1996) ni podvržen endoproteolitičnemu procesiranju, prav tako ne v celicah v kulturi (Thinakaran in sod., 1996).

Tu in sod. (2006) so mnenja, da lahko presenilini kot holoproteini v membranah ER tvorijo pasivne  $\text{Ca}^{2+}$  kanale, zato mutacije FAB presenilinov vplivajo na prevodnost kalcijevih ionov. S poskusi na planarnih lipidnih membranah so dokazali, da je mutant FAB *PS1ΔE9* kanal z veliko prevodnostjo za dvovalentne ione (večjo od prevodnosti divjega tipa PS1), kar nakazuje, da je mutant *PS1ΔE9* bolj prepusten kalcijev kanal. Povečano puščanje  $\text{Ca}^{2+}$  zaradi mutiranega presenilina je skladno z izmerjeno povečano bazalno  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  v transfeciranih nevroblastomskih celicah SH-SY5Y (Cedazo-Minguez in sod., 2002).

### 2.3 KALCIJEVA VZDRAŽNOST V ASTROCITIH IN VPLETENOST PRESENILINOV

Astroцитi so električno nevzdražne celice, t.j. ne prožijo akcijskih potencialov kot nevroni, čeprav na površini izražajo kalijeve in natrijeve kanale (Seifert in sod., 2006). Astroцитi se na fiziološke dražljaje odzivajo s prehodnim povečanjem znotrajcelične koncentracije prostih kalcijevih ionov ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), t.j. imajo vzdražen citosol; povečana  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lahko sproži uravnavano eksocitozo prenašalcev glije. Kalcijeva vzdražnost se preko presledkovnih stikov (*angl.* »gap junctions«), ki jih tvorijo koneksini (*angl.* »connexins«) razširi tudi na sosednje astroцитe. Na prehodno povečanje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lahko vplivajo tudi nevroni z izločanjem živčnih prenašalcev (glutamata in purinov) (Halasa in sod., 2007; Nedergaard in sod., 2003; Perea in sod., 2009; Shigetomi in sod., 2008; Volterra in Meldolesi, 2005).

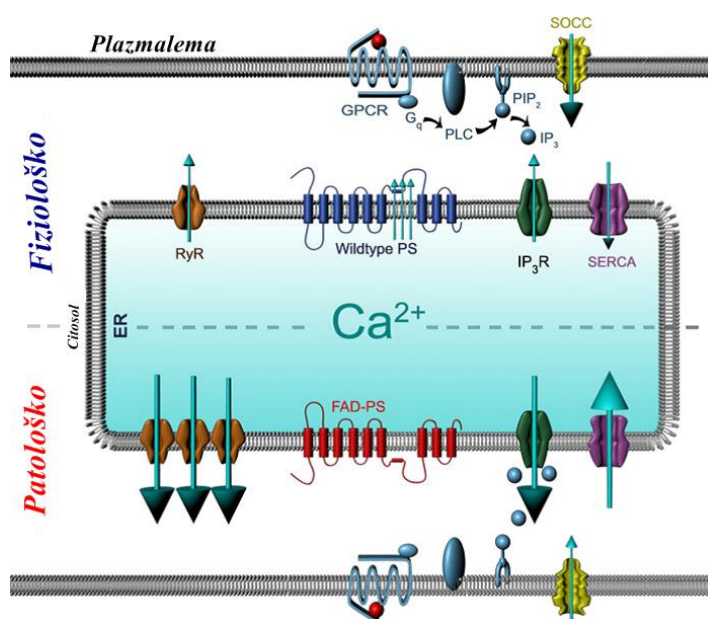
Glavni rezervoar znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$  v astroцитih je endoplazemski retikulum (ER); koncentracija kalcija v lumnu ER je 0,2-1,0 mM, v citosolu astrocita v mirovanju pa ~50-100 nM (Parpura in Verkhratsky, 2012a).

Astroцитi na površini izražajo številne receptorje, med drugimi z G-proteini sklopljene receptorje z visoko afiniteto (*angl.* »high affinity G protein-coupled receptors«, GPCR) (Aguilhon in sod., 2008; Parpura in Verkhratsky, 2012b; Zorec in sod., 2012). G-proteini se med seboj razlikujejo po podenotah, ki ob aktivaciji omogočijo različne celične odzive. Aktivacija  $G_q$  podenote aktivira fosfolipazo C (PLC), ki hidrolizira fosfoinozitol difosfat ( $\text{PIP}_2$ ) do diacil glicerola (DAG) in inozitol trifosfata ( $\text{IP}_3$ ) (Kreft in sod., 2016). Kalcijevi ioni se izločajo iz ER skozi inozitol-1,4,5-trifosfatne ( $\text{IP}_3$ )- in/ali rianodinske receptorje (Golovina in Blaustein, 1997). Vezava  $\text{IP}_3$  na  $\text{IP}_3$  receptorje v membrani ER (Hua in sod., 2004) ali celo na sekrecijskih mešičkih (Hur in sod., 2010) omogoči sproščanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz znotrajceličnih zalog in povečanje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Kreft in sod., 2016).  $\text{Ca}^{2+}$  vstopajo v lumen ER skozi črpalko SERCA (*angl.* »sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase«) (Honarnejad in Herms, 2012). K povečanju  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lahko prispevajo tudi mitohondriji.  $\text{Ca}^{2+}$  lahko vstopi v astroцит iz zunajceličnega prostora (Parpura in sod., 2011) skozi napetostno

odvisne  $\text{Ca}^{2+}$ -kanale (MacVicar in sod., 1984; Parri in Crunelli, 2001; Latour in sod., 2003), ionotropne receptorje (Lalo in sod., 2011),  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmenjevalec NCX (Reyes in sod., 2012) in skozi kompleks, ki se aktivira ob nizkih koncentracijah  $\text{Ca}^{2+}$  v ER (*angl.* »store-operated calcium channels«, SOCC), kjer so ključnega pomena zlasti kanali TRP (*angl.* »transient receptor potential«) (Malarkey in sod., 2008).

Kompleksna kalcijeva signalizacija v astrocitih lahko vpliva na transport mešičkov in/ali sekrecijo prenašalcev glije (Stenovec in sod., 2014).

Odkar so preseniline povezali s pojavom Alzheimerjeve bolezni, so le-ti srž številnih raziskovalnih naporov (Supnet in Bezprozvanny, 2011). Okvare v PS1 vodijo v spremenjeno znotrajcelično kalcijevo signalizacijo (Ito in sod., 1994). V novejših raziskavah so mutacije PS1 povezali s pridobljeno funkcijo aktivacije  $\text{IP}_3$  kanalov in posledično povečanim sproščanjem kalcija iz ER (Cheung in sod., 2010). Povečano izražanje rianodinskih receptorjev, ki posreduje povečano sproščanje kalcijevih ionov, so ugotovili tudi v možganih transgenih miši z mutacijo v genu za PS1 (Stutzmann in sod., 2006). Poleg tega PS1 deluje tudi kot pasivni kanal v membrani ER prepusten za  $\text{Ca}^{2+}$ ; nekatere mutacije v holoproteinu PS1 pa naj bi puščanje onemogočile in povzročile prebitek  $\text{Ca}^{2+}$  v lumnu ER ter obsežno aktivacijo  $\text{IP}_3$  receptorjev (Supnet in Bezprozvanny, 2011).



**Slika 2: Uravnavanje  $\text{Ca}^{2+}$  homeostaze v normalnih astrocitih (fiziološko) in astrocitih z mutiranim presenilinom (patološko stanje)** (Povzeto in prirejeno po Honarnejad in Herms, 2012: 1984). Koncentracija kalcija v ER je približno 1000-krat večja v primerjavi s citosolno koncentracijo. Mutacije v presenilinih, ki jih povezujejo z FAB (spodnja polovica slike), potencirajo sproščanje  $\text{Ca}^{2+}$  skozi  $\text{IP}_3$  receptorje ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) in rianodinske receptorje (RyR), povečajo izražanje RyR in aktivnost fosfolipaze C (PLC) ter sintezo  $\text{IP}_3$ . Ojačajo tudi delovanje črpalke SERCA in zmanjšajo kapacitivni vstop kalcija preko SOCC. Zgornja polovica slike prikazuje običajno fiziološko uravnavanje  $\text{Ca}^{2+}$ , kjer lahko presenilinski holoproteini delujejo kot

pasivni kalcijevi kanali. Večina FAB mutacij v presenilnih vodi v izgubo te funkcije. Smer in velikost puščic ustrežata smeri in količini mobilizacije  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 2.4 SEKRECIJSKI MEŠIČKI IN URAVNAVANA EKSO-CITOZA V ASTROCITIH

### 2.4.1 Eksocitoza

Eksocitoza je kompleksen, mnogostopenjski proces, med katerim se membrana mešička zlije s plazmalemo; snovi vskladiščene v svetlini mešička se nato lahko difuzijsko izločijo v zunajcelični prostor (Vardjan in sod., 2010; Spang in sod., 2015). Učinkovitost eksocitoze temelji na usmerjenem transportu mešičkov do plazmaleme in njihovem zlitju z njo (Verkhatsky in sod., 2015b). Eksocitoza je ključnega pomena za medcelično komunikacijo in izmenjavo snovi v večini evkariontskih celic. Uravnava jo prosti  $\text{Ca}^{2+}$  v citosolu; poteka v mirovanju (t.i. konstitutivna eksocitoza) ali kot odziv celice na draženje (t.i. uravnavana eksocitoza) (Kasai in sod., 2012).

Uravnavana eksocitoza v nevronih je ključnega pomena za sproščanje živčnih prenašalcev v kemičnih sinapsah. Zlivanje mešičkov s plazmalemo omogoča evolucijsko ohranjen kompleks proteinov SNARE (*angl.* »soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor«) (Sollner in sod., 1993). Eksocitoza v astrocitih se od eksocitoze v nevronih razlikuje glede na prostorsko ureditev, kinetiko in molekulske mehanizme (Verkhatsky in sod., 2015b). Astrocitni kompleks SNARE tako sestavljajo sinaptobrevin 2 v membrani mešička in sintaksin 1 ter SNAP-23 v plazmalemi (Verkhatsky in sod., 2015b).

### 2.4.2 Citoskelet

Citoskelet in motorni proteini so ključnega pomena za znotrajcelični transport organelov v evkariontskih celicah (Chang in Goldman, 2004). Hiter transport znotrajceličnih mešičkov omogočajo motorni proteini in omrežje mikrotubulov ter aktinskih filamentov (Buss in sod., 2004). Tako v nevronih (Grafstein in Forman, 1980; Squire in sod., 2003) kot v astrocitih (Potokar in sod., 2005; Potokar in sod., 2007) je transport vzdolž mikrotubulov razmeroma hiter. Citoskelet v astrocitih sooblikujejo tudi intermediarni filamenti, ki za razliko od mikrotubulov in aktinskih filamentov, nimajo encimske aktivnosti, njihova vloga v astrocitnem transportu v celoti še ni pojasnjena (Chang in Goldman, 2004; Eliasson in sod., 1999; Pekny in Pekna, 2004). Vzdrževali naj bi predvsem mehansko stabilnost in obliko celice ter zagotavljali ogrodje za porazdelitev citoplazme in organelov (Eriksson in sod., 2004).

Poleg kinezinov in dineinov (molekulski motorji), ki prenašajo tovor vzdolž mikrotubulov, lahko najdemo v astrocitih sesalcev tudi različne miozine (izotipe I, II, V in VI), ki prenašajo tovor vzdolž aktinskih filamentov (Phelps in sod., 2003).



Presenilini interagirajo z mikrotubuli in mikrofilamenti, zato lahko mutacije v genih za PS1 v primeru FAB povzročijo motnje v potovanju sekrecijskih mešičkov zaradi destabilizacije omrežja citoskeleta (Pigino in sod., 2001).

V astrocitih so opazili dva temeljna tipa mobilnosti mešičkov (Potokar in sod., 2005): neusmerjeno, ki najverjetneje odraža prosto difuzijo in usmerjeno, ki poteka s pomočjo molekulskih motorjev ob elementih citoskeleta (Tvarusko in sod., 1999). Vpogled v transport astrocitnih mešičkov je odprl nov pogled na vlogo astrocitov v delovanju možganov (Potokar in sod., 2013). Astrociti komunicirajo s sosednjimi celicami s pomočjo eksocitotskega sproščanja prenašalcev glije iz posameznih mešičkov (Guček in sod., 2012; Parpura in Zorec, 2010). Učinkovitost astrocitne komunikacije temelji na neokrnjenem znotrajceličnem transportu sekrecijskih mešičkov, ki zagotavlja dostavo materiala, vskladiščenega v svetlini ali v membrani mešičkov, do plazmaleme (Vardjan in sod., 2012).

V posmrtnem človeškem tkivu obolelih za AB so našli hipertrofirane astrocite in pogosto povečano raven GFAP (*angl.* »glial fibrillary acidic protein«), eno od komponent intermediarnih filamentov, in S100β, protein ki veže Ca<sup>2+</sup> (Beach in McGeer, 1988; Griffin in sod., 1989; Mrak in Griffin, 2005; Nagele in sod., 2004; Verkhratsky in sod., 2015a). V živalskem modelu familiarne AB so poleg hipertrofije opazili tudi atrofijo astrocitov v hipokampusu in prefrontalni ter entorinalni skorji (Kulijewicz-Nawrot in sod., 2012; Olabarria in sod., 2010, 2011; Yeh in sod., 2011); spremembi sta nastopili pred pojavom senilnih plakov, entorinalna skorja je prva podvržena spremembam v AB (Yeh in sod., 2011). Atrofija astrocitov pričakovano oteži izvajanje podpore nevronom, kar lahko vodi do motenj v sinapsah, neravnovesja živčnih prenašalcev in smrti nevronov zaradi ekscitotoksičnosti (Hynd in sod., 2004). Atrofija astrocitov lahko odraža spremenjeno funkcionalno arhitekturo astrocitov in nakazuje na okrnjen znotrajcelični transport mešičkov, ki je nujno potreben za nemoteno medcelično signalizacijo (Stenovec in sod., 2016). Astrociti med seboj komunicirajo preko sproščanja prenašalcev glije iz mešičkov (Guček in sod., 2012; Parpura in Zorec, 2010); komunikacija je neposredno odvisna od nemotenega transporta mešičkov, ki zagotavlja počasno vendar neprekinjeno dostavo tovora v lumnu in/ali membrani mešička proti plazmalemi (Stenovec in sod., 2016).

#### **2.4.3 Peptidrgični sekrecijski mešički v astrocitih**

Astrociti skladiščijo številne peptide v citoplazemskih mešičkih, vključno z atrijskim natriuretičnim peptidom (ANP), ki je bil eden izmed prvih raziskanih peptidnih kemičnih prenašalcev v procesu eksocitoze (Zorec in sod., 2016). ANP je polipeptid z močnimi vazodilatacijskimi učinki, vpleten je tudi v uravnavanje pretoka krvi v mišicah in privzem kisika med telesno vadbo (Rud in sod., 2012).

ANP v možganskih celicah je vskladiščen v sekrecijskih mešičkih, iz katerih se izloči kot peptid iz 24-25 aminokislinskih ostankov. Njegova vsebnost v astrocitih se značilno

poveča po možganski kapi (Nogami in sod., 2001), kar nakazuje na njegovo vlogo v uravnavanju krvnega pretoka v možganih (Kreft in sod., 2009). Okvara receptorjev ANP povzroči tudi inhibicijo zaznave vnosa soli v telo (Blackburn in sod., 1995). Astrocitna sekrecija ANP poteka z od  $\text{Ca}^{2+}$ -odvisno eksocitozo mešičkov (Kržan in sod., 2003; Kreft in sod., 2009).

#### **2.4.4 Glutamatergični sekrecijski mešički v astrocilih**

L-glutamat je amino kislina z vlogo prevladujočega ekscitatornega živčnega prenašalca v CŽS. V astrocilih se lahko sintetizira *de novo* iz  $\alpha$ -ketoglutarata (Hertz in sod., 1999) s pomočjo, za astroците specifičnega encima, piruvatne karboksilaze. Aspartatna aminotransferaza transaminira  $\alpha$ -ketoglutarat (aspartat je donor aminske skupine), pri čemer nastane glutamat, ki se prenese v citosol. Alternativno se glutamat tvori iz  $\alpha$ -ketoglutarata in alanina s pomočjo encima alaninske aminotransferaze. Citoplazemski glutamat se nato prečrpa v sekrecijske mešičke s pomočjo membranskega glutamatnega prenašalca (VGLUT) in z izzvano eksocitozo izloči v sinaptično špranjo (Liguz-Lecznar in Skangiel-Kramška, 2007).

Kopičenje glutamata v zunajceličnem prostoru ima lahko toksične učinke za nevrone (Choi in sod., 1987), zato je učinkovito odstranjevanje glutamata iz zunajceličnine ključnega pomena za preživetje nevronov. Homeostazo glutamata vzdržujejo 3 visoko homologne izooblike VGLUT, ki se močno izražajo v celotnem živčnem sistemu (Liguz-Lecznar in Skangiel-Kramška, 2007). VGLUT1 se nahaja v novi možganski skorji (1.-3. sloju), entorinalni in piriformni skorji, hipokampusu, amigdali in subikulumu. V malih možganih se izraža v t.i. paralelnih vlaknih (Liguz-Lecznar in Skangiel-Kramška, 2007).

VGLUT1 mešički v astrocilih podgan so majhni in elektronsko presevni, s premerom  $\sim 30$  nm *in situ* (Bezzi in sod., 2004) in  $\sim 50$  nm po recikliranju (Stenovec in sod., 2007), poročajo tudi o mešičkih večje velikosti (Chen in sod., 2005; Malarkey in Parpura, 2011). Izmerjeni premeri VGLUT1 mešičkov se verjetno razlikujejo zaradi različnih tehnik mikroskopiranja in dela raziskovalcev (Kreft in sod., 2016). Stenovec in sod. (2007) so prišli do presenetljive ugotovitve, da se spontana mobilnost recikliranih glutamatergičnih mešičkov poveča ob draženju astrocitov. V prisotnosti pufra BAPTA-AM, ki je kelator  $\text{Ca}^{2+}$  ionov, do tega pojava ne pride (Kreft in sod., 2016). Transport glutamatergičnih mešičkov najverjetneje poteka ob mikrotubulih in aktinskih ter vimentinskih filamentih (tip intermediarnih filamentov); motnje v organizaciji aktina zmanjšajo njihovo mobilnost (Stenovec in sod., 2007).

## 2.5 NAMEN DELA

V magistrski nalogi smo raziskali vpliv mutanta *PS1ΔE9*, ki je so-udeležen v nastanku familiarnega tipa Alzheimerjeve bolezni na:

1. učinkovitost znotrajceličnega transporta astrocitnih mešičkov v mirovanju in po draženju celic s sekretagogom ATP in
2. jakost izzvanega eksocitotskega/sekrecijskega odziva astrocitov podgane v kulturi.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 GOJIŠČA IN RAZTOPINE

##### 3.1.1 Hranilno gojišče za astrocite

Hranilno gojišče smo pripravili iz DMEM-a (*angl.* »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«) s 4500 mg/l D-glukoze, ki smo mu dodali 10 % fetalnega seruma goveda, FBS (*angl.* »Fetal Bovine Serum«), 1 mM Na-piruvat, 2 mM L-glutamin in 50 µg/ml zmesi antibiotikov penicilina in streptomcina (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA).

##### 3.1.2 Lipofekcijsko gojišče

Lipofekcijsko gojišče smo pripravili iz gojišča DMEM s 4500 mg/l D-glukoze, kateremu smo dodali 1 mM Na-piruvat in 2 mM L-glutamin.

##### 3.1.3 Zunajcelična raztopina za astrocite

Za pripravo zunajcelične raztopine smo uporabili 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glukozo in 10 mM pufer HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsulfonska kislina). Raztopino smo titrirali z NaOH do pH 7,2. Končna osmolarnost raztopine je bila 300 mOsm, kar smo preverili z osmometrom (Osmomat030, Gonotec GmbH, Nemčija).

##### 3.1.4 Založna raztopina ATP

Založno raztopino ATP smo pripravili iz zunajcelične raztopine, ki smo ji do končne koncentracije 600 µM dodali 165 mM ATP (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA).

##### 3.1.5 Plazmidi

###### 3.1.5.1 Plazmid ANP.emd

Plazmid ANP.emd kodira zapis za atrijski natriuretični peptid (ANP), ki je na C-terminalnem koncu označen z mutiranim zelenim fluorescentnim proteinom Emerald. Plazmid je darilo dr. Eda Levitana, Univerza v Pittsburghu, PA, ZDA.

###### 3.1.5.2 Plazmid VGLUT1-EGFP

Plazmid VGLUT1-EGFP kodira zapis za fuzijski protein glutamatnega prenašalca membrane mešička (VGLUT1), ki je označen z okrepljenim zelenim fluorescentnim proteinom. Plazmid je darilo dr. Sarah El Mestikawy, INSERM U513, Creteil Cedex, Francija.

###### 3.1.5.3 Plazmid PS1ΔE9

Plazmid PS1ΔE9 kodira zapis za mutirani presenilin 1 (PS1ΔE9). Plazmid je darilo dr. Ilyje Bezprozvannyja, UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX, ZDA.

### 3.2 PRIPRAVA KROVNIH STEKELC PREMAZANIH S POLI-L-LIZINOM (PLL)

Okrogla krovna stekelca s premerom 22 mm (Propper Manufacturing, New York, ZDA) smo sterilizirali v mikrovalovni pečici (7-10 min), razmastili v 70 % etanolu (15 min) in dvakrat sprali z redestilirano vodo. V nadaljevanju smo krovna stekelca inkubirali (20 min) v raztopini 10 µg/mL poli-L-lizina (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji in ponovnemu dvakratnem spiranju v redestilirani vodi smo prislonili stekelca na manjše petrijevke in jih sušili 2-3 ure v laminariju. Suha krovna stekelca smo namestili v sterilne petrijevke s premerom 35 mm, ovili s parafilmom in do uporabe hranili v hladilniku (4-6°C).

### 3.3 CELIČNA KULTURA ASTROCITOV

Primarno celično kulturo kortikalnih astrocitov so pripravili sodelavci v laboratoriju za nevroendokrinologijo in molekulske celično fiziologijo iz možganov novorojenih samice podgan seva Wistar po uveljavljenem postopku (Schwartz in Wilson, 1992). Priprava celic je potekala v skladu z zakonodajo o delu na izoliranih tkivih, organih in truplih predhodno usmrčenih živali po 22.a členu Zakona o zaščiti živali (ZZZiv-UPB2, Ur. List RS, št. 38/2013 z dne 3. 5. 2013). Celice v kulturi smo hranili v inkubatorju (HF90, Heal Force, Kitajska) pri temperaturi 37°C, 95 % relativni zračni vlažnosti in sestavi atmosfere 5 % CO<sub>2</sub>/95 % zrak.

### 3.4 NASADITEV ASTROCITOV NA KROVNA STEKELCA PREMAZANA S PLL

Iz kultivacijske posode s primarno kulturo astrocitov smo odpipetirali hranilno gojišče, celicam dodali 1,5 ml ogrete raztopine zmesi tripsin/EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA) in inkubirali 5 min pri 37°C. Učinkovitost odlepljanja celic od podlage posode smo ocenili pod presevnim svetlobnim mikroskopom po dodatku 1 ml ogretega hranilnega gojišča za astrocite. Celično suspenzijo smo odpipetirali v dve 1,5 ml centrifugirki in 5 min centrifugirali pri 900 obratih/min (Centric 150, Tehnica, Železniki, Slovenija). Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet nežno resuspendirali v 0,5 ml gojišča. 50 µl celične suspenzije smo nanесли na sredino krovne stekelca s PLL in po 20-minutni inkubaciji pri 37°C celice oskrbeli z 2 ml svežega gojišča za astrocite. Celice na krovnih stekelcih smo vzdrževali v inkubatorju (37°C) do izvedbe poizkusov.

### 3.5 ENOJNA IN DVOJNA LIPOFEKCIJA ASTROCITOV V KULTURI

Lipofekcijo astrocitov smo izvedli ~24 ur po nasaditvi celic na krovna stekelca s PLL.

Pripravili smo si tri serije 1,5 ml mikrocentrifugirk z ustrezno mešanico reagentov, glede na število krovnih stekelc. V sterilni mikrocentrifugirki (1) smo razredčili 2 µl reagenta Lipofectamine LTX (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) v 50 µl lipofekcijskega gojišča (na krovno stekelce).

Za enojno transfekcijo astrocitov (s fluorescentnim sekrecijskim označevalcem ANP.emd ali VGLUT1-EGFP), smo v sterilni mikrocentrifugirki (2) raztopili 0,8 µg raztopine

plazmida ANP.emd ali VGLUT1-EGFP in 1  $\mu$ l reagenta Plus (Life Technologies, Carlsbad, ZDA) v 50  $\mu$ l lipofekcijskega gojišča (na krovno stekelce).

Za potrebe dvojne transfekcije astrocitov, pDNA *PS1ΔE9* skupaj s sekrecijskim fluorescentnim označevalcem ANP.emd ali VGLUT1-EGFP, smo v mikrocentrifugirko (3) raztopili 0,4  $\mu$ g plazmida *PS1ΔE9* in 0,4  $\mu$ g plazmida ANP.emd ali VGLUT1-EGFP ter dodali 1  $\mu$ l reagenta Plus v 50  $\mu$ l lipofekcijskega gojišča (na krovno stekelce).

Iz prve mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 50  $\mu$ l mešanice (za vsako krovno stekelce) v drugo ali tretjo mikrocentrifugirko, in zmes inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. V tem času smo celice na krovnih stekelcih oskrbeli z 0,9 ml svežega lipofekcijskega gojišča, jim dodali 0,1 ml lipofekcijske raztopine, previdno premešali, inkubirali 3 h v inkubatorju in nato dodali še 30  $\mu$ l Ultroser G (Pall, Port Washington, ZDA). Naslednji dan smo transfecirane celice oskrbeli z 2 ml svežega gojišča.

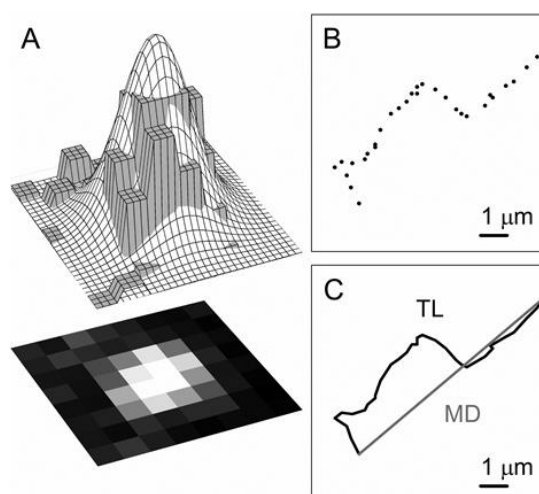
### 3.6 LASERSKA KONFOKALNA MIKROSKOPIJA

Transfecirane celice smo opazovali 48-72 ur po lipofekciji pod konfokalnim mikroskopom v realnem času (LSM 780; Zeiss, Jena, Nemčija). Pred mikroskopiranjem smo celice na krovnem stekelcu sprali z 1 ml ogrete zunajcelične raztopine, vpeli v kamrico, oskrbeli s 400  $\mu$ l zunajcelične raztopine in prenesli na mizico mikroskopa. Celice smo opazovali skozi oljno imerzijski plan-apokromatski objektiv 63 $\times$ /1.40 Oil DIC M27. Konfokalne mikrografije smo zajemali s frekvenco  $\sim$ 2 Hz. Za vzbujanje fluorescence ANP.emd in VGLUT1-EGFP smo uporabili argonski laser z valovno dolžino 488 nm in emitirano svetlobo pasovno filtrirali v območju 495-545 nm. Fluorescenco smo zajemali 1 min v spontanah razmerah in 4 min po draženju celic s 100  $\mu$ M ATP.

### 3.7 ANALIZA MOBILNOSTI IN SEKRECIJSKE AKTIVNOSTI EKSOCITOTSKIH MEŠIČKOV

Časovna zaporedja konfokalnih posnetkov smo izvozili kot datoteke tif v program Particle TR (Celica, Ljubljana, Slovenija). V posamezni celici smo izbrali 40 fluorescentnih mešičkov v primeru konstrukta ANP.emd ali 20 mešičkov v primeru VGLUT1-EGFP ter ročno in/ali avtomatsko sledili njihovim premikom v zaporedju 125 oziroma 375 mikrografij oziroma dokler je bil mešiček še viden. S pomočjo pridobljenih koordinat posameznih mešičkov v zaporedju mikrografij smo izračunali več parametrov mobilnosti v 15-sekundnih obdobjih:

- celotno pot (*angl.* »track length«, TL),
- največji odklon na poti v 15 s (*angl.* »maximal displacement«, MD),
- indeks usmerjenosti (*angl.* »directionality index«, DI), ki smo ga izračunali kot MD/TL. DI je brezenotna vrednost v razponu 0-1,
- hitrost, ki smo jo izračunali kot TL/čas.



**Slika 3: Prikaz analize mobilnosti fluorescentnih mešičkov.** (A) 3D Gaussova krivulja (zgoraj), ki jo program Track2 (ParticleTR, Celica, Slovenija) prilagodi na fluorescentno podobo mešička v konfokalni mikrografiji (spodaj) in določi koordinate (x,y) vrha krivulje (lego mešička) v izbranem času. (B) Prikaz x, y koordinat gibljivega peptidrgičnega mešička v 15-sekundnem obdobju. (C) Rekonstrukcija prepotovane poti mešička, ki je prikazan v panelu A. Izmerimo lahko dolžino poti (TL; črna črta) in največji odmik na poti (MD; siva daljica) mešička.

Sekrezijsko aktivnost posameznih mešičkov z ANP.emd smo kvantificirali v okroglem analitičnem območju ( $2r=12$  pikslov,  $x=0.088 \mu\text{m}$ ,  $S=0.09 \mu\text{m}^2$ ), v katerem smo izmerili povprečno spremembo intenzitete fluorescence (v A.U.) v času, na mestu zlitja mešička v celici. Z lastnim programom Egfpa za MATLAB (MathWorks, Natick, MA, ZDA) smo nato izmerili čas ( $t_{80-20\%}$ ), v katerem se je intenziteta fluorescence zmanjšala od 80 % do 20 % največje intenzitete.

### 3.8 FLUORIMETRIČNE MERITVE ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE KALCIJEVIH IONOV Z INDIKATORJEM FLUO-4

V gojišče (1 ml) z astrociti smo dodali 5  $\mu\text{l}$  1 mM raztopine Fluo-4 (Molecular Probes, Eugene, ZDA) in 30 min inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Nato smo odstranili gojišče, celice enkrat sprali in jih oskrbeli z 1 ml zunajcelične raztopine ter nadalje inkubirali 30 min v temi pri sobni temperaturi. Stekelca z obarvanimi celicami smo namestili v kamrico (kot v točki Laserska konfokalna mikroskopija) in astroците opazovali skozi zračni plan-apokromatski objektiv 20 $\times$ /NA 0,8. Fluo-4 smo vzbujali s svetlobo argonskega laserja z valovno dolžino 488 nm in emitirano svetlobo pasovno filtrirali v območju 495-565 nm. Celice smo opazovali pred (4 min) in med aplikacijo 100  $\mu\text{M}$  dražilne raztopine ATP (4 min).

Spremembe fluorescence Fluo-4 (v A.U.), ki odražajo spremembe koncentracije prostih kalcijevih ionov ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), smo izmerili v 70 astrocitih s programom ZEN2010 v območju, ki je obrobilo posamezne celice. Povprečne spremembe fluorescence v času smo analizirali z lastnim programom Kalcij za MATLAB (MathWorks, Natick, MA, ZDA), s katerim smo

izmerili največjo relativno amplitudo ( $p$ ,  $\Delta F/F_0$ ) in časovni integral ( $S$ ,  $\Delta F/F_0 \cdot s$ ) povečane aktivnosti kalcija po 4-minutni aplikaciji kontrolne raztopine ali zunajcelične raztopine s 100  $\mu\text{M}$  ATP na astrocite. Bazalno raven fluorescence ( $F_0$ ) smo določili na začetku posameznega časovnega zaporedja kot povprečno intenziteto v prvih 300 mikrofotografijah.

### 3.9 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Rezultate izmerjenih parametrov smo prikazali kot srednjo vrednost  $\pm$  standardna deviacija ( $x \pm \text{SD}$ ). Za statistično analizo podatkov smo uporabili neparametrični Mann-Whitney-jev  $U$ -test. Pri pripravi rezultatov smo si pomagali z računalniškimi programi Excel (Microsoft, ZDA), SigmaPlot (Systat Software Inc, Velika Britanija), MATLAB (Mathworks, ZDA), ZEN2010 (Zeiss, Nemčija) in Photoshop (Adobe, ZDA).

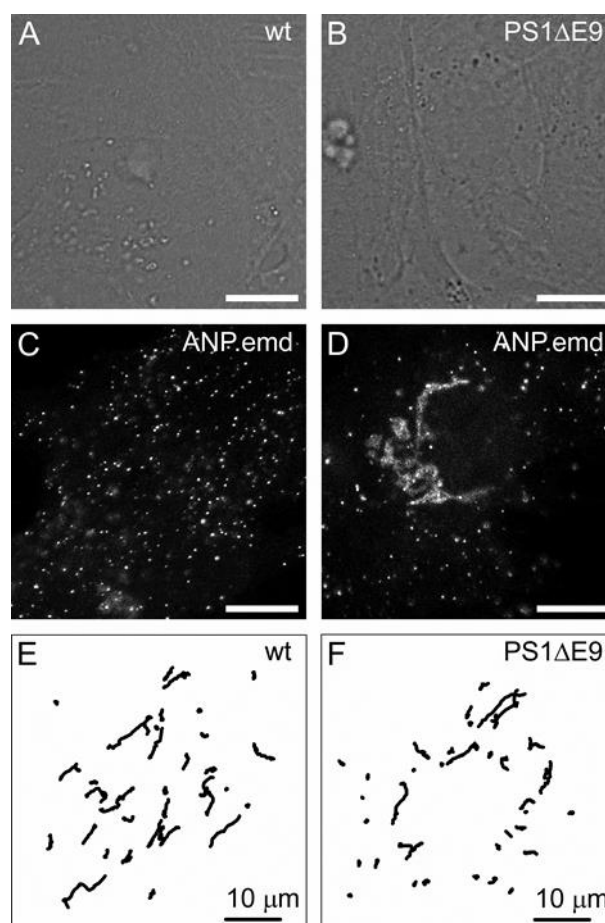


## 4 REZULTATI

### 4.1 SPONTANA MOBILNOST PEPTIDERGIČNIH SEKRECIJSKIH MEŠIČKOV V PODGANJIH ASTROCITIH DIVJEGA TIPA (wt) IN ASTROCITIH PS1ΔE9

Da bi preverili vpliv točkovne mutacije v genu za presenilin 1 (*PS1ΔE9*), posledica katere je delecija devetega eksona na transport peptidergičnih mešičkov, smo astrocite v kulturi dvojno transfecirali s plazmidom za mutirani presenilin 1 (*PS1ΔE9*) in ANP.emd, medtem, ko smo kontrolne astrocite transfecirali zgolj s plazmidom za ANP.emd.

Mobilnost fluorescentnih mešičkov v astrocitih (Sliki 4A, B) smo opazovali s konfokalnim mikroskopom. Fuzijski protein ANP.emd se je vskladiščil v sekrecijske mešičke (Han in sod., 1999), ki so bili vidni kot svetle fluorescentne pike z različno mobilnostjo (Slika 4C, D); skladno z zgodnejšimi raziskavami mobilnosti astrocitnih mešičkov (Kržan in sod., 2003; Kreft in sod., 2004). Najprej smo analizirali spontano mobilnost 40 peptidergičnih mešičkov in rekonstruirali njihove poti v 15-sekundnih obdobjih; v kontrolnih in PS1ΔE9 astrocitih. Poti gibljivih mešičkov so bile podolgovate, medtem, ko so bile poti negibljivih mešičkov »točkaste«. V kontrolnih astrocitih smo pogosto opazili daljše poti (Slika 4E) v primerjavi s PS1ΔE9 astrociti (Slika 4F), kar je nakazalo na zmanjšano usmerjeno mobilnost peptidergičnih mešičkov v celicah, ki so izrazile presenilinskega mutanta.

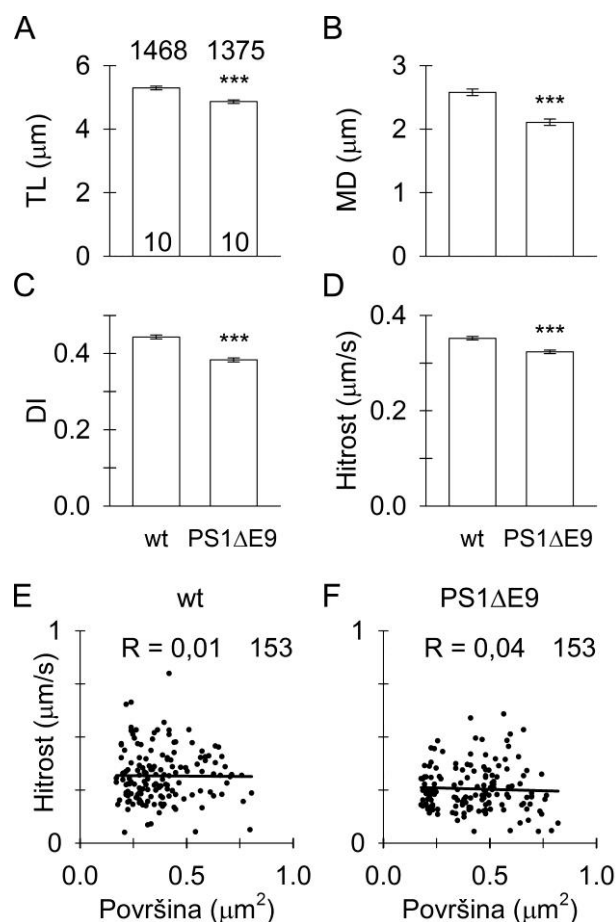


**Slika 4: Spontana mobilnost peptidergičnih sekrezijskih mešičkov v podganih astrocitih divjega tipa (wt) in astrocitih PS1ΔE9.** (A, B) Presečna diferencialno kontrasta mikrografija astrocita wt in (B) astrocita PS1ΔE9, ki je izrazil mutirani presenilin 1 (*PS1ΔE9*) (B) v celični kulturi. (C, D) Konfokalni mikrografiji istih celic (kot v A in B), ki sta skladiščili atrijski natriuretični peptid označen z mutiranim zelenim fluorescentnim proteinom (ANP.emd) v posameznih sekrezijskih mešičkih (svetle fluorescentne pike v mikrografijah). Merilo (A-D) = 10 μm. (E, F) Prikaz rekonstruiranih poti 40 peptidergičnih mešičkov v 15-sekundnem obdobju v kontrolnem astrocitu (wt) in v astrocitu PS1ΔE9. Poti gibljivih mešičkov so bile podolgovate, medtem, ko so bile poti negibljivih mešičkov »točkaste«. Gibljivi mešički v astrocitu PS1ΔE9 so prepotovali krajše razdalje.

Za podrobnejše ovrednotenje razlik v spontani mobilnosti peptidergičnih mešičkov v astrocitih divjega tipa in astrocitih PS1ΔE9 smo analizirali več parametrov mobilnosti; prepotovano pot (*angl.* »track length«, TL), največji odmik na prepotovani poti (*angl.* »maximal displacement«, MD), indeks usmerjenosti (*angl.* »directional index«, DI) in hitrost gibanja mešičkov, v 15-sekundnih obdobjih. Skupno smo analizirali spontano mobilnost 1468 mešičkov v 10 celicah divjega tipa in 1375 mešičkov v 10 celicah mutiranega presenilina (PS1ΔE9). Prepotovana pot (TL) je bila statistično značilno zmanjšana v astrocitih PS1ΔE9; za ~8 % (Slika 5A;  $p < 0,001$ ), prav tako je bil značilno zmanjšan največji odmik na prepotovani poti (MD) v astrocitih PS1ΔE9; za ~18 % (Slika 5B). V astrocitih PS1ΔE9, sta bila podobno zmanjšana tudi indeks usmerjenosti (DI), za

~14 % (Slika 5C) in hitrosti, za ~8 % (Slika 5D). Spontana mobilnost peptidergičnih mešičkov je bila, v primerjavi s celicami divjega tipa, znatno zmanjšana v astrocitech *PS1ΔE9*.

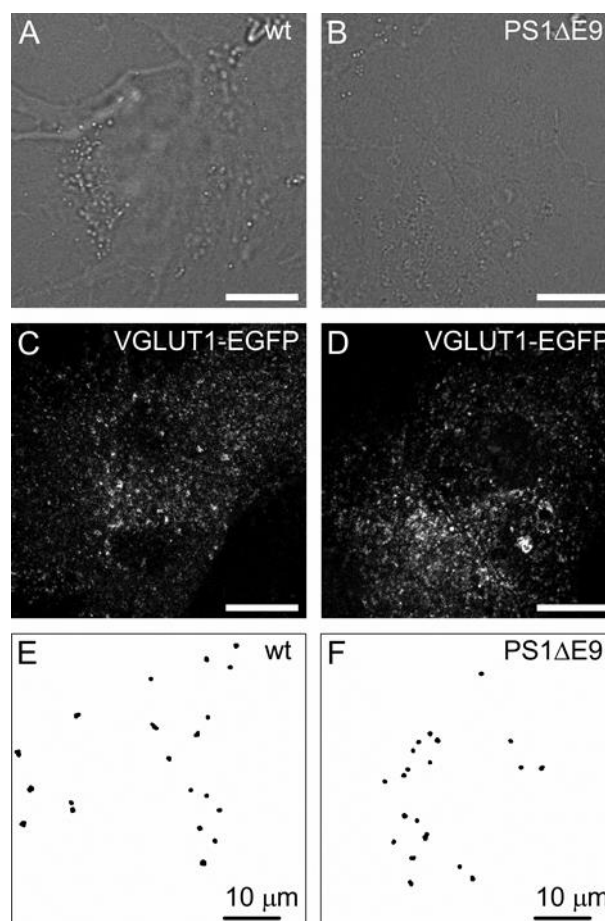
V nadaljevanju smo raziskali še povezavo med velikostjo (površino) mešičkov in njihovo mobilnostjo (hitrostjo). Ugotovili smo, da preiskovana parametra nista povezana med seboj (Sliki 5E, F).



**Slika 5: Spontana mobilnost peptidergičnih sekrezijskih mešičkov je manjša v astrocitech *PS1ΔE9*.** (A) Prepotovana pot (TL) (B), največji odmik na prepotovani poti (MD) (C), indeks usmerjenosti (DI) (D) in povezava med hitrostjo gibanja ANP mešičkov ter njihovo velikostjo v astrocitech divjega tipa (wt; E) in astrocitech *PS1ΔE9* (F). Številke nad stolpci prikazujejo število analiziranih 15-sekundnih obdobj gibanja mešičkov, številke na bazi stolpcev prikazujejo število analiziranih celic. \*\*\* pomeni statistično značilno razliko ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney-jev U-test) glede na mobilnost mešičkov v kontrolnih (wt) celicah. (E-F) Velikost in mobilnost ANP mešičkov sta nepovezani; Pearsonov koeficient linearne korelacije (R) med hitrostjo gibanja in površino ANP mešičkov v kontrolnem (E) in astrocitu *PS1ΔE9* (F) (153 mešičkov); črna črta prikazuje regresijsko daljico, ki je prilagojena na podatke o povprečni hitrosti gibanja in površini posameznih mešičkov.

#### 4.2 SPONTANA MOBILNOST GLUTAMATERGIČNIH SEKRECIJSKIH MEŠIČKOV V PODGANJIH ASTROCITIH DIVJEGA TIPA (wt) IN ASTROCITIH PS1ΔE9

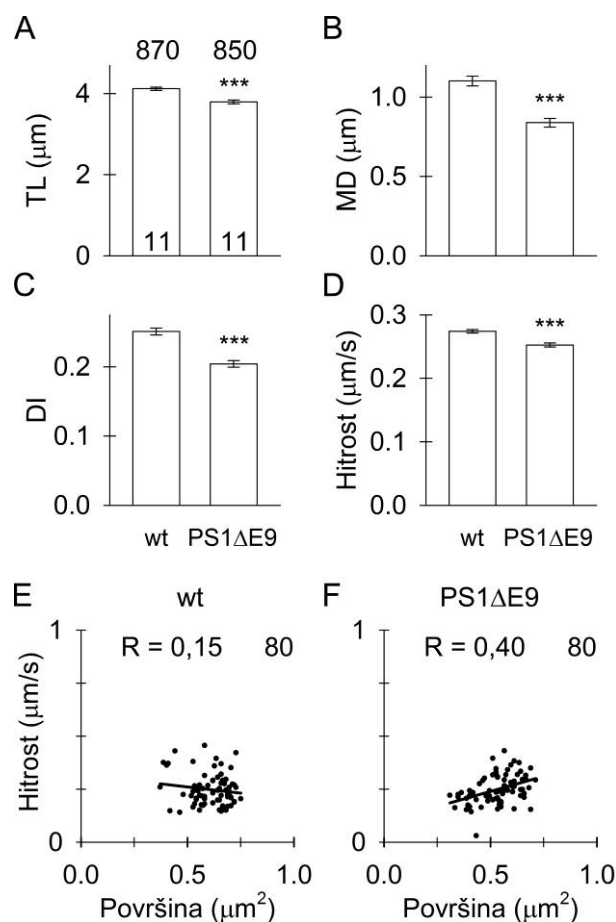
V nadaljevanju smo želeli preveriti vpliv presenilinskega mutanta (*PS1ΔE9*) na spontano mobilnost glutamatergičnih mešičkov v astrocitih. Izvedli smo enojno transfekcijo (Slika 6A) in v celice vnesli plazmid z zapisom za glutamatni prenašalec membrane mešička 1 označen z zelenim fluorescentnim proteinom (VGLUT1-EGFP) ter dvojno transfekcijo (Slika 6B), pri kateri smo v astrocitate sočasno vnesli plazmidno DNA z zapisom za *PS1ΔE9* in VGLUT1-EGFP. Posamezni glutamatergični mešički, pri katerih je VGLUT1-EGFP vsajen v membrano mešička, so bili vidni kot šibko fluorescentne pike v celicah (Sliki 6C, D). V zaporedjih mikrografij smo zato računalniško rekonstruirali poti 20 glutamatergičnih mešičkov v 15-sekundnih obdobjih. Mobilnost glutamatergičnih mešičkov je bila opazno manjša od mobilnosti peptidergičnih mešičkov (primerjajte Sliki 4E, F in Sliki 6E, F). Na prvi pogled so bile rekonstruirane poti glutamatergičnih mešičkov v astrocitu divjega tipa primerljive s potmi v astrocitu PS1ΔE9 (Sliki 6E, F).



**Slika 6: Spontana mobilnost glutamatergičnih sekrecijskih mešičkov v astrocitih divjega tipa (wt) in v astrocitih PS1ΔE9.** (A, B) Presevalna diferencialno kontrastna mikrografija kontrolnega (A) in PS1ΔE9 astrocita (B). (C, D) Konfokalni mikrografiji istih celic (kot v A in B), ki imata glutamatni transporter mešičkov 1 označen z okrepljenim zelenim fluorescentnim proteinom (VGLUT1-EGFP) vsajenim v membrano posameznih sekrecijskih mešičkov (številne šibko fluorescentne pike v mikrografijah). Merilo (A-

D) = 10  $\mu\text{m}$ . (E, F) Prikaz rekonstruiranih poti 20 glutamatergičnih mešičkov v 15-sekundnem obdobju v kontrolnem astrocitu (wt) in v astrocitu PS1 $\Delta$ E9. Razdalje, ki so jih prepotovali VGLUT1 mešički v kontrolnem astrocitu so videti primerljive kot razdalje v astrocitu PS1 $\Delta$ E9.

V nadaljevanju smo nato natančno ovrednotili spontano mobilnost 870 glutamatergičnih mešičkov v astrocitih divjega tipa (N = 11 celic) in 850 mešičkov v astrocitih PS1 $\Delta$ E9 (N = 11 celic). Naši rezultati so razkrili značilno ( $p < 0,001$ ) zmanjšano mobilnost glutamatergičnih mešičkov v astrocitih PS1 $\Delta$ E9; MD je bil manjši za ~24 % (Slika 7B), DI pa za ~20 % (Slika 7C). Nekoliko manj, vendar značilno zmanjšana sta bila tudi TL, za ~8 % (Slika 7A) in hitrost, za ~8 % (Slika 7D) v astrocitih PS1 $\Delta$ E9. Dodatno smo kvantificirali še morebitno povezavo med mobilnostjo (hitrostjo) in površino glutamatergičnih mešičkov ter zaključili, da izmerjena parametra nista povezana med seboj (Sliki 7E, F).

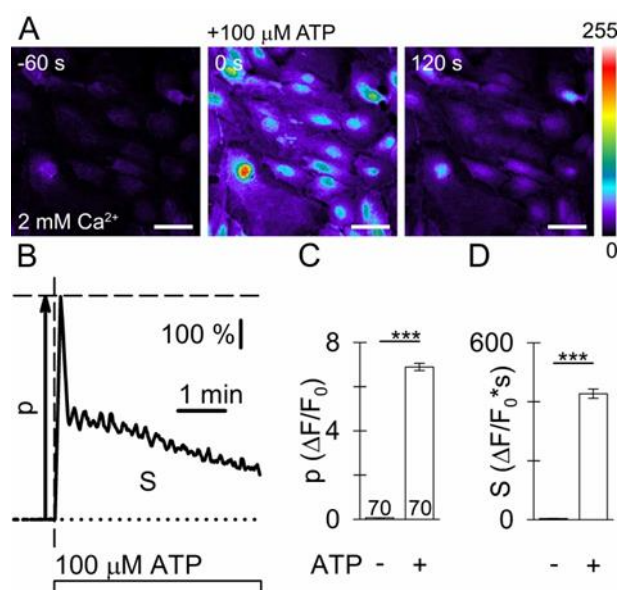


**Slika 7: Spontana mobilnost glutamatergičnih sekrezijskih mešičkov je manjša v astrocitih PS1 $\Delta$ E9.** (A) Prepotovana pot (TL) (B), največji odmik na prepotovani poti (MD) (C), indeks usmerjenosti (DI) (D) in hitrost gibanja VGLUT1 mešičkov v astrocitih divjega tipa (wt) in astrocitih PS1 $\Delta$ E9. Mobilnost glutamatergičnih mešičkov je manjša v astrocitih PS1 $\Delta$ E9. Številke nad stolpci prikazujejo število analiziranih 15-sekundnih obdobj gibanja mešičkov, številke na bazi stolpcev prikazujejo število analiziranih celic. \*\*\* pomeni statistično značilno razliko ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney-jev U-test) glede na mobilnost

mešičkov v kontrolnih (wt) celicah. (E-E) Velikost in mobilnost VGLUT1 mešičkov sta nepovezani; Pearsonov koeficient linearne korelacije (R) med hitrostjo gibanja in površino VGLUT1 mešičkov v kontrolnem (E) in astrocitu PS1ΔE9 (F) (80 mešičkov); črna črta prikazuje regresijsko daljico, ki je prilagojena na podatke o povprečni hitrosti gibanja in površini posameznih mešičkov.

#### 4.3 VPLIV ATP NA ZNOTRAJCELIČNO KONCENTRACIJO KALCIJA ( $[Ca^{2+}]_i$ )

V nalogi smo želeli preveriti tudi spremembo kalcijeve homeostaze zaradi vpliva raztopine ATP na astrocite. Povečanje  $[Ca^{2+}]_i$  zaradi draženja celic z ATP smo okarakterizirali s pomočjo fluorescentnega  $Ca^{2+}$ -indikatorja Fluo-4. Dodatek 100  $\mu$ M ATP celicam je prehodno povečal fluorescenco indikatorja Fluo-4 (Slika 8A; mikrografija na sredini in desno). Z ATP-izzvano bifazično povečanje  $[Ca^{2+}]_i$  je trajalo več minut. Hitremu povečanju aktivnosti kalcija je sledil postopen upad proti bazalni ravni (pikčasta črta) (Slika 8B). Z meritvami relativne maksimalne amplitude (p ( $\Delta F/F_0$ )) in časovnega integrala povečane aktivnosti kalcija (S ( $\Delta F/F_0*s$ )) smo kvantificirali kalcijeve odzive po aplikaciji kontrolne in ATP raztopine na celice; p je bil  $0,06 \pm 0,00 \Delta F/F_0$  (N = 70 celic) v kontrolnih razmerah in  $6,89 \pm 0,16$  (N = 70 celic) po aplikaciji 100  $\mu$ M ATP (Sliki 8C, D). Časovni integral povečane aktivnosti kalcija je bil  $3,76 \pm 0,30 \Delta F/F_0*s$  (N = 70 celic) v kontrolnih razmerah in  $427,33 \pm 15,75 \Delta F/F_0*s$  (N = 70 celic) po aplikaciji 100  $\mu$ M ATP. Aplikacija ATP je izzvala izrazito povečano aktivnost kalcija v astrocitih.



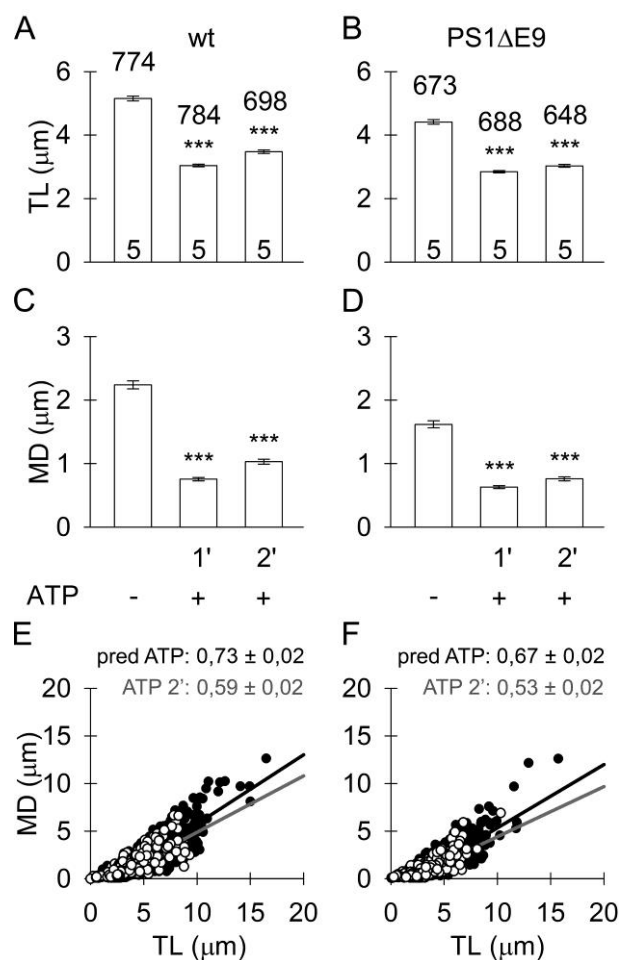
**Slika 8: Ekscitacijsko draženje z ATP poveča  $[Ca^{2+}]_i$  v astrocitih v kulturi.** (A) Konfokalni posnetki fluorescence  $Ca^{2+}$  indikatorja Fluo-4 v astrocitih pred (-60 s) in med aplikacijo 100  $\mu$ M ATP na celice, ki poveča  $[Ca^{2+}]_i$  (0 s ob največji amplitudi kalcijevega odziva in 120 s kasneje). Sprememba  $[Ca^{2+}]_i$  je ponazorjena s psevdobarvno intenzitetno lestvico (desno; 0–255 nivojev fluorescence). Merilo = 50  $\mu$ m. (B) Časovni zapis spremembe fluorescence kalcijevega indikatorja Fluo-4 izzvan s 4-minutno aplikacijo 100  $\mu$ M ATP (bel pravokotnik) na astrocite. Z ATP-izzvan porast  $[Ca^{2+}]_i$  smo kvantificirali z meritvijo relativnega povečanja amplitude fluorescence Fluo-4 nad bazalno raven (pikčasta črta) - p ( $\Delta F/F_0$ ) in z meritvijo časovnega integrala  $[Ca^{2+}]_i$  povečane aktivnosti kalcija - S ( $\Delta F/F_0*s$ , bela ploskev pod zapisom intenzitete

fluorescence). (C) Relativna maksimalna amplituda (sredina  $\pm$  standardna napaka) in (D) časovni integral povečane aktivnosti kalcija po 4-min aplikaciji kontrolne raztopine ali zunajcelične raztopine s 100  $\mu$ M ATP na astrocite. Aplikacija ATP je izzvala izrazito povečano aktivnost kalcija v astrocitih. Številke na bazi stolpcev poročajo število analiziranih celic. \*\*\* pomeni statistično značilno razliko ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney-jev U-test) glede na kalcijev odziv v kontrolnih celicah.

#### 4.4 VPLIV ATP NA MOBILNOST PEPTIDERGIČNIH MEŠIČKOV V PODGANJIH ASTROCITIH DIVJEGA TIPA (wt) IN ASTROCITIH PS1ΔE9

Potokar in sodelavci so v raziskavi leta 2008 dokazali, da se mobilnost recikliranih peptidergičnih mešičkov astrocitov zmanjša po aktivaciji metabotropnih purinskih receptorjev z 1 mM ATP. V naši raziskavi smo zato ugotavljali vpliv spremenjene homeostaze kalcija na mobilnost sekrecijskih peptidergičnih mešičkov pred njihovim vstopom v eksocitotsko aktivnost. Raziskali smo časovno odvisnost spremembe prepotovane poti (TL) in največjega odmika na poti (MD) mešičkov pred in med prvo ter drugo minuto po aplikaciji 100  $\mu$ M ATP na celice. Mobilnosti peptidergičnih mešičkov se je močno zmanjšala v prvi minuti draženja celic z ATP. V celicah divjega tipa se je TL zmanjšal ( $p < 0,001$ ) za 41 % med prvo (784 analiziranih obdobij gibanja mešičkov) (Slika 9A), in nato povečal za 8 % med drugo minuto draženja (698 analiziranih obdobij gibanja mešičkov). V prvi minuti po aplikaciji ATP se je MD zmanjšal ( $p < 0,001$ ) za 66 % (Slika 9C) in nato povečal za 12 % med drugo minuto draženja. V astrocitih PS1ΔE9 smo opazili primerljivo zmanjšanje mobilnosti peptidergičnih mešičkov. TL se je zmanjšal za 36 % v prvi minuti draženja celic ter v drugi minuti povečal za 5 % (Slika 9B). MD se je zmanjšal za 61 % v prvi minuti draženja in v drugi minuti povečal za 8 % (Slika 9D). Te meritve so razkrile od  $Ca^{2+}$ -odvisno uravnavanje mobilnosti peptidergičnih mešičkov in nakazale na manj učinkovito okrevanje mobilnosti mešičkov v astrocitih PS1ΔE9.

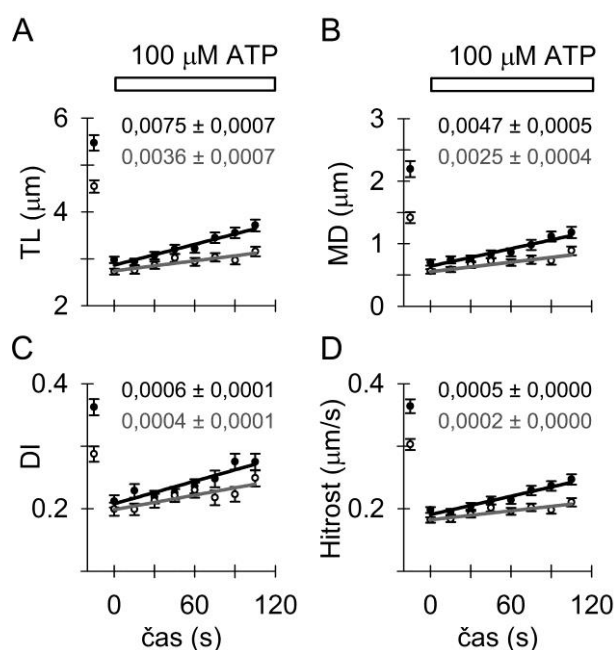
S prilaganjem linearne funkcije tipa [ $MD = MD_0 + a \times (TL)$ ] smo raziskali še povezavo med MD in TL pri gibljivih mešičkih. Naklon funkcije ( $a$ ) ustreza indeksu usmerjenosti (DI). Le-ta je enak 1, če se mešički gibljejo popolnoma usmerjeno. V astrocitih divjega tipa, kot tudi v astrocitih PS1ΔE9 smo opazili izrazito post-stimulacijsko zmanjšanje TL in MD, ki se je odražalo v zmanjšani usmerjenosti gibanja peptidergičnih mešičkov. Med drugo minuto draženja z ATP, se je DI zmanjšal ( $p < 0,001$ ) z  $0,73 \pm 0,02$  na  $0,59 \pm 0,02$  v astrocitih divjega tipa in z  $0,67 \pm 0,02$  na  $0,53 \pm 0,02$  v astrocitih PS1ΔE9 (Sliki 9E, F). Zmanjšanje usmerjene mobilnosti peptidergičnih mešičkov je bilo izrazitejše ( $p < 0,01$ ) v astrocitih PS1ΔE9.



**Slika 9: Z ATP-izzvano zmanjšanje usmerjene mobilnosti peptidergičnih mešičkov je večje v astrocitih PS1ΔE9.** (A–D) Mobilnost peptidergičnih sekrezijskih mešičkov (A, B, TL; C, D, MD; sredina ± standardna napaka) v kontrolnih (wt) in astrocitih PS1ΔE9 pred (-) in med prvo (1') ter drugo minuto (2') po draženju celic s 100 μM ATP. Relativno zmanjšanje mobilnosti ANP mešičkov je bilo večje v astrocitih PS1ΔE9. Številke nad stolpci prikazujejo število analiziranih gibanj mešičkov v 15-sekundnih obdobjih, številke na bazi stolpcev prikazujejo število analiziranih celic. \*\*\* pomeni statistično značilno razliko ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney-jev U-test) glede na spontano mobilnost pred draženjem celic. (E, F) Grafa prikazujeta zvezo med MD in TL (indeks usmerjenosti, DI) za ANP mešičke v astrocitih wt ( $N=5$ ) in astrocitih PS1ΔE9 ( $N=5$ ) pred draženjem (E, F, črni krogi) in med drugo minuto (E, F beli krogi) draženja celic s 100 μM ATP. Na podatke smo prilegli linearno funkcijo tipa  $[MD = MD_0 + a \times (TL)]$  (črna premica, pred draženjem in siva premica, druga minuta po draženju celic z ATP). Naklon linearne funkcije ( $a$ ; sredina ± standardna napaka) ustreza DI (izpisan nad grafom). V astrocitih wt in PS1ΔE9 se je le-ta značilno zmanjšal ( $P < 0,001$ ; ANCOVA) po eskcitacijskem draženju celic z ATP.



V nadaljevanju smo raziskali težnjo po okrevanju mobilnosti peptidergičnih mešičkov med ekscitacijskim draženjem celic z ATP, ki prehodno poveča  $[Ca^{2+}]_i$  (Slika 8). Na podatke mobilnosti (TL, MD, DI in hitrost) izmerjene v 15-sekundnih obdobjih po aplikaciji ATP (0-120 s) smo prilegli linearno funkcijo tipa  $[y=y_0 + a \times (x)]$  in ugotovili naklon (a), ki ponazarja hitrost restavracije izbranega parametra mobilnosti v času (Slika 10A-D). Med draženjem celic se je mobilnost peptidergičnih mešičkov počasneje normalizirala v astrocitih PS1ΔE9; nakloni linearnih funkcij prilagojeni na preiskovane parametre mobilnosti so bili značilno zmanjšani ( $p < 0,001$ ) v primerjavi z astrociti divjega tipa.

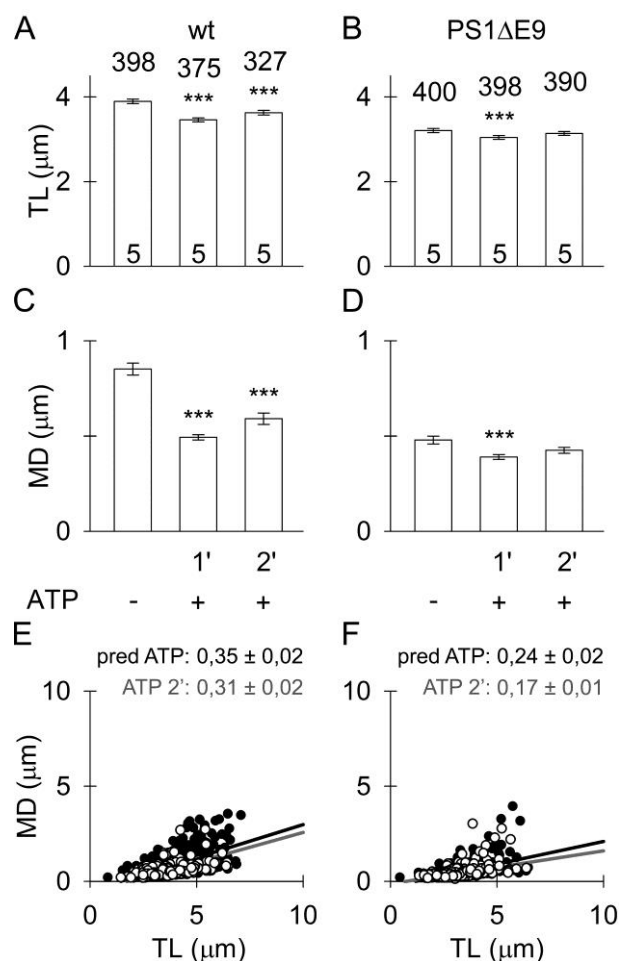


**Slika 10: Restavriranje mobilnosti peptidergičnih mešičkov med draženjem celic z ATP je počasnejše v astrocitih PS1ΔE9.** (A–D) Mobilnost mešičkov (TL (A), MD (B), DI (C) in hitrost (D)) izmerjena v 15-sekundnih obdobjih (sredina ± standardna napaka) pred (-15 s) in po dodatku (0-120 s) raztopine 100 μM ATP na astrocite. Po začetnem in izrazitem zmanjšanju mobilnosti mešičkov, ki je sovpadalo s povečanjem  $[Ca^{2+}]_i$  zaradi aplikacije ATP (začetek draženja: 0 s), se je mobilnost mešičkov deloma restavriral. Težnja po restavraciji mobilnosti mešičkov je bila izrazitejša v astrocitih wt (A–D, črni krogi) kot v astrocitih PS1ΔE9 (A–D, beli krogi). Na podatke mobilnosti smo prilegli linearno funkcijo tipa  $[y=y_0+a \times (x)]$  in ugotovili naklon (a), ki ponazarja hitrost restavracije izbranega parametra mobilnosti v času. Nad grafi (A–D) so izpisani nakloni (a, sredina ± standardna napaka) linearnih funkcij (wt, črna barva in PS1ΔE9, siva barva). Nakloni vseh linearnih funkcij v astrocitih PS1ΔE9 so bili značilno zmanjšani glede na naklone v astrocitih wt ( $P < 0,001$ ; ANCOVA).

#### 4.5 VPLIV ATP NA MOBILNOST GLUTAMATERGIČNIH MEŠIČKOV V PODGANJIH ASTROCITIH DIVJEGA TIPA (wt) IN ASTROCITIH PS1ΔE9

Kot v primeru peptidergičnih mešičkov, je draženje astrocitov z raztopino ATP izzvalo časovno odvisno zmanjšanje mobilnosti glutamatergičnih mešičkov. MD v astrocitih divjega tipa se je zmanjšal ( $p < 0,001$ ) za ~42 % v prvi minuti in za ~31 % v drugi minuti aplikacije 100  $\mu\text{M}$  ATP (Slika 11C). TL se je zmanjšal za ~11 % v prvi in zgolj za ~6 % v drugi minuti aplikacije ATP (Slika 11A) na celice. V astrocitih PS1ΔE9 se je MD v prvi minuti zmanjšal za ~19 %, v drugi minuti pa za ~13 % začetne vrednosti (Slika 11D); TL se je zmanjšal za ~5 % v prvi in zgolj za ~2 % v drugi minuti draženja z ATP (Slika 11A). Draženje astrocitov z raztopino ATP je izzvalo večje zmanjšanje mobilnosti mešičkov VGLUT1 v astrocitih divjega tipa.

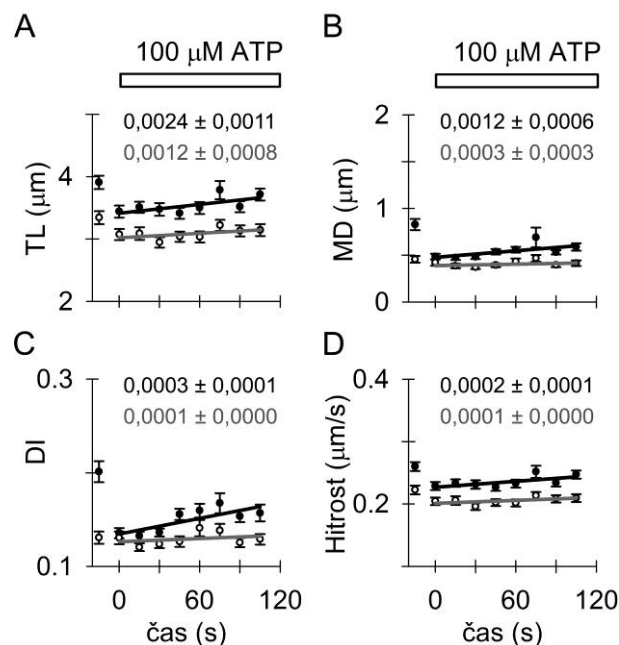
S prilaganjem linearne funkcije tipa [ $\text{MD} = \text{MD}_0 + a \times (\text{TL})$ ] smo proučili povezavo med MD in TL pri gibljivih mešičkih. Do post-stimulacijskega upada TL in MD je prišlo v astrocitih divjega tipa in v astrocitih PS1ΔE9. Med drugo minuto po draženju celic z ATP se je DI zmanjšal ( $p < 0,001$ ) z  $0,35 \pm 0,02$  na  $0,31 \pm 0,02$  v astrocitih divjega tipa in z  $0,24 \pm 0,02$  na  $0,17 \pm 0,01$  v astrocitih PS1ΔE9 (Sliki 11E, F). Zmanjšanje usmerjene mobilnosti glutamatergičnih mešičkov je bilo izrazitejše ( $p < 0,001$ ) v astrocitih PS1ΔE9.



**Slika 11: Z ATP-izzvano zmanjšanje usmerjene mobilnosti glutamatergičnih mešičkov je večje v astrocitih PS1ΔE9.** (A–D) Mobilnost glutamatergičnih sekrezijskih mešičkov (A, B, TL; C, D, MD; sredina ± standardna napaka) v kontrolnih (wt) in astrocitih PS1ΔE9 pred (-) in med prvo (1') ter drugo minuto (2') po eksitacijskem draženju celic s 100 μM ATP. Relativno zmanjšanje mobilnosti VGLUT1 mešičkov je bilo večje v wt astrocitih. Številke nad stolpci prikazujejo število analiziranih gibanj mešičkov v 15-sekundnih obdobjih, številke na bazi stolpcev prikazujejo število analiziranih celic. \*\*\* pomeni statistično značilno razliko ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney-jev *U*-test) glede na spontano mobilnost mešičkov pred draženjem celic. (E, F) Grafa prikazujeta zvezo med MD in TL (indeks usmerjenosti, DI) za VGLUT1 mešičke v wt (N=5) in PS1ΔE9 (N=5) astrocitih pred draženjem (E, F, črni krogi) in med drugo minuto (E, F beli krogi) draženja celic s 100 μM ATP. Na podatke smo prilegli linearno funkcijo tipa  $[MD = MD_0 + a \times (TL)]$  (črna premica, pred draženjem in siva premica, druga minuta po draženju celic z ATP). Naklon linearne funkcije (*a*; sredina ± standardna napaka) ustreza DI (izpisan nad grafom). V wt in astrocitih PS1ΔE9 se je le-ta značilno zmanjšal ( $P < 0,001$ ; ANCOVA) po eskcitacijskem draženju celic z ATP.

V nadaljevanju smo ugotavljali še težnjo po normaliziranju mobilnosti glutamatergičnih mešičkov med draženjem celic tako, da smo na podatke mobilnosti prilegli linearno funkcijo tipa  $[y = y_0 + a \times (x)]$  in ugotovili naklon (*a*), ki ponazarja hitrost restavracije

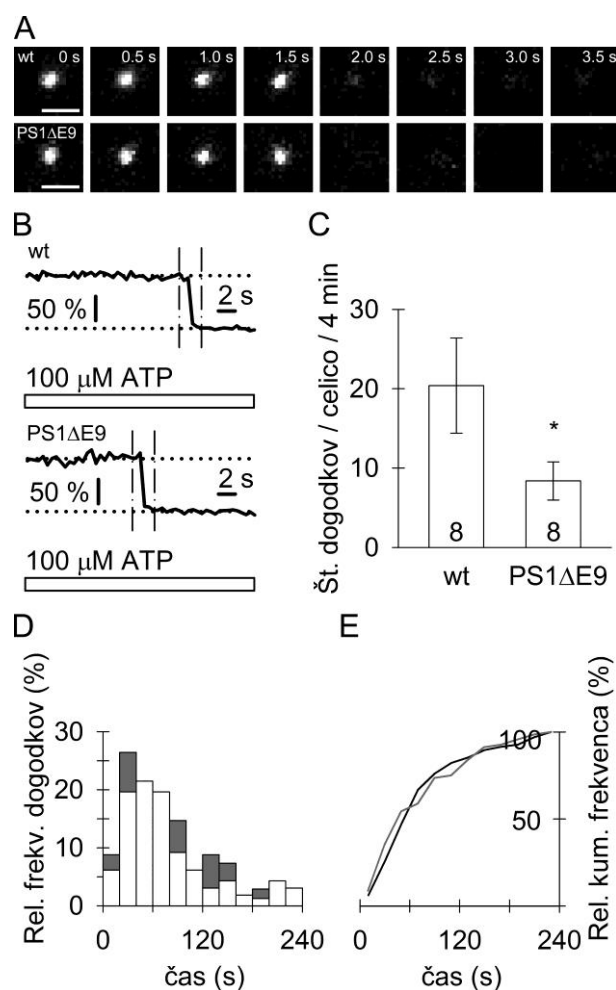
izbranega parametra mobilnosti v času. Po začetnem zmanjšanju mobilnosti mešičkov, ki je sovpadalo s povečanjem  $[Ca^{2+}]_i$  zaradi draženja celic z ATP, se je mobilnost mešičkov deloma restavrirala v naslednjih 2 minutah (Slika 12A-D). Težnja po restavriranju mobilnosti glutamatergičnih mešičkov je bila izrazitejša v astrocitih divjega tipa kot v astrocitih PS1ΔE9 (MD in DI,  $p < 0,001$ ).



**Slika 12: Restavriranje mobilnosti glutamatergičnih mešičkov med draženjem celic z ATP je počasnejše v astrocitih PS1ΔE9.** (A–D) Mobilnost mešičkov (TL (A), MD (B), DI (C) in hitrost (D)) izmerjena v 15-sekundnih obdobjih pred (-15 s) in po dodatku (0-120 s) raztopine 100 μM ATP na astroците. Po začetnem zmanjšanju mobilnosti mešičkov, ki je sovpadalo s povečanjem  $[Ca^{2+}]_i$  zaradi aplikacije ATP (začetek draženja: 0 s), se je mobilnost mešičkov deloma restavrirala. Težnja po restavraciji mobilnosti mešičkov je bila izrazitejša v astrocitih wt (A–D, črni krogi) kot v astrocitih PS1ΔE9 (A–D, beli krogi). Na podatke mobilnosti smo prilegli linearno funkcijo tipa  $[y=y_0+a \times (x)]$  in ugotovili naklon (a), ki ponazarja hitrost restavracije izbranega parametra mobilnosti v času. Nad grafi (A–D) so izpisani nakloni (a, sredina ± standardna napaka) linearnih funkcij (wt, črna barva in PS1ΔE9, siva barva). Nakloni linearnih funkcij prilagojeni na MD in DI v astrocitih PS1ΔE9 so bili značilno zmanjšani glede na naklone v astrocitih wt ( $P < 0,001$ ; ANCOVA).

#### 4.6 VPLIV ATP NA IZZVANO EKSO-CITOTSKO IZLOČANJE VSEBINE PEPTIDERGIČNIH MEŠIČKOV

Kržan in sod. (2003) so prvi pokazali uravnvano sekrecijo ANP.emd iz posameznih eksocitotskih mešičkov, ki je bila izzvana s povečanjem  $[Ca^{2+}]_i$  v astrocitih. V nadaljevanju smo zato raziskali vpliv sekretagoga ATP na uravnvano eksocitotsko izločanje fluorescentne vsebine iz peptidergičnih mešičkov v astrocitih divjega tipa in astrocitih PS1ΔE9. Zaporedje konfokalnih mikrografij prikazuje posamezen peptidergični mešiček v astrocitu divjega tipa (zgoraj) in astrocitu PS1ΔE9 (spodaj) med eksocitotskim izločanjem fluorescentne vsebine (fuzijska beljakovina ANP.emd) zaradi draženja celic s 100 μM ATP (Slika 13A). Izlitje fluorescentne vsebine (ANP.emd) mešička je vidno kot nenadno zmanjšanje fluorescence mešička, ki nakazuje na popolno izločanje vsebine iz njegove svetline (Stenovc in sod., 2004). Zaporedje mikrografij prikazuje podoben časovni potek izločanja vsebine pri astrocitu divjega tipa in astrocitu PS1ΔE9 (Slika 13B). Meritve časa, ki je potreben za zmanjšanje fluorescence mešička iz 80–20 % največje intenzitete fluorescence ( $\tau_{20-80\%}$ ) so razkrile zelo podoben časovni potek izločanja fluorescentne vsebine iz mešičkov;  $0,53 \pm 0,02$  s v astrocitih divjega tipa in  $0,51 \pm 0,03$  s v astrocitih PS1ΔE9 (ni prikazano;  $p=0,516$ ). Hitro zmanjšanje fluorescence ANP.emd ( $\sim 0,5$  s) nakazuje na hitro izločanje fluorescentne vsebine (Slika 13B), ki je indikativno za popolno zlitje membrane mešička s plazmalemo (Vardjan in sod., 2009). Navkljub podobnemu časovnemu poteku izločanja peptidov iz mešičkov, je bilo število z ATP-izzvanih sekrecijskih dogodkov v 4 minutnem obdobju manjše ( $p<0,05$ ) v astrocitih PS1ΔE9;  $8 \pm 2$  (N = 8 celic) kot v astrocitih divjega tipa;  $20 \pm 6$  (N = 8 celic) (Slika 13C). Relativna frekvenčna porazdelitev (Slika 13D) in relativna kumulativna frekvenčna porazdelitev (Slika 13E) sta razkrili podoben časovni profil z ATP-izzvanih sekrecijskih dogodkov v astrocitih divjega tipa in astrocitih PS1ΔE9. Število dogodkov izzvane sekrecije je bilo pogostejše v prvem kot v drugem dvo-minutnem obdobju draženja celic z ATP (Slika 13D), t.j. v obdobju, ko je aktivnost kalcija v celici bolj povečana (Slika 8).



**Slika 13: Število z ATP-izzvanih eksocitotskih dogodkov sekrecije peptidov je manjše v astrocitih PS1ΔE9.** (A, B) Zaporedje konfokalnih mikrografij prikazuje posamezen peptidgerični mešiček v astrocitu wt (zgoraj) in astrocitu PS1ΔE9 (spodaj) med izločanjem fluorescentne vsebine (fuzijska beljakovina ANP.emd) zaradi draženja celic s 100 μM ATP. Hitro zmanjšanje fluorescence ANP.emd (~0,5 s) nakazuje hitro izločanje fluorescentne vsebine, ki je indikativno za popolno zlitje membrane mešička s plazmalemo; čas v desnem zgornjem kotu mikrografij je izmerjen glede na arbitrarno izhodišče (0 s). Merilo = 0,5 μm. (B) Normalizirani časovni potek spremembe fluorescence mešičkov (iz A). Pikčasti črti prikazujeta največjo (zgoraj) in najmanjšo (spodaj) intenziteto fluorescence mešičkov. Vertikalni prekinjeni črti zamejujeta fluorescenco mešičkov v obdobju, ki je prikazano na mikrografijah v A. Čas draženja celic s 100 μM ATP je ponazorjen z belim pravokotnikom. (C) Število z ATP-izzvanih sekrecijskih dogodkov je manjše v astrocitih PS1ΔE9. \*P<0,05 glede na astrocite wt (Mann-Whitney-jev *U*-test). (D) Frekvenčna porazdelitev z ATP-izzvanih sekrecijskih dogodkov v astrocitih wt (beli stolpci) in astrocitih PS1ΔE9 (sivi stolpci) ter (E) kumulativna frekvenčna porazdelitev sekrecijskih dogodkov (wt, črna krivulja in PS1ΔE9, siva krivulja) razkrivata podoben časovni profil z ATP-izzvane sekrecije peptidov iz astrocitov wt in astrocitov PS1ΔE9; več dogodkov izzvane sekrecije lahko opazimo v prvem kot v drugem dvo-minutnem obdobju aplikacije ATP.

## 5 RAZPRAVA

Celice astroglije so ključne homeostatske celice v CŽS, ki so vpletene v nastanek mnogih nevrodegenerativnih boleznih (Giaume in sod., 2007). Alzheimerjeva bolezen (AB) je napredujoča nevrodegenerativna bolezen, ki prizadene umske in spominske zmogljivosti človeka; je najpogostejši vzrok demence pri starostnikih (Braak in sod., 1999). Ključni histopatološki znaki v možganovini bolnikov z AB so senilne lehe, neurofibrilarne pentlje, spremembe sinaps, vnetne spremembe in propad nevronov (Palop in Mucke, 2010; Sheng in sod., 2012). Najzgodnejša celična patologija, ki jo povezujejo z izgubo kognitivnih sposobnosti pri AB, je izguba številnih sinaps (Mucke in Selkoe, 2012; Terry, 2000); le-ta je lahko posledica disfunkcije astrocitov, ki so ključnega pomena za vzdrževanje delovanja sinaps in homeostazo ionov ter izločanje prenašalcev glije (Grolla in sod., 2013). V nalogi smo zato raziskali vpliv mutacije gena za PS1 (*PS1ΔE9*) na mobilnost in izzvano sekrecijsko aktivnost peptidergičnih ter na mobilnost glutamatergičnih mešičkov astrocitov v kulturi.

V splošnem je bila spontana mobilnost (TL, MD, DI in hitrost) peptidergičnih mešičkov manjša v astrocitih *PS1ΔE9*; TL za ~8 %, MD za ~18 %, DI za ~14 % in hitrost za ~8 % glede na astrocite divjega tipa (Slike 4A-D). Podobno manjša je bila tudi spontana mobilnost glutamatergičnih mešičkov v astrocitih *PS1ΔE9*; TL za ~8 %, MD za ~24 %, DI za ~19 % in hitrost za ~8 % glede na astrocite divjega tipa (Slike 7A-D). Tako naše kot druge meritve kažejo, da so peptidergični in glutamatergični mešički astrocitov membranski predelki s heterogeno velikostjo (Guček in sod., 2016) in mobilnostjo (Potokar in sod., 2005; Trkov in sod., 2012, naše delo). Hitrost premikov peptidergičnih mešičkov v kontrolnih astrocitih je bila za ~1/4 večja od hitrosti premikov glutamatergičnih mešičkov (razpon 0,04-1,22  $\mu\text{m/s}$  vs. 0,06-0,66  $\mu\text{m/s}$ ; ANP.emd vs. VGLUT1-EGFP). Tako peptidergični kot glutamatergični mešički astrocitov so bili počasnejši od mešičkov v nevronih, ki potujejo s hitrostjo v razponu od 0,8-3,5  $\mu\text{m/s}$  (Grafstein in Forman, 1980). Velikost peptidergičnih in glutamatergičnih mešičkov astrocitov ni bila korelirana z njihovo mobilnostjo (Slike 5E, F in Slike 7E, F), kar kaže, da velikost mešičkov ne vpliva na učinkovitost dostave sekrecijskih mešičkov do tarčnih mest v celici in na plazmalemi astrocitov. V astrocitih *PS1ΔE9* smo izmerili manjšo povprečno hitrost peptidergičnih (0,35 vs 0,32  $\mu\text{m/s}$ ; wt vs *PS1ΔE9*; Slike 5A-D) in glutamatergičnih mešičkov (0,27 vs 0,25  $\mu\text{m/s}$ ; wt vs *PS1ΔE9*; Slike 7A-D). Čeprav so natančni mehanicistični razlogi za zmanjšano mobilnost mešičkov v astrocitih *PS1ΔE9* nejasni, lahko vključujejo: (a) spremenjeno 3D strukturo citoskeleta (Ebnet in sod., 1998; Yeh in sod., 2011), posebno mikrotubulov, ki delujejo kot tiri (Stenovec in sod., 2014) za transport celičnih organelov s pomočjo molekulskih motorjev (Ebnet in sod., 1998); (b) spremenjeno homeostazo citosolnega kalcija v AB (Abramov in sod., 2004; Lim in sod., 2014); (c) spremenjeno mitohondrijsko proizvodnjo ATP (Ebnet in sod., 1998); ali (d) spremenjeno ATP-azno aktivnost molekulskih motorjev, ki prenašajo mešičke vzdolž elementov citoskeleta (Soldati in Schliwa, 2006). Zmanjšanje povprečne hitrosti

peptidergičnih in glutamatergičnih mešičkov v astrocitih *PS1ΔE9* lahko kaže na večje število obdobji mirovanja mešičkov ob elementih citoskeleta ali na manj učinkovit vlek mešičkov zaradi procesivne hoje molekulskih motorjev (tipično več  $\mu\text{m}$  brez disociacije od tira). Hiter in usmerjen transport sekrecijskih mešičkov na dolgih razdaljah omogočajo kinezini in dineini, ki »korakajo« po mikrotubulah (Goldstein in Yang, 2000). Z *FAB*-povezane mutacije *PS1* zmanjšajo učinkovitost hoje motornih proteinov vzdolž citoskeleta (Pigino in sod., 2001). Izguba funkcije *PS1* poveča aktivnost glikogen-sintazne kinaze  $3\beta$  (*GSK3\beta*), ki fosforilira kinezin in zmanjša njegovo vezavo na mešičke (Gunawardena in sod., 2013; Pigino in sod., 2003). *In vivo*, *GSK3\beta* fosforilira lahki verigi kinezina in povzroči njegovo sprostitev z membranskih organelov; slednje vodi v zmanjšanje od kinezina-1-odvisne mobilnosti mešičkov (Morfini in sod., 2002). Mutirani *PS1* lahko spremeni funkcijo nevronov tako, da vpliva na aktivnost *GSK3\beta* in od kinezina-1-odvisno mobilnost mešičkov do mesta dostave in pritrjanja na plazmalemo (Pigino in sod., 2003). Fosforilacija citoplazemskega dineina v hepatocitih prav tako spremeni ATP-azno aktivnost dineina in zmanjša njegovo zmožnost za pritrjanje membranskega tovora na mikrotubule (Runnegar in sod., 1999). Zmanjšana učinkovitost dineina se kaže kot zmanjšana ATP-azna aktivnost, ki je ključna za generiranje sile, sproščene iz hidrolize ATP in je potrebna za transport tovora vzdolž mikrotubulov. V splošnem se zdi, da je zmanjšani transport mešičkov v astrocitih *PS1ΔE9* lahko posledica spremenjene aktivnosti motornih proteinov zaradi njihove fosforilacije z *GSK3\beta* (Wang in sod., 2013). Zmanjšana mobilnost mešičkov v astrocitih *PS1ΔE9* lahko odraža tudi okrnjeno strukturo citoskeleta, ki omogoča usmerjene premike (Soldati in Schliwa, 2006) in transport mešičkov na mikrometrskih razdaljah (Potokar in sod., 2008).

V nadaljevanju smo raziskali vpliv sekretagoga ATP na mobilnost peptidergičnih in glutamatergičnih mešičkov. ATP aktivira ionotropne in metabotropne purinske receptorje v plazmalemi astrocitov ter mobilizira  $\text{Ca}^{2+}$  v citosol celic (Verkhatsky in Burnstock, 2014). Z ATP-izzvan kalcijev odziv je dinamičen pojav z različno amplitudo, kinetiko in frekvenco; odvisen je od koncentracije ATP in od vzorca draženja (Perea in Araque, 2005; Pasti in sod., 1997). Z meritvami sprememb fluorescence  $\text{Ca}^{2+}$  indikatorja Fluo-4 pred in med draženjem astrocitov z ATP (Slika 8A) smo potrdili prehodno povečanje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  z bifazičnim potekom (Malarkey in sod., 2008); hitremu povečanju  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  je sledilo postopno zmanjševanje do bazalne ravni ( $\sim 100$  nM) (Sliki 8A, B). Da bi podrobneje ocenili vpliv povečane aktivnosti kalcija na mobilnost sekrecijskih mešičkov v astrocitih wt in *PS1ΔE9*, smo primerjali njihovo mobilnost pred aplikacijo in med prvo ter drugo minuto po dodatku ATP celicam. Mobilnost obeh tipov sekrecijskih mešičkov se je zmanjšala po draženju astrocitov z ATP (Sliki 9 in 11). Naklon linearne funkcije na Sliki 9 (E, F) in Sliki 11 (E, F) odraža korelacijo med prepotovano potjo (TL) in največjim odmikom na poti (MD) pred in med draženjem celic z ATP ter ustreza indeksu usmerjenosti mešičkov (DI; 0, neusmerjeni, difuzno gibljivi mešički in 1, usmerjeni, linearno gibljivi mešički). V splošnem so kazali peptidergični mešički precejšnjo



usmerjenost, naklon linearne funkcije v astrocitih wt je bil  $0,73 \pm 0,02$  pred aplikacijo ATP, in je upadel na  $0,59 \pm 0,02$  med drugo minuto draženja. Podobno je upadel tudi naklon linearne funkcije v astrocitih PS1ΔE9; iz  $0,67 \pm 0,02$  na  $0,53 \pm 0,02$ . Glutamatergični mešički (Sliki 11 E, F) so potovali manj usmerjeno kot peptidergični mešički; naklon funkcije pred draženjem astrocitov wt je bil  $0,35 \pm 0,02$  in je upadel na  $0,31 \pm 0,02$  med drugo minuto draženja. V astrocitih PS1ΔE9 se je naklon funkcije zmanjšal iz  $0,24 \pm 0,02$  pred aplikacijo na  $0,17 \pm 0,01$  v drugi minuti po aplikaciji ATP.

V spontanah razmerah je bila usmerjena mobilnost sekrecijskih mešičkov manjša v astrocitih PS1ΔE9. Z ATP izzvano nadaljnje zmanjšanje usmerjene mobilnosti mešičkov lahko pojasnimo z začasno ločbo mešičkov od citoskeleta; po ločbi od tirov citoskeleta se le-ti premikajo zaradi Brownovega gibanja v citosolu (Stenovec in sod., 2016). Zmanjšana mobilnost mešičkov po aplikaciji ATP je lahko tudi posledica vpliva povečane  $[Ca^{2+}]_i$  na strukturno integriteto citoskeleta, še posebno na mikrotubule in/ali aktinske filamente, vzdolž katerih molekularni motorji prenašajo mešičke (Goldstein in Yang, 2000; Soldati in Schliwa, 2006).  $Ca^{2+}$  služi kot endogeni regulator proteina CDR (*angl.* » $Ca^{2+}$ -dependent regulator protein«), ki skrbi za prestrukturiranje mikrotubulov (Marcum in sod., 1978). Omrežje mikrotubulov je stabilno pri  $[Ca^{2+}]_i < 1 \mu M$ , povečana  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $>1-4 \mu M$  lahko poruši mikrotubulsko omrežje (Schliwa in sod., 1981). Presenilini interagirajo z mikrotubuli in mikrofilamenti (Pigino in sod., 2001), vključno s proteinom tau, ki je povezan z mikrotubuli (Takashima in sod., 1998) in proteinom filaminom, ki je povezan z aktinskimi filamenti (Zhang in sod., 1998). FAB mutacije v PS1 in motena homeostaza  $Ca^{2+}$  v astrocitih lahko vplivajo tudi na znotrajcelične in medcelične signalne poti, vključno s procesiranjem APP in odstranjevanjem A $\beta$  (Mattson, 2004); povzročita lahko destabilizacijo citoskeletnega omrežja in posledično motnje v transportu sekrecijskih mešičkov (Pigino in sod., 2001). Spremenjena kalcijeva signalizacija in posledična toksičnost glutamata (Mattson, 2004; Mattson in Chan, 2003) lahko dolgoročno povzročita patološke spremembe, značilne za AB (Stenovec in sod., 2016).

Z raziskavami vpliva ekscitacijskega draženja na mobilnost mešičkov smo ugotovili, da se mobilnost po začetnem in izrazitem zmanjšanju, ki sovпада s povečanjem  $[Ca^{2+}]_i$ , deloma normalizira (Slika 10 in Slika 12). Normalizacija mobilnosti je skladna s postopnim zmanjševanjem  $[Ca^{2+}]_i$  proti bazalni ravni (Slika 8B). V drugi minuti draženja celic z ATP, se je mobilnost mešičkov (TL, MD, DI in hitrost) le deloma povrnila na raven pred draženjem celic. Težnja po normalizaciji mobilnosti mešičkov je bila večja v astrocitih divjega tipa in manjša v astrocitih PS1ΔE9. PS1 kot holoproteini pomembno vplivajo na homeostazo kalcija (McBrayer in Nixon, 2013). O povečanem sproščanju  $Ca^{2+}$  iz ER skozi IP $_3$  receptorje so poročali že Ito in sod. (1994), kar so potrdile tudi poznejše raziskave na drugih celičnih linijah (Stutzmann in sod., 2004; Guo in sod., 1996; Chan in sod., 2000). V novejših raziskavah so povečano puščanje  $Ca^{2+}$  označili za pridobljeno funkcijo mutacije PS1, zaradi katere lahko pride do močnejše aktivacije IP $_3$  receptorjev (Cheung in sod., 2010) in povečane ekspresije rianodinskih receptorjev (Stutzmann in sod., 2006).

Holoproteini PS1 so tudi pasivni kalcijevi kanali v membranah ER; nekatere mutacije v PS1 onemogočijo puščanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz ER, kar vodi v prebitek  $\text{Ca}^{2+}$  znotraj ER in povečano aktivacijo  $\text{IP}_3$  receptorjev ter povečanje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Tu in sod., 2006; Supnet in sod., 2011). Povečana  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lahko aktivira kalpain 1 in kalpain 2, močno izraženi proteazi v CZS (Goll in sod., 2003), ki cepita citoskeletne proteine, transkripcijske faktorje in proteine vpletene v signalno transdukcijo ter sinapsah (Ferreira, 2012). V sinapsah so odgovorni za vzdrževanje od  $\text{Ca}^{2+}$ -odvisnih funkcij, kot so sproščanje živčnih prenašalcev, sinaptično plastičnost, transport veziklov in strukturno stabilnost (Wu in Lynch, 2006). Prekomerna aktivacija kalpainov ima lahko usodne posledice za celico, saj privede do patološke aktivacije GSK3 $\beta$  (Goni-Oliver in sod., 2007) in hiperfosforilacije proteina tau ter nastanka nevrofibrilarnih pentelj (McBrayer in Nixon, 2013). Kalpains lahko cepijo tudi  $\text{IP}_3$  receptorje in jih trajno aktivirajo; vse to lahko moti homeostazo  $\text{Ca}^{2+}$  in pripomore k nastanku FAB (Kopil in sod., 2011). V astrocitih z izraženim mutantom PS1, ki je *a priori* okvarjena sodelujoča komponenta citoskeleta, smo tako ugotovili zmanjšano usmerjeno mobilnost mešičkov glede na astrocite divjega tipa.

Povečana  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  v astrocitih sproži sekrecijo fluorescentnih peptidov (ANP.emd) iz nekaterih peptidergičnih mešičkov (Kržan in sod., 2003). Naše meritve izzvane sekrecijske aktivnost peptidergičnih mešičkov (Slika 13) so skladne z elektrofiziološkimi meritvami Krefta in sod. (2004), ki so pokazali, da povečanje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  izzove povečanje kapacitivnost membrane astrocita zaradi zlivanja številnih mešičkov s plazmalemo. Z uravnavano eksocitozo se verjetno sproščajo tudi drugi kemični prenašalci astrocitov (Kržan in sod., 2003; Bezzi in sod., 2004; Zhang in sod., 2004), ne le glutamat (Parpura in sod., 1995). Kinetika uravnane eksocitoze v astrocitih je za ~dva velikostna razreda počasnejša v primerjavi z nevroni (Kreft in sod., 2004). Mehanicistični razlogi za to razliko še niso pojasnjeni; vključujejo lahko počasnejšo dostavo sekrecijskih mešičkov do plazmaleme in/ali različne mehanizme zlivanja mešičkov s plazmalemo; astrocitni mešički na površini ne izražajo sinaptotagmina I, ki je  $\text{Ca}^{2+}$  senzor odgovoren za hiter sinaptični prenos v nevronih (Geppert in sod., 1994). Mobilnost astrocitnih mešičkov na daljših razdaljah (več  $\mu\text{m}$ ) proti mestom zlitja na plazmalemi, je zelo uravnavana in odvisna od dinamike elementov citoskeleta (Kreft in sod., 2016).

Uravnavano eksocitozo v astrocitih prožijo sekretagogi, ki povečajo  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Burgoyne in Morgan, 1995; Calakos in Scheller, 1996). Za eksocitozo peptidergičnih mešičkov je značilno prehodno zlivanje tipa »poljub in pobeg« (angl. »kiss-and-run«), eksitacijsko draženje celic poveča frekvenco fuzijskih/sekrecijskih dogodkov (Stenovc in sod., 2004; Vardjan in sod., 2007). Z ATP-izzvano povečanje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  v astrocitih (Slika 8B) je izzvalo nenadne spremembe intenzitete fluorescence eksocitotsko aktivnih peptidergičnih mešičkov, ki nakazujejo na izločanje fluorescentne vsebine (Slika 13A, B). Število z ATP-izzvanih dogodkov sekrecije je bilo večje v prvi in manjše v drugi minuti draženja astrocitov z ATP (Sliki 13D, E), kar sovпада s povečano aktivnostjo  $\text{Ca}^{2+}$  v prvi minuti draženja celic (Slika 8A). Število z ATP-izzvanih sekrecijskih dogodkov je bilo manjše v

astrocitih *PS1ΔE9* (Slika 13C). Tudi sinaptična aktivnost lahko povzroči povečanje  $[Ca^{2+}]_i$  v astrocitih in nato sproščanje ANP iz sekrecijskih mešičkov za uravnavanje krvnega pretoka (vazodilatacije) v možganih (Kržan in sod., 2003). Povzamemo lahko, da izločanje ANP poteka z uravnvano (od  $Ca^{2+}$ -odvisno) eksocitozo (Kržan in sod., 2003). Z ATP-izzvano izločanje fluorescentne vsebine iz posameznega mešička je hitro; poteče v  $\sim 0.5$  s (Slika 13B) in je skladno s predhodnimi ugotovitvami o hitri sekreciji peptidnih prenašalcev glije (Trkov in sod. 2012; Stenovec in sod., 2016). Nemotena in učinkovita dostava mešičkov do mest sekrecije zahteva celovit sistem citoskeletnega omrežja; mikrotubule, aktinske filamente in tudi intermediarne filamente (Potokar in sod., 2007). Mutacije v *PS1* lahko destabilizirajo tirnice citoskeleta in onemogočijo učinkovit transport sekrecijskih mešičkov do tarčnih mest na plazmalemi (Pigino in sod., 2001). Na podlagi teh meritev lahko zaključimo, da z ATP-izzvano povečanje  $[Ca^{2+}]_i$  potencialno vpliva tudi na spremembo strukture citoskeletnega omrežja.

V našem delu smo prvič pokazali, da izražanje mutiranega *PS1ΔE9* v astrocitih v kulturi zmanjša mobilnost peptidergičnih in glutamatergičnih sekrecijskih mešičkov ter od  $Ca^{2+}$ -odvisno sekrecijo peptidnih prenašalcev glije; ugotovljene motnje lahko dolgoročno prispevajo k nastanku FAB.

## 6 SKLEPI

V nalogi smo ugotavljali vpliv izražanja mutanta *PS1ΔE9* na učinkovitost znotrajceličnega transporta sekrecijskih mešičkov v mirovanju in po draženju celic z ATP ter na jakost izzvane sekrecije peptidov iz posameznih mešičkov astrocitov podgane v kulturi. Astroците smo transfecirali s plazmidno DNA z zapisom za PS1ΔE9 in ANP.emd ali VGLUT1-EGFP ter v realnem času s konfokalnim mikroskopom opazovali premike mešičkov in izločanje njihove vsebine.

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo:

- Peptidergični in glutamatergični sekrecijski mešički astrocitov so različno mobilni membranski predelki. Peptidergični mešički so bolj mobilni od glutamatergičnih mešičkov.
- Oba tipa sekrecijskih mešičkov kažeta usmerjene in neusmerjene premike. Poti usmerjenih mešičkov so podolgovate, poti neusmerjenih mešičkov so »točkaste«. Usmerjeni mešički se aktivno premikajo vzdolž elementov citoskeleta, neusmerjeni pasivno s prosto difuzijo.
- Velikost peptidergičnih in glutamatergičnih mešičkov ne vpliva na njihovo mobilnost.
- Ekspresija mutiranega presenilina 1 (*PS1ΔE9*) v astrocitih zmanjša spontano mobilnost peptidergičnih in glutamatergičnih mešičkov.
- Draženje astrocitov z ATP prehodno poveča  $[Ca^{2+}]_i$ ; hitremu in strmemu povečanju  $[Ca^{2+}]_i$  sledi postopno zmanjševanje do bazalne ravni (~100 nM).
- Z ATP-izzvano povečanje  $[Ca^{2+}]_i$  sovpada z zmanjšanjem usmerjene mobilnosti peptidergičnih in glutamatergičnih mešičkov; mobilnost mešičkov se na daljši rok deloma normalizira. Z ATP-izzvano zmanjšanje usmerjene mobilnosti mešičkov je izrazitejše v astrocitih PS1ΔE9. Težnja po normaliziranju mobilnosti mešičkov je manjša v astrocitih PS1ΔE9.
- Sproščanje sekrecijskih peptidov (ANP) iz astrocitov poteka z od  $Ca^{2+}$ -odvisno eksocitozo. Število z ATP-izzvanih dogodkov sekrecije peptidov je manjše v astrocitih PS1ΔE9, verjetno zaradi manj učinkovite dostave mešičkov do tarčnih mest na plazmalemi.

## 7 POVZETEK

Astroцитi so heterogene celice glije, ki zagotavljajo presnovno in trofično podporo nevronom. Motnje in/ali odpoved funkcije astrocitov lahko vodijo do nastanka nevrodegenerativnih bolezni, kot je Alzheimerjeva bolezen (AB), za katero je značilen propad nevronov v časovnem obdobju več let. Pri familiarni obliki AB so našli mutirane gene za preseniline (PS), ki spremenijo procesiranje APP in kalcijevo signalizacijo celic. V našem delu smo zato raziskali vpliv mutiranega PS1 (*PS1ΔE9*) na učinkovitost znotrajceličnega transporta sekrecijskih mešičkov in jakost izzvanega sekrecijskega odziva astrocitov podgane v kulturi. Nekatere astroците smo dvojno transfecirali s plazmidom za *PS1ΔE9* in ANP.emd ter preiskovana procesa primerjali z enojno transfeciranimi astroцитi, ki so poleg endogenega PS1 izrazili le fluorescentni označevalec peptidergičnih mešičkov. Druge astroците smo dvojno transfecirali s plazmidom za *PS1ΔE9* in VGLUT1-EGFP ter mobilnost fluorescentnih glutamatergičnih mešičkov primerjali z enojno transfeciranimi astroцитi. V časovnih sekvencah konfokalnih mikrografij smo izmerili spontano in z ATP-izzvano mobilnost fluorescentnih mešičkov ter kvantificirali delež sekrecijsko aktivnih mešičkov in ovrednotili dinamiko izločanja njihove vsebine.

Spontana mobilnost peptidergičnih in glutamatergičnih mešičkov v astroцитih *PS1ΔE9* je bila manjša v primerjavi z astroцитi divjega tipa, kar je lahko posledica spremenjene aktivnosti motornih proteinov in/ali okrnjene strukturne integritete citoskeleta v astroцитih *PS1ΔE9*. Spontana mobilnost sekrecijskih mešičkov ni bila povezana z njihovo velikostjo. Aplikacija ATP na astroците je prehodno mobilizirala  $Ca^{2+}$  v citosol celic; hitro in močno povečanje  $[Ca^{2+}]_i$  je sovpadalo z zmanjšanjem mobilnosti peptidergičnih in glutamatergičnih mešičkov. Z ATP-izzvano zmanjšanje usmerjene mobilnosti mešičkov je bilo izrazitejše v astroцитih *PS1ΔE9*. Mobilnost mešičkov se je deloma restavriral po ekscitacijskem draženju celic; težnja po restavriranju mobilnosti mešičkov je bila manjša v astroцитih *PS1ΔE9*.

Ekscitacijsko draženje astrocitov je izzvalo nenadno zmanjšanje fluorescence peptidergičnih mešičkov, ki kaže na popolno zlitje membrane mešičkov s plazmalemo in hitro izločanje njihove vsebine; v ~0,5 s. Dinamika izločanja vsebine iz posameznih mešičkov je bila podobna v *PS1ΔE9* in astroцитih divjega tipa. Sekrecijski dogodki so bili pogostejši v prvi kot v drugi minuti draženja celic z ATP, kar sovпада s povečano aktivnostjo znotrajceličnega kalcija v prvi minuti draženja celic. Število sekrecijskih dogodkov je bilo manjše v astroцитih *PS1ΔE9*, verjetno zaradi okrnjenega transporta sekrecijskih mešičkov vzdolž elementov citoskeleta do tarčnih mest na plazmalemi.

Zaključujemo, da mutant *PS1ΔE9*, ki deluje kot bolj prepustni kalcijev kanal v membrani ER, poveča  $[Ca^{2+}]_i$  in potencialno zmanjša aktivnost molekularnih motorjev ali vpliva na strukturno integriteto citoskeletnega omrežja, ob katerem poteka hiter in učinkovit transport sekrecijskih mešičkov do mest zlivanja na plazmalemi astrocitov.

## 8 VIRI

- Abbott N. J., Ronnback L., Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 41-53
- Abramov A. Y., Canevari L., Duchen M. R. 2004. Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1742: 81-87
- Agulhon C., Petravicz J., McMullen A. B., Sweger E. J., Minton S. K., Taves S. R., Casper K. B., Fiacco T. A., McCarthy K. D. 2008. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron*, 59: 932-946
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R. P., Haydon P. G. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22: 208-215
- Ballabh P., Braun A., Nedergaard M. 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation and clinical implications. *Neurobiology of disease*, 16: 1-13
- Beach T. G., McGeer E. G. 1988. Lamina-specific arrangement of astrocytic gliosis and senile plaques in Alzheimer's disease visual cortex. *Brain Research*, 463: 357-361
- Bezprozvanny I. 2013. Presenilins and Calcium Signaling – Systems Biology to the Rescue. *Science Signaling*, 6: 283
- Bezzi P., Gundersen V., Galbete J. L., Seifert G., Steinhauser C., Pilati E., Volterra A. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nature Neuroscience*, 7: 613: 620
- Blackburn R. E., Samson W. K., Fulton R. J., Stricker E. M., Verbalis J. G. 1995. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. *The American Journal of Physiology*, 269: R245-251
- Braak E., Griffing K., Arai K., Bohl J., Bratzke H., Braak H. 1999. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 249 (Suppl 3): 14-22
- Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arrighi H. M. 2007. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: the journal of the Alzheimer's association*, 3: 186-191
- Brown M. S., Ye J., Rawson R. B., Goldstein J. L. 2000. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, 100: 391-398
- Burgoyne R. D., Morgan A. 1995.  $Ca^{2+}$  and secretory-vesicle dynamics. *Trends in Neurosciences*, 18, 4: 191-196

- Buss F., Spudich G., Kendrick-Jones J. 2004. Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: 649-676
- Cajal R. Y. 1909. *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres*. Vol. 1., Paris, Maloine: 1014 str.
- Calakos N., Scheller R. H. 1996. Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description, *Physiological Review*, 76, 1: 1-29
- Cedazo-Minguez A., Popescu B. O., Ankarcona M., Nishimura T., Cowburn R. F. 2002. The presenilin 1 deltaE9 mutation gives enhanced basal phospholipase C activity and a resultant increase in intracellular calcium concentrations. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 36646-36655
- Chan S. L., Mayne M., Holden C. P., Geiger J. D., Mattson M. P. 2000. Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 18195–18200
- Chang L., Goldman R. 2004. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 601-613
- Chen X., Wang L., Zhou Y., Zheng L. H., Zhou Z. 2005. »Kiss-and-run« glutamate secretion in cultured and freshly isolated rat hippocampal astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 25: 9236-9243
- Cheung K. H., Mei L., Mak D. O., Hayashi I., Iwatsubo T., Kang D. E., Foscett J. K. 2010. Gain-of-function enhancement of IP<sub>3</sub> receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons. *Science signalling*, 3, 114: ra22, doi: 10.1126/scisignal.2000818: 22 str
- Choi D. W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A. R. 1987. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *The Journal of Neuroscience*, 7: 357-368
- Christopherson K., Ullian E., Stokes C., Mullaney C., Hell J., Agah A., Lawler J., Mosher D., Bornstein P., Barres B. 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120: 421-433
- De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K., Vanderstichele H., Guhde G., Annaert W., Von Figura K., Van Leuven F. 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391: 387-390
- De Strooper B., Iwatsubo T., Wolfe MS. 2012. Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, 1: a006304, doi: 10.1101/cshperspect.a006304: 19 str

- DeKosky, S. T., Scheff, S. W. 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology*, 27: 457-464
- Ebneth A., Godemann R., Stamer K., Illenberger S., Trinczek B., Mandelkow E. 1998. Overexpression of Tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: Implications for Alzheimer's disease. *The Journal of Cell Biology*, 143: 777-794
- Eliasson C., Sahlgren C., Berthold C. H., Stakeberg J., Celis J. E., Betsholtz C., Eriksson J. E., Pekny M. 1999. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 23996-24006
- Eriksson J. E., He T., Trejo-Skalli A. V., Härmälä-Braskén A. S., Hellman J., Chou Y. H., Goldman R. D. 2004. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *Journal of cell science*, 117: 919-932
- Ferreira A. 2012. Calpain dysregulation in Alzheimer's disease. *ISRN Biochemistry*, Vol. 2012: ID728571, doi:10.5402/2012/728571: 19 str
- Geppert M., Goda Y., Hammer R. E., Li C., Rosahl T. W., Stevens C. F., Südhof T. C. 1994. Synaptotagmin I: a major  $Ca^{2+}$  sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79: 717-727
- Giannakopoulos P., Kovari E., Gold G., von Gunten A., Hof P. R., Bouras C. 2009. Pathological substrates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, 24: 20-29
- Giaume C., Kirchoff F., Matute C., Reichenbach A., Verkhratsky A. 2007. Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death and Differentiation*, 14: 1324-1335
- Goldstein L. S., Yang Z. 2000. Microtubule-based transport system in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annual Review of Neuroscience*, 23: 39-71
- Goll D. E., Thompson V. F., Li H., Wei W., Cong J. 2003. The calpain system. *Physiological Reviews*, 83: 731-801
- Golovina V. A., Blaustein M. P. 1997. Spatially and functionally distinct  $Ca^{2+}$  stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science*, 275: 1643-1648
- Goni-Oliver P., Lucas J. J., Avila J., Hernandez F. 2007. N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 22406-22413
- Gordon G. R., Mulligan S. J., MacVicar B. A. 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*, 55: 1214-1221



- Grafstein B., Forman D. 1980. Intracellular transport in neurons. *Physiological Reviews*, 60: 1167-1283
- Griffin W. S., Stanley L. C., Ling C., White L., MacLeod V., Perrot L. J., White C. L. III., Araoz C. 1989. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 7611-7615
- Grolla A. A., Sam J. A., Lim D., Rodriguez J. J., Genazzani A. A., Verkhratsky A. 2013. Amyloid- $\beta$  and Alzheimer's disease type pathology differentially affects the calcium signalling toolkit in astrocytes from different brain regions. *Cell Death and Disease*, 4, 5: e623, doi: 10.1038/cddis.2013.145: 7 str
- Guček A., Vardjan N., Zorec R. 2012. Exocytosis in Astrocytes: Transmitter Release and Membrane Signal Regulation. *Neurochemical Research*, 37: 2351-2363
- Guček A., Jorgačevski J., Singh P., Geisler C., Lisjak M., Vardjan N., Kreft M., Egner A., Zorec R. 2016. Dominant negative SNARE peptides stabilize the fusion pore in a narrow, release-unproductive state. *Cellular and Molecular Life Sciences*, doi: 10.1007/s00018-016-2213-2): 1-13
- Gunawardena S., Yang G., Goldstein L. S. B. 2013. Presenilin controls kinesin-1 and dynein function during APP-vesicle transport in vivo. *Human Molecular Genetics*, 22, 19: 3828-3843
- Guo Q., Furukawa K., Sopher B. L., Pham D.G., Xie J., Robinson N., Martin G. M., Mattson M. P. 1996. Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid  $\beta$ -peptide 791. *NeuroReport*, 8: 379-383
- Halasa M. M., Fellin T., Haydon P. G. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 13: 54-63
- Han W., Ng Y. K., Axelrod D., Levitan E. S. 1999. Neuropeptide release by efficient recruitment of diffusing cytoplasmic secretory vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 14577-14582
- Hass M. R., Sato C., Kopan R., Zhao G. 2009. Presenilin:RIP and beyond. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20: 201-210
- Haydon P. 2001. GLIA: listening and talking to the synapse, *Nature Review Neuroscience*, 2: 185-193
- Heneka M. T, Rodriguez J.J, Verkhratsky A. 2010. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Research Review*, 63:189-211

- Hertz L., Dringen R., Schousboe A., Robinson SR. 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 57: 417-428
- Honarnejad K., Herms J. 2012. Presenilins: role in calcium homeostasis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44: 1983-1986
- Hua X., Malarkey E. B., Sunjara V., Rosenwald S. E., Li W. H., Parpura V. 2004.  $Ca^{2+}$ -dependent glutamate release involves two classes of endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  stores in astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 76: 86-97
- Hur Y. S., Kim K. D., Paek S. H., Yoo S. H. 2010. Evidence for the existence of secretory granule (dense-core vesicle)-based inositol 1,4,5-triphosphate-dependent  $Ca^{2+}$  signaling system in astrocytes. *PloS One*, 5, 8: e11973, doi:10.1371/journal.pone.0011973: 13 str
- Hynd M. R., Scott H. L., Dodd P. R. 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 45: 583-595
- Iadecola C., Nedergaard M. 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*, 10: 1369-1376
- Ito E., Oka K., Etcheberrigaray R., Nelson T. J., McPhie D. L., Tofel-Grehl B., Gibson G. E., Alkon D. L. 1994. Internal  $Ca^{2+}$  mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 534-538
- Jack C. R., Jr., Knopman D. S., Jagust W. J., Shaw L. M., Aisen P. S., Weiner M. W., Petersen R. C., Trojanowski J. Q. 2010. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology*, 9:119-128
- Kano M., Hashimoto K. 2009. Synapse elimination in the central nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 19:154-161
- Kasai H., Takahashi N., Tokumaru H. 2012. Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiological Reviews*, 92: 1915-1964
- Kopil C. M., Vais H., Cheung K. H., Siebert A. P., Mak D. O., Foskett J. K., Neumar R. W. 2011. Calpain-cleaved type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptor (InsP<sub>3</sub>R1) has Ins<sub>3</sub>-independent gating and disrupts intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 35998-36010
- Kreft M., Stenovec M., Rupnik M., Grils S., Kržan M., Potokar M., Pangršič T., Haydon PG., Zorec R. 2004. Properties of  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis in cultured astrocytes, *Glia*, 46: 437-445

- Kreft M., Potokar M., Stenovec M., Pangršič T., Zorec R. 2009. Regulated exocytosis and vesicle trafficking in astrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1152: 30-42
- Kreft M., Vardjan N., Zorec R. 2016. Excitation-energy coupling and vesicle-based signaling in astrocytes. *Opera Medica & Physiologica*, 1: 57-67
- Kržan M., Stenovec M., Kreft M., Pangršič T., Grilc S., Haydon PG., Zorec R. 2003. Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 23: 1580-1583
- Kulijewicz-Nawrot M., Verkhratsky A., Chvátal A., Syková E., Rodríguez J. J. 2012. Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Anatomy*, 221: 252-262
- Lalo U., Pankratov Y., Parpura V., Verkhratsky A. 2011. Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: what is the role of »excitable« molecules in non-excitable cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813: 992-1002
- Latour I., Hamid J., Beedle A. M., Zamponi G. W., MacVicar B. A. 2003. Expression of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in cultures astrocytes. *Glia*, 41: 347-353
- Laudon, H., Hansson, E. M., Melen, K., Bergman, A., Farmery, M. R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G., and Naslund, J. 2005. A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 35352–35360
- Lee M. K., Slunt H. H., Martin L. J., Thinakaran G., Kim G., Gandy S. E., Seeger M., Koo E., Price D. L., Sisodia S. S. 1996. Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *The Journal of Neuroscience*, 16:7513-7525
- Liguz-Leczna M., Skangiel-Kramska J. 2007. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): The three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 67: 207-218
- Lim D., Ronco V., Grolla A. A., Verkhratsky A., Genazzani A. A. 2014. Glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 167: 45-65
- MacVicar B.A. 1984. Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science*, 226: 1345-1347
- Malarkey E. B., Ni Y., Parpura V. 2008. Ca<sup>2+</sup> Entry Through TRPC1 Channels Contribute to Intracellular Ca<sup>2+</sup> Dynamics and Consequent Glutamate Release from Rat Astrocytes. *Glia*, 56: 821-835

- Malarkey E. B., Parpura V. 2011. Temporal characteristics of vesicular fusion in astrocytes: examination of synaptobrevin 2-laden vesicles at single vesicle resolution. *Journal of Physiology*, 589: 4271-4300
- Marcum J. M., Dedman J. R., Brinkley B. R., Means A. R. 1978. Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 75: 3771-3775
- Martin D. 1992. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia*, 5: 81-94
- Martinez-Hernandez A., Bell K. P., Norenberg M. D. 1977. Glutamine synthetase-glia localization in brain. *Science*, 195: 1356-1358
- Mattson M. P. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein, and its soluble and fibrillogenic peptide derivatives. *Physiological Reviews*, 77: 1081-1132
- Mattson M. P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430: 631-639
- Mattson M. P., Chan S. L. 2003. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*, 34: 385-397
- McBrayer MK., Nixon R. A. 2013. Lysosome and calcium dysregulation in Alzheimer's disease: partners in crime. *Biochemical Society*, 41: 1495-1502
- Morfini G., Szebenyi G., Elluru R., Ratner N., Brady S. T. 2002. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *The EMBO Journal*, 21: 281-293
- Mrak R. E., Griffin W. S. 2005. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*, 26: 349-354
- Mucke L., Selkoe D. J. 2012. Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -Protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, 7: a006338, doi: 10.1101/cshperspect.a006338: 17 str
- Nagele R. G., Wegiel J., Venkataraman V., Imaki H., Wang K. C. 2004. Contribution of glial cell to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 25: 663-674
- Nedergaard M., Ransom B., Goldman S. A. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*, 26: 523-530
- Nedergaard M., Rodriguez J. J., Verkhratsky A. 2010. Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell Calcium*, 47:140-149

- Nogami M., Shiga J., Takatsu A., Endo N., Ishiyama I. 2001. Immunohistochemistry of atrial natriuretic peptide in brain infarction. *Histochemical Journal*, 33: 87-90
- Olabarria M., Noristani H. N., Verkhratsky A., Rodriguez J. J. 2010. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*, 58: 831-838
- Olabarria M., Noristani H. N., Verkhratsky A., Rodriguez J. J. 2011. Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: Mechanism for deficient glutamatergic transmission? *Molecular Neurodegeneration*, 6: 55
- Palop J. J., Mucke L. 2010. Amyloid- $\beta$ -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature Neuroscience*, 13: 812-818
- Parpura V., Fang Y., Basarsky T., Jahn R., Haydon P. 1995. Expression of synaptobrevin, II cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes, *FEBS Letters*, 377: 489-492
- Parpura V., Zorec R. 2010. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Review*, 63:83-92
- Parpura V., Grubišić V., Verkhratsky A. 2011. Ca(2+) sources for the excitotoxic release of glutamate from astrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813: 984-991
- Parpura V., Verkhratsky A. 2012a. Homeostatic function of astrocytes: Ca(2+) and Na(2+) signaling. *Translational Neuroscience*, 3: 334-344
- Parpura V., Verkhratsky A. 2012b. The astrocytes excitability brief: from receptors to gliotransmission. *Neurochemistry International*, 61: 610-621
- Parri H. R., Crunelli V. 2001. Pacemaker calcium oscillations in thalamic astrocytes in situ. *Neuroreport*, 12: 3897-3900
- Pasti L., Volterra A., Pozzan T., Carmignoto G. 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *The Journal of Neuroscience*, 17: 7817-30
- Pekny M., Pekna M. 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *The Journal of Pathology*, 204: 428-437
- Perea G., Araque A. 2005. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 25: 2192-203

- Perea G., Navarrete M., Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, 32: t421-t431
- Peters A., Palay S. L., Webster H. D. 1991. *The fine structure of the nervous system*. 3rd Edition. New York, Oxford University Press: 528 str.
- Phelps C. H. 1972. Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain research*, 39: 225-234
- Phelps M., Foraker A., Swaan P. 2003. Cytoskeletal motors and cargo in membrane trafficking: opportunities for high specificity in drug intervention. *Drug Discovery Today*, 8: 494-502
- Pigino G., Pelsman A., Mori H., Busciglio J. 2001. Presenilin-1 Mutations Reduce Cytoskeletal Association, Deregleate Neurite Growth, and potentiate Neuronal Dystrophy and Tau Phosphorylation. *The Journal of Neuroscience*, 21, 3: 834-842
- Pigino G., Morfini G., Pelsman A., Mattson M. P., Brady S. T., Busciglio J. 2003. Alzheimer's Presenilin 1 Mutations Impair Kinesin-Based Axonal Transport. *The Journal of Neuroscience*, 23, 11: 4499-4508
- Potokar M., Kreft M., Pangršič T., Zorec R. 2005. Vesicle mobility studied in cultured astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329: 678-683
- Potokar M., Kreft M., Li L., Daniel Andersson J., Pangrsic T., Chowdhury H. H., Pekny M., Zorec R. 2007. Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. *Traffic*, 8, 1: 12-20
- Potokar M., Stenovec M., Kreft M., Kreft M. E., Zorec R. 2008. Stimulation inhibits the mobility of recycling peptidergic vesicles in astrocytes. *Glia*, 56: 135-144
- Potokar M., Vardjan N., Stenovec M., Gabrijel M., Trkov S., Jorgačevski J., Kreft M., Zorec R. 2013. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 11238-11258
- Reyes R. C., Verkhratsky A., Parpura V. 2012. Plasmalemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger modulates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytotic release of glutamate from rat cortical astrocytes. *American Society for Neurochemistry Neuro*, 4, 1: e00075, doi: 10.1042/AN20110059: 13 str
- Rud B., Foss O., Krstrup P., Secher N. H., Hallen J. 2012. One-legged endurance training: leg blood flow and oxagen extraction during cycling exercise. *Acta Physiologica (Oxf)*, 205: 177-185
- Runnegar M. T., Wei X., Hamm-Alvarez S. F. 1999. Increased protein phosphorylation of cytoplasmic dynein results in impaired motor function. *Biochemical Journal*, 342: 1-6

- Scheff S. W., Scott S. A., DeKosky S. T. 1991. Quantitation of synaptic density in the septal nuclei of young and aged Fisher 344 rats. *Neurobiology of Aging*, 12: 3-12
- Schliwa M., Euteneuer U., Bulinski J. C., Izant J. G. 1981. Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 78: 1037-1041
- 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
- Seifert G., Schilling K., Steinhauser C. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 194-206
- Selkoe, D. J. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiological Reviews*, 81: 741-766
- Sheng M., Sabatini B. L., Sudhof T. C. 2012. Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, 5: a005777, doi: 10.1101/cshperspect.a005777: 18 str
- Shigetomi E., Bowser D. N., Sofroniew M. V., Khakh B. S. 2008. Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 28: 6659-6663
- Simard M., Nedergaard M. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 129: 877-896
- Smith I. F., Green K. N., LaFerla F. M. 2005. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: recent advances gained from genetically modified animals. *Cell Calcium*, 38: 427-437
- Sofroniew M. V., Vinters H. V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119: 7-35
- Soldati T., Schliwa M. 2006. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 897-908
- Sollner T., Whiteheart S. W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P., Rothman J. E. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362: 318-324
- Spang A., Saw J. H., Jorgensen S. L., Zaremba-Niedzwiedzka K., Martijn J., Lind A. E., van Eijk R., Schleper C., Guy L., Ettema T. J. 2015. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 521: 173-179

- Squire L. R. 2003. *Fundamental Neuroscience. Subcellular organisation of the nervous system: organelles and their functions.* 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, Academic Press: 1426 str
- Stenovec M., Kreft M., Poberaj I., Betz W. J., Zorec R. 2004. Slow spontaneous secretion from single large dense-core vesicles monitored in neuroendocrine cells. *The FASEB Journal*, 18: 1270-1272
- Stenovec M., Kreft M., Grilc S., Potokar M., Kreft M. E., Zorec R. 2007.  $Ca^{2+}$ -dependent mobility of vesicles capturing anti-VGLUT1 antibodies. *Experimental Cell Research*, 313, 18: 809-818
- Stenovec M., Trkov S., Kreft M., Zorec R. 2014. Alterations of calcium homeostasis in cultured rat astrocytes evoked by bioactive sphingolipids. *Acta Physiologica*, 212: 49-61
- Stenovec M., Trkov S., Lasič E., Terzieva S., Kreft M., Rodriguez Arellano J. J., Parpura V., Verkhatsky A., Zorec R. 2016. Expression of Familial Alzheimer Disease Presenilin 1 Gene Attenuates Vesicle Traffic and Reduces Peptide Secretion in Cultured Astrocytes Devoid of Pathologic Tissue Environment. *Glia*, 64, 2: 317-329
- Stutzmann G. E., Caccamo A., LaFerla F. M., Parker I. 2004. Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated  $Ca^{2+}$  signals and altered membrane excitability. *The Journal of Neuroscience*, 24: 508–513
- Stutzmann G. E., Smith I., Caccamo A., Oddo S., LaFerla F. M., Parker I. 2006. Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to  $Ca^{2+}$  disruptions in young, adult and aged Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroscience*, 26: 5180-5189
- Supnet C., Bezprozvanny I. 2011. Presenilins function in ER calcium leak and Alzheimer's disease pathogenesis. *Cell Calcium*, 50, 3: 303-309
- Takashima A., Murayama M., Murayama O., Kohno T., Honda T., Yasutake K., Nihonmatsu N., Mercken M., Yamaguchi H., Sugihara S., Wolozin B. 1998. Presenilin-1 associates with glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and its substrate Tau. *PNAS USA*, 95: 9637-9641
- Tandon A., Fraser, P. 2002. The presenilins. *Genome Biology*, 3, 11: reviews3014.1-reviews3014.9, doi: 10.1186/gb-2002-3-11-reviews3014: 9 str
- Terry R. D. 2000. Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59:1118-1119
- Thinakaran G., Borchelt D. R., Lee M. K., Slunt H. H., Spitzer L., Kim G., Ratovitsky T., Davenport F., Nordstedt C., Seeger M., Hardy J., Levey A. I., Gandy S. E., Jenkins N.



- A., Copeland N. G., Price D. L., Sisodia S. S. 1996. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron*, 17:181-190
- Trkov S., Stenovec M., Kreft M., Potokar M., Parpura V., Davletov B., Zorec R. 2012. Fingolimod - A sphingosine-like molecule inhibits vesicle mobility and secretion in astrocytes. *Glia*, 60: 1406-1416
- Tu H., Nelson O., Bezprozvanny A., Wang Z., Lee S. F., Hao Y. H., Serneels L., De Strooper B., Yu G., Bezprozvanny I. 2006. Presenilis form ER Ca<sup>2+</sup> leak channels, a function disrupted by Familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell*, 126: 981-993
- Tvarusko W., Bentele M., Misteli T., Rudolf R., Kaether C., Spector D. L., Gerdes H. H., Elis R. 1999. Time-resolved analysis and visualization of dynamic processes in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 7950-7955
- Urban S., Schlieper D., Freeman M. 2002. Conservation of intramembrane proteolytic activity and substrate specificity in procaryotic and eucaryotic rhomboids. *Current Biology*, 12: 1507-1512
- Vardjan N., Stenovec M., Jorgacevski J., Kreft M., Zorec R. 2007. Subnanometer fusion pores in spontaneous exocytosis of peptidergic vesicles. *Journal of Neuroscience*, 27:4737-4746
- Vardjan N., Stenovec M., Jorgačevski J., Kreft M., Grils S., Zorec R. 2009. The fusion pore and vesicle cargo discharge modulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1152: 135-144
- Vardjan N., Stenovec M., Jorgačevski J., Kreft M., Zorec R. 2010. Fusion pore: an evolutionary invention of nucleated cells. *European Review*, 18: 347-364
- Vardjan, N, Gabrijel, M, Potokar M, Švajger, U, Kreft, M, Jeras, M, de Pablo Y, Faiz M, Penky M, Zorec, R. 2012. IFN- $\gamma$ -induced increase in the mobility of MHC class II compartments in astrocytes depends on intermediate filaments. *Journal of Neuroinflammation*, 9:144
- Verkhatsky A., Burnstock G. 2014. Purinergic and glutamatergic receptors on astroglia. *Advances in Neurobiology*, 11: 55-79
- Verkhatsky A., Marutle A., Rodriguez-Arellano J. J., Nordberg A. 2015a. Glial asthenia and functional paralysis: A new perspective on neurodegeneration and Alzheimer's disease. *The Neuroscientist*, 21: 552-568

- Verkhatsky A., Matteoli M., Parpura V., Mothet J. P., Zorec R. 2015b. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *The EMBO Journal*, doi: 10.15252/embj.201592705: 19 str
- Volterra A., Meldolesi J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature ReviewsNeurosciences*, 6: 626-640
- Wang H. M., Zhang T., Li Q., Huang J. K., Chen R. F., Sun Y. J., 2013. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by lithium chloride suppresses 6-hydroxydopamine-induced inflammatory response in primary cultures astrocytes. *Neurochemistry International*, 63: 345-353
- Wenk G. L. 2003. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 64 (Suppl 9):7-10
- Wolfe M. S., Xia W., Ostaszewski B. L., Diehl T. S., Kimberly W. T., Selkoe D. J. 1999. Two transmembrane aspartates in presenili-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, 398: 513-517
- Wu H. Y., Lynch D. R. 2006. Calpain and synaptic function. *Molecular neurobiology*, 33, 3: 215-236
- Yeh C. Y., Vadhvana B., Verkhatsky A., Rodriguez J. J. 2011. Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *American Society for Neurochemistry Neuro*, 3: 271-279
- Zador Z., Stiver S., Wang V., Manley G. T. 2009. Role od aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 190: 159-170
- Zhang Q., Pangršič T., Kreft M., Kržan M., Li N., Sul J. Y., Halassa M., Van Bockstaele E., Zorec R., Haydon P. G. 2004. Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 12724-12733
- Zhang W., Han S. W., McKeel D. W., Goate A., Wu J. Y. 1998. Interaction of presenilins with the filamin family of actin-binding proteins. *Journal of Neuroscience*, 18: 914-922
- Zorec R., Araque A., Carmignoto G., Haydon P. G., Verkhatsky A., Parpura V. 2012. Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca<sup>2+</sup> as a signalling route. *ASN for Neurochemistry*, 4, 2: e00080, doi:10.1042/AN20110061: 17 str
- Zorec R., Verkhatsky A., Rodriguez J. J., Parpura V. 2016. Astrocytic vesicles and gliotransmitters: Slowness of vesicular release and synaptobrevin2-laden vesicle nanoarchitecture. *Neuroscience*, 323: 67-75

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju viš. znan. sod. dr. Matjažu Stenovcu in somentorju prof. dr. Marku Kreftu, ki sta mi omogočila opravljanje magistrskega dela na Inštitutu za patološko fiziologijo. Še posebej mentorju se iskreno zahvaljujem za spremljanje mojega dela, vse razlage in konstruktivne nasvete ob nastajanju mojega magistrskega dela, predvsem pa za prijaznost, potrpežljivost in čas, ki ga je vedno našel.

Hvala tudi dr. Saši Trkov Bobnar za uvajanje v laboratorijsko delo in sodelavcem Inštituta za vso pomoč in sproščeno vzdušje.

Zahvaljujem se somentorju prof. dr. Marku Kreftu in recenzentu prof. dr. Robertu Zorcu za temeljit pregled magistrskega dela in koristne pripombe. Prav tako hvala prof. dr. Petru Mačku za hiter pregled magistrskega dela.

Kolegom biologom hvala za prijetne študijske in nepozabne obštudijske urice.

Nenazadnje prisrčna hvala moji družini za zgled in moralno ter finančno podporo tekom študija.