

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Erik Kristian Janežič

**Subcelična
lokalizacija lipidnih kapljic v podganjih
astrociti v kulturi**

DIPLOMSKO DELO
NA UNIVERZITETNEM ŠTUDIJU
BIOKEMIJA

Mentor: doc. dr. Nina Vardjan

Ljubljana, 2015

IZJAVA O AVTORSTVU

diplomskega dela

Spodaj podpisani Erik Kristian Janežič

sem avtor diplomskega dela z naslovom:

Subcelična lokalizacija lipidnih kapljic v podganjih astrocitih v kulturi

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- sem diplomsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Nine Vardjan,
- sem dosledno navedel vso uporabljeno strokovno literaturo,
- je elektronska oblika diplomskega dela identična tiskani obliki diplomskega dela.

V Ljubljani, dne

Podpis avtorja/-ice:

Zahvala

Najprej bi se izredno zahvalil doc. dr. Nini Vardjan, da me je sprejela pod svoje mentorstvo in mi tekom opravljanja diplomskega dela nudila strokovno pomoč in številne nasvete.

Zahvalil bi se tudi asistentu Mihi Pate, ki me je vpeljal v laboratorijsko delo in mi je bil vedno pripravljen pomagati pri različnih tehničnih vprašanjih in težavah.

Zahvalil bi se tudi vsem domačim za podporo in vzpodbudo tekom opravljanja diplomskega dela in študija biokemije nasploh.

Kazalo

Zahvala	I
Kazalo	II
Seznam uporabljenih kratic in simbolov	IV
Povzetek.....	V
Abstract	VI
1 Uvod.....	1
1.1 Celice glije.....	3
1.1.1 Mikroglija	3
1.1.2 Makroglija	4
1.2 Funkcije astrocitov.....	7
1.2.1 Zunajcelični matriks, angiogeneza in krvno-možganska pregrada.....	7
1.2.2 Metabolna podpora.....	8
1.2.3 Glijo-transmisija	10
1.3 Lipidne kapljice.....	11
1.3.1 Biogeneza lipidnih kapljic.....	13
2 Namen dela.....	14
3 Materiali in metode.....	15
3.1 Priprava raztopin in gojišč	15
3.1.1 Hranilno gojišče za astrocite	15
3.1.2 Zunajcelična raztopina	15
3.1.3 Fosfatni pufer.....	16
3.1.4 BSA/PBS	16
3.1.5 Kozji serum.....	16

3.1.6	Raztopina formaldehida za fiksacijo celic	16
3.2	Prekrivanje krovnikov s poli-L-lizinom(PLL).....	16
3.3	Nasajanje astrocitov	17
3.4	Imunocitokemija	18
3.5	Označevanje celičnih organelov s fluorescenčnimi barvili	19
3.5.1	Označevanje z BODIPY 493/503.....	20
3.5.2	Označevanje z MitoTracker Green FM	20
3.5.3	Označevanje z LysoTracker Green DND-26	20
3.6	Mikroskopiranje	20
3.7	Analiza slik	21
4	Rezultati	22
4.1	Kolokalizacija organelov, označenih z nilsko rdečim barvilom, z označevalcema lipidnih kapljic BODIPY 493/503 in perilipinom 2	23
4.2	Kolokalizacija lipidnih kapljic, označenih z nilsko rdečim barvilom, s poznimi endosomi/lizosomi in kislimi organeli	27
4.3	Kolokalizacija lipidnih kapljic, označenih z nilsko rdečim barvilom, z majhnimi sinaptičnim mešičkom podobnimi mešički	30
4.4	Kolokalizacija lipidnih kapljic, obarvanih z nilsko rdečim barvilom, s peptidergičnimi mešički.....	33
4.5	Kolokalizacija lipidnih kapljic, obarvanih z nilsko rdečim barvilom, z mitohondriji.....	35
5	Razprava.....	38
6	Sklepne ugotovitve	43
7	Literatura	44

Seznam uporabljenih kratic in simbolov

ACSL	acil-CoA sintetaza dolgoverižnih maščobnih kislin (angl. »long chain fatty acyl-CoA synthetase« ali »long-chain-fatty-acid—CoA ligase«)
ADFP	protein povezan z adipozno diferenciacijo (angl. »adipose differentiation related protein«)
ANP	atrijski natriuretični peptid
ATP	adenozin trifosfat
BBB	krvno-možganska pregrada (angl. »blood brain barrier«)
BSA	goveji serumski albumin (angl. »bovine serum albumin«)
CŽS	centralni živčni sistem
ECM	zunajcelični matriks (angl. »extracellular matrix«)
ER	edoplazemski retikulum
GFAP	glijalni fibrilarni kisli protein (angl. »glial fibrillary acidic protein«)
LAMP	lizosomski membranski protein 1 (angl. »lysosomal-associated membrane protein 1«)
LD	lipidne kapljice (angl. »lipid droplets«)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (angl. »phosphate-buffered saline«)
PLL	poli L-lizin
SLMV	sinaptičnim mešičkom podobni mikromešički (angl. »small synaptic like microvesicles«)
TAG	triacilglicerol
vGLUT	vezikularni prenašalec glutamata
vSERT	vezikularni prenašalec D-serina

Povzetek

Raziskovanje fiziologije glije je bilo dolgo zasenčeno z raziskavami fiziologije nevronov. Odkritje novih funkcij in spoznanje, da imajo astrociti bistveno pomembnejšo vlogo pri vzdrževanju funkcionalnega živčnega sistema, je na novo oživelou preučevanje nenevronske celice glije. Astrociti, najštevilčnejše celice glije, imajo osrednjo vlogo pri presnovni podpori nevronov, pri čemer je poleg metabolizma laktata, glukoze in glutamata izredno pomemben tudi metabolizem lipidov. Lipidi v celicah so vir energije, signalne molekule, gradniki membran. V živčnem sistemu pa sodelujejo tudi pri ohranjanju nevroplastičnosti in izgradnji mielinskih ovojníc. V celicah so lipidi shranjeni v specializiranih organelih – lipidnih kapljicah. V drugih celičnih tipih so bile pokazane interakcije lipidnih kapljic z različnimi celičnimi organeli in membranskimi proteini. V astrocitih so lipidne kapljice še zelo neraziskan organel. Cilj naše raziskave je bil določiti subcelično lokalizacijo lipidnih kapljic in morebitno interakcijo s celičnimi organeli v astrocitih v kulturi. Za doseg cilja smo uporabili označevanje organelov s fluorescenčnimi označevalci in konfokalno mikroskopijo. Analizirali smo stopnjo prekrivanja fluorescenčnega signala med obarvanimi lipidnimi kapljicami in ostalimi organeli. Pokazali smo, da lipidne kapljice v astrocitih vsebujejo sredico iz nevtrálnih lipidov in proteinski plašč iz perilipina, ki je vpleten v uravnavanje metabolizma LD. Poleg tega, smo pokazali, da lipidne kapljice v astrocitih zelo verjetno interagirajo z mitohondriji, kjer poteka β -oksidacija maščobnih kislin. Interakcije z lizosomi/avtofagosomi, kjer v nekaterih celicah poteka razgradnja LD, nismo opazili.

Ključne besede: Astrociti, lipidne kapljice, kolokalizacija, celični organeli

Subcellular localization of lipid droplets in cultured rat astrocytes

Abstract

Research of glial physiology was put aside for a long time due to the main focus on neuronal research. Discovery of novel astrocyte functions and acknowledgment of their importance in maintaining functional nervous system has brought glia research back to life. Astrocytes, the most numerous glial cells, have a central role in neuronal metabolic support where in addition to lactate, glucose and glutamate metabolism, lipid metabolism is also of great importance. Lipids serve as fuel molecules, energy stores, signal molecules, and components of membranes. In nervous system they also play an important role in maintaining neuronal plasticity and are involved in myelination. Inside cells lipids are stored in specialized organelles, lipid droplets. The lipid droplet research has provided information on interaction of lipid droplets with different organelles and membrane proteins. However, not much research has been conducted concerning the matter of lipid droplets in astrocytes yet. The goal of our research was to determine subcellular localization of lipid droplets and their potential interaction with other organelles in astrocytes in culture. To pursue our goal we made use of fluorescent organelle labelling and confocal microscopy. We calculated the degree of colocalisation between the lipid droplet originated fluorescent signal and fluorescent signal from other organelles. Our results indicate that astrocytic lipid droplets, like in other cell types, contain a neutral lipid core and a protein coat involved in lipid droplet metabolism. Moreover, we observed that lipid droplets likely interact with mitochondria, where β -oxidation of fatty acids takes place. We, however, didn't observe any interaction between lipid droplets and lysosomes/autophagosomes, where lipid droplet degradation can occur in other cells.

Key words: Astrocyte, lipid droplets, colocalisation, cell organelles

1 Uvod

Možgani so glede na funkcije, ki jih opravljajo, postali predmet resnejših bioloških raziskav relativno pozno. V zahodni kulturi je namreč dolgo časa veljalo prepričanje, da se človeška duša in intelekt nahajata v srcu. Prvi, ki je presegal tradicionalna dognanja o možganih, je bil v Rimu delujoč, grški zdravnik in filozof Aelius Galenus. Z opazovanjem možganskih poškodb in mentalnih aktivnosti je dognal, da so sedež človeške duše možgani in ne srce. Večji nevro-anatomski preboji so se zgodili konec 17. stoletja z objavo prvih knjig o anatomiji možganov (*Humphrey Ridley s "The Anatomy" of the Brain in Thomas Willis z "Cerebri anatome"*).

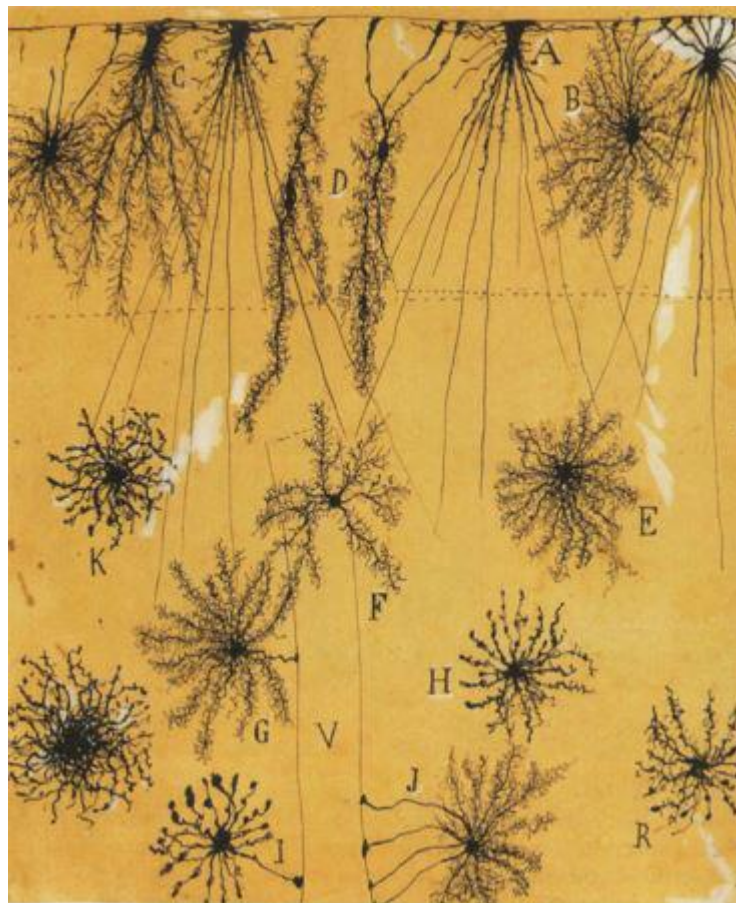
Za začetek moderne nevroznanosti lahko štejemo razvoj metode barvanja s srebrovim kromatom. Metodo je razvil italijanski zdravnik in filozof Camillo Golgi, ki je podpiral holistični pristop razumevanja živčnega sistema. Ta pogled je trdil, da je živčni sistem kontinuirana neprekinjena mreža, ki deluje kot celota. Konec 19. stoletja je bila to široko sprejeta teorija, katere temelje pa je v začetku 20. stoletja močno zamajal španski nevroznastvenik Santiago Ramón y Cajal. Z uporabo Golgijeve metode barvanja (slika 1), ki jo je sam še nekoliko nadgradil, je opravil natančna opazovanja ptičjih možganov in ugotovil, da živčni sistem le ni enovit, temveč je sestavljen iz diskretnih, avtonomno delujočih elementov – nevronov. Detajlne slike opazovanih celic so bile temelj nevronske teorije, ki trdi, da je živčni sistem sestavljen iz specializiranih celic, ki se razlikujejo glede na funkcijo in lokalizacijo znotraj živčnega sistema [1].

Do nedavnega je bil glavni fokus nevroznanstvenih raziskav namenjen preučevanju nevronov. Že od samega začetka namreč nevroni veljajo za aktivne dele živčnega sistema, ki so odgovorni za propagacijo signala, pomnjenje, učenje, refleksne odzive, itd. Zaradi očitne potrebe po dobrem poznavanju fizioloških in molekularno bioloških lastnosti nevronov, za napredek medicine in razumevanje človeškega uma, so bile celice glije za dolgo časa postavljene na stranski tir. Rudolf Virchow je leta 1858 prvi okarakteriziral nevroglijo kot celice z vlogo vezivnega tkiva, ki nimajo aktivne vloge pri moduliranju nevronskih impulzov. Takšno prepričanje je med znanstveniki veljalo vse do leta 1920.

V začetku dvajsetih let 20. stoletja je Cajal s svojima učencema Nicolás-om Achúcarro-m in Pío-m del Río-Horteg-om dosegel nov preboj pri poznavanju glije.

Razvil je specifično metodo barvanja astrocitov s sublimatom AuCl_3 (angl. »gold chloride-sublimate staining«). Nova metoda mu je omogočila potrditev hipoteze izvora astrocitov iz radialne glije in demonstracijo, da se astrociti v odraslih možganih lahko delijo. S tem je postavil temelj za kasnejše raziskave s področja zarodnih celic v možganih. V istem obdobju je njegov učenec del Río-Hortega s pomočjo nove metode označevanja z amonijevim srebrovim karbonatom (angl. »ammoniacal silver carbonate method«), ki jo je sam razvil, opisal dva nova pripadnika glije; oligodendrocite in mikroglijo. Pokazal je, da imajo oligodendrociti vlogo pri mielinaciji centralnega živčnega sistema (CŽS), in so s tem analogni Schwannovim celicam v perifernem živčnem sistemu. Mikroglijo, ki so edine celice ne-nevronskega izvora, je poimenoval "zbiralci smeti". Opazil je tudi, da prekursorji mikroglije naselijo možgane kmalu po rojstvu in, da se aktivirajo pri možganskih poškodbah [1].

Z odkritji Cajala in njegovih učencev je začelo postajati jasno, da celice glije le niso pasivni igralci znotraj kompleksne mreže nevronov.



Slika 1: Ena prvih detajlnih risb kortikalne nevroglije Santiaga Ramóna y Cajala [1]

1.1 Celice glije

Celice glije (astrociti, mikroglija) so evolucijsko ohranjene in so se najverjetneje, kot spremljevalke nevronov, pojavile že pri prvih oblikah nevronskega sistema. Občutljivost in specifičnost nevronov je z evolucijskega stališča zahtevala ločitev nevronov od preostalega krvnožilnega sistema, kar je dokaj hitro privedlo do razvoja prvih krvno-možganskih pregrad (angl. »blood-brain barrier«, BBB). V nižjih organizmih kot so insekti in raki je BBB zgrajena izključno iz astrocitov. Kasneje v razvoju se pojavi BBB z endotelijem, katerega permeabilnost pa še zmeraj uravnavajo astrociti. Zaradi visokih energetskega potreb nevronov takšna segregacija ni smela zmanjšati dostopnosti hranil nevronom, kar je od glije zahtevalo zmožnost selektivnega in reguliranega prehajanja metabolitov preko BBB do nevronov. Ločitev živčnega sistema od preostalega krvnožilja je pomenilo tudi imunološko pregrado, kar je vodilo v razvoj specializiranega imunskega sistema, katerega ključni element je mikroglija. Glija je zgodaj v toku evolucije prevzela ključne vloge pri ustvarjanju ugodnega mikrookolja za razvoj in nemoteno delovanje nevronov [1]

Danes vemo, da glija pri človeku lahko v nekaterih področjih možganov predstavlja do 90 % vseh celic. Ta odstotek pa se od organizma do organizma razlikuje in je očitno povezan z njihovo velikostjo (25 % pri vinski mušici, 65 % pri miši in 97 % pri slonu) [2]. Poznanih je več tipov celic glije, ki se med sabo morfološko, funkcijsko in lokacijsko razlikujejo. Prva delitev glije poteka glede na mesto izvora prekursorskih celic znotraj zarodnih plasti; mikroglija – mezoderm, makroglija – ektoderm.

1.1.1 Mikroglija

Mikroglija so edine možganske celice, ki niso ektodermalnega izvora. V resnici so specializirani makrofagi, ki izvirajo iz hematopoetskih matičnih celic in edini razlog, da jih prištevamo med glijo je njihova podporna vloga nevronom.

Razvijejo se iz prekursorskih celic za monocite, ki v različnih fazah razvoja preplavijo možgane kjer se diferencirajo in razvijejo značilno mikroglijalno morfologijo. Z morfološkega vidika so dosti manjše od ostalih celic glije [17]. V CŽS poznamo glede na stopnjo aktivacije več tipov mikroglije. V mirovanju imajo značilno obliko s številnimi zelo razvejanimi izrastki, ki se ob aktivaciji spremenijo. Poškodba oziroma okužba

stimulira aktivacijo mikroglije, ki povzroči serijo ne le morfoloških, temveč tudi funkcijskih sprememb. Celice se skrajšajo in odebelijo izrastki, pridobijo ameboidno obliko in migrirajo na mesto patologije. V odziv nevrolški poškodbi oz. vnetju aktivirana mikroglija izraža številne citokine in rastne faktorje, ki mobilizirajo elemente imunskega sistema. Delujejo tudi kot fagociti, predvideva pa se tudi njihova vloga pri odstranjevanju nepravilno nastalih sinaps [3].

Celice mikroglije so visoko mobilne in jih najdemo v vseh delih živčnega sistema. Ves čas krožijo po živčnem sistemu in iščejo mesta okužbe in poškodbe. Njihov vnetni odziv in fagocitoza sta pomembna pri številnih nevrodegenerativnih boleznih kot so Alzheimerjeva, Parkinsonova bolezen in multipla skleroza.

1.1.2 Makroglija

Glijogeneza se pri sesalcih začne v poznem razvoju zarodka in je izrazita do zgodnjega postnatalnega obdobja, sicer pa traja celotno življenje vendar manj intenzivno. Celice makroglije lahko razvrstimo v več tipov, med drugim astrocite, oligodendrocite in Schwannove celice [4]. Ker se je naše delo posvečalo astroцитom, bodo v nadaljevanju fiziološki in molekularni procesi podrobneje opisani le za ta tip celic.

1.1.2.1 Astrociti

Astrociti so zelo raznolika in najobsežnejša skupina celic glije. Poimenovanje izvira iz grškega imena za zvezde - "astron" in pomeni zvezdasto oblikovane celice. Večina astrocitov ima značilno zvezdasto obliko, kar pa ni zadostno za uspešno prepoznavanje astrocitov v tkivu. Za označevanje astrocitov se na primer uporablja glutamin sintetaza, S100 β , glijalni fibrilarni kisli protein (GFAP), ki je gradnik intermediarnih filamentov.

Astrociti so lahko v stiku s kapilarami in nevroni hkrati, s svojimi izrastki zaobjemajo sinapse, kjer lahko uravnavajo prisotnost transmittorjev. Lastnosti astrocitov se med astrociti v različnih področjih CŽS razlikujejo [4].

V cerebralnem korteksu, v katerem je glijogeneza najbolj raziskana, astrociti tako kot oligodendrociti nastanejo iz radialne glije, ki se nahaja v ventrikularni coni zarodka, in

matičnih celic postnatalne subventrikularne cone. Možno pa je, da astrociti izvirajo tudi iz posebnih glijalnih matičnih celic [4].

Astrocite lahko glede na morfologijo in lokacijo v CŽS razdelimo v dve večji skupini; protoplazemske astrocite in fibrilarne astrocite.

1.1.2.1.1 Protoplazemski in fibrilarni astrociti

Protoplazemske astrocite najdemo v sivi možganovini. Za njih je značilno, da imajo številne razpredene izrastke, dolge okoli 50 µm, ki so v stiku s kapilarami (perivaskularni kontakt) in nevroni (sinapse).

Fibrilarni astrociti se nahajajo v beli možganovini. Njihovi izrastki so bistveno daljši in manj razpredeni kot pri protoplazemskih astrocitih. IZRastki dosegaajo dolžine okoli 300 µm. Lahko so v stiku s kapilarami in nevroni, predvsem aksoni, t. i. Ranvierovi zažemki. Protoplazemski astrociti pa so preko svojih izrastkov lahko v stiku tudi z žilnico (angl. »pia matter«), ki je notranja vezivna, močno ožiljena ovojnica CŽS, ki se tesno prilega možganom in hrbtenjači [4].

V razširjeno družino astroglije uvrščamo celice, kot so Müller-jeva glija v mrežnici, Bergmannova glija v malih možganih, tanicite v tretjem možganskem prekatu, pituicite v nevrohipofizi, cibrozocite, ki se nahajajo pri glavi vidnega živca, in druge. Te celice tako kot astrociti izražajo proteine GFAP, S100β in glutamin sintetazo, poleg tega so njihove lastnosti delovanja podobne astrocitom, med drugim lahko v odgovoru na poškodbo ali vnetje tako kot astrociti postanejo reaktivne (reaktivna astroglijoza) in sodelujejo v patoloških procesih na področjih, kjer se nahajajo.

1.1.2.2 Oligodendrociti, Schwannove celice in mielinska ovojnica

Pojav oligodendrocitov in Schwannovih celic, ki tvorijo mielinske ovojnice okrog aksonov v CŽS in perifernem živčnem sistemu, je narekoval tok evolucije živalskih vrst. Komunikacija med CŽS in perifernim živčnim sistemom pri višjih živalih mora biti hitra, kar je v evoluciji privedlo do obstoja mielinskih ovojnic, katerih nastanek je glavna naloga omenjenih tipov celic [1]. Mielinske ovojnice se tvorijo okrog aksonov nevronov tako, da so posamezni mielinski segmenti med seboj ločeni z nemieliniziranim področjem imenovanim Ranvierovi zažemki (angl. »node of Ranvier«). Z elektrokemijskega vidika je ionska kapaciteta na mieliniziranem področju manjša, kar omogoči hitrejšo propagacijo akcijskega potenciala. Ranvierovi zažemki so potrebni, da regenerirajo akcijski potencial, ki nekoliko oslabi pri prehodu mieliniziranega področja na aksonu.

Kljub enaki fiziološki vlogi Schwannovih celic in oligodendrocitov, oba tipa celic delujeta dokaj različno. Oligodendrociti se nahajajo v CŽS ter tvorijo številne izrastke, ki se ovijejo okoli aksonov in tvorijo mielinsko ovojnico. En oligodendrocit lahko ovija aksone do 50-ih nevronov. Schwannove celice, ki so v perifernem živčnem sistemu, tvorijo mielinski ovoj tako, da se posamezna celica ovije okrog samo enega aksona. So tudi najbolj izrazit tip glije v perifernem sistemu in imajo poleg mielinizacije aksonov še druge lastnosti. Udeležene so med drugim pri razvoju nevronov in njihovi regeneraciji, nastanku zunajceličnega matriksa (ECM, angl. »extracellular matrix«) in predstavitvi antigenov. Mielinska ovojnica je sestavljena iz ~20 % proteinov in ~80 % lipidov [19]. Z zmanjšano mielinizacijo so povezane številne bolezni, kot so levkodistrofije in multipla skleroza. Poznavanje metabolizma lipidov znotraj živčnega sistema je za to velikega zdravstvenega pomena [1],[18] .

1.2 Funkcije astrocitov

1.2.1 Zunajcelični matriks, angiogeneza in krvno-možganska pregrada

Najdlje poznana funkcija astrocitov je njihova vloga pri izgradnji ECM, ki v možganih predstavlja približno 10-20 % celotnega volumna. Dolgo časa se je predvidevalo, da je bila to tudi njihova edina vloga v možganskem tkivu. Astrociti poleg molekularnih gradnikov matriksa izražajo in izločajo tudi metaloproteinaze, ki imajo središčno vlogo pri razgradnji in remodeliranju ECM. Pomembna predstavnika metaloproteinaz sta MMP-2 in MMP-9, ki razgrajuje zunajcelični amiloid – β [4].

Tekom odraščanja organizma se sestava ECM aktivno spreminja, kar je posledica migracije nevronov, sinaptogeneze in nevroplastičnosti. Astrociti tekom razvoja izražajo številne rastne in tropične dejavnike (živčni rastni dejavnik (NGF), nevrotropin-3, možganski nevrotropični faktor BDNF, itd.) ter adhezijske molekule (N-kadherin, nevronske adhezijske molekule – NCAM). To je le del pomembnejših molekul, ki uravnavajo razvoj in preživetje nevronov, usmerjajo razraščanje nevrinov ter stabilizirajo in uravnavajo sinaptične stike [4].

Naslednji pomembni aspekt astrocitne aktivnosti je angiogeneza. Mehanizem angiogeneze je najbolj preučen na modelu mrežnice. V procesu so udeleženi astrociti, endotelijske celice ter tudi nevroni. Nevroni v mrežnici izražajo rastni dejavnik PDGF (angl. »platelet-derived growth factor«), ki stimulira delitev astrocitov. Ti posledično izločajo rastni dejavnik žilnega endotelija (VEGF; vascular endothelial growth factor), kar stimulira razvoj žilja. Celice žilja s povratno signalizacijo vplivajo na diferenciacijo astrocitov ob žilnem epiteliju, kar vodi v prenehanje delitve astrocitov in tvorjenje bazalnega ECM. Podobno povratno zanko astrociti tvorijo z endotelijem BBB. Opaženo je bilo, da v kulturi endotelijske celice BBB ohranijo le nekatere fiziološke lastnosti. Tu gre predvsem za zmanjšano tvorbo tesnih stikov med endotelijskimi celicami in zmanjšanje izražanja prenašalnih sistemov. Če enake celice gojimo skupaj z astrociti se izgubljene fiziološke lastnosti povrnejo [4].

1.2.2 Metabolna podpora

Posamezen astrocit je v CŽS preko svojih izrastkov lahko v stiku z nevroni (sinapsami, aksoni), endotelijem kapilar, in tudi drugimi celicami glije, kot so oligodendrociti in mikroglija. Astroцитi na svoji površini izražajo številne receptorje in transporterje za metabolite, nevrotransmitorje in glijotransmitorje, ter aktivno sodelujejo pri uravnavanju njihove zunajcelične koncentracije.

Možgani so energetsko najbolj potraten organ. Konsistentna dostava in uravnavanje metabolitov sta ključna za nemoteno delovanje organa. Poleg glukoze so pomembni energetski viri v možganih še laktat, glutamat, glutamin in piruvat. Čeprav so nevroni in astroцитi zmožni metabolizma vseh energetskih virov, preferenčno uporabljajo določene presnovne poti. V nevronih na primer v veliko večji meri, kot v astroцитih, poteka oksidativni metabolizem. Veliko dokazov kaže tudi na to, da imajo nevroni kot vir energije, tudi kadar sta prisotna oba metabolita, veliko raje laktat kot glukozo. Ugotovljeno je bilo tudi, da je v nevronih fosfofruktokinaza-1, ki je pomemben encim glikolize, slabo aktivna. Študije so pokazale, da inducirana glikoliza v nevronih sproži oksidativni stres in apoptozo, kar kaže na to, da nevroni ne premorejo visoke stopnje glikolize. Predpostavlja se, da je glavni razlog za inhibicijo glikolize v nevronih vzdrževanje antioksidativnega potenciala nevronov. Namesto glikolitične poti tako večina glukoze vstopa v pentoza-fosfatno pot, kjer se proizvedejo večje količine NADPH, ki je pomemben reducent. To bi pojasnilo tudi, zakaj je laktat v času povečane aktivnosti nevronov glavni substrat oksidativnega metabolizma v nevronih. Z laktatom, ki se v nevronih pretvori v piruvat, le-ta pa vstopi v Krebsov cikel, nevroni še vedno proizvedejo zadostne količine ATP, a se pri tem izogibajo glikolizi, da varčujejo z glukozo, ki je potrebna za vzdrževanje pentoza-fosfatne poti in zadostnih količin NADPH.

Na drugi strani pa je fosfofruktokinaza v astroцитih zelo aktivna. V astroцитih je tako favorizirana glikolitična pot in tvorba piruvata. Zaradi odsotnosti oziroma inaktivacije piruvat dehidrogenaze, je v astroцитih favoriziran nastanek laktata in njegov transport iz celice preko monokarboksilatnih prenašalcev MCT 1 in MCT 4. Nevroni sprejmejo zunajcelični laktat preko MCT2 v svoji membrani in ga pretvorijo v piruvat, ki lahko vstopi v Krebsov cikel in služi kot vir energije [5].

Preferenca do različnih energetske bogatih molekul in odvisnost energijskih potreb od nevrnske aktivnosti je razlog za tesno sklopitev astrocitnega in nevrnskega metabolizma. Pri povečani aktivnosti nevronov se ne povečajo le energetske potrebe nevronov, temveč tudi astrocitov. Koncentracija glutamata v sinaptični špranji se med aktivnostjo nevronov zviša in naloga astrocitov je, da odstranijo odvečni glutamat. Glutamat se iz sinaptične špranje v astrocite prenese s simportom, skupaj z ioni Na^+ , preko specifičnih glutamatnih transporterjev. Povišana znotrajcelična koncentracija ionov Na^+ zahteva delovanje, od ATP odvisne Na^+/K^+ črpalke. Potreba po ATP stimulira glikolizo v astrocitih in nastanek laktata, ki pa služi kot energetski vir nevronom [6].

Pomembna metabolna sklopitev nevronov in astrocitov je tudi regeneracija nevrnskega glutamata. Nevroni nimajo encima piruvat karboksilaze, kar jim onemogoča sintezo lastnega glutamata, zato so odvisni od astrocitne podpore. Glutamat, ki ga astrociti privzamejo iz sinaptične špranje se nazaj do nevronov prenese preko glutamat-glutaminske poti. Glutamat se v astrocitih namreč aminira z delovanjem glutamin sintetaze in nastane glutamin, ki ga astrociti transportirajo v zunajcelični prostor preko sistema N. Sistem N je glutamin- Na^+ simporter, H^+ antiporter. Od tam glutamin preko Na^+ simporterjev (sistem A) vstopi v nevrone, kjer ga glutaminaze deaminirajo do glutamata [7]. Zaradi aminacije v astrocitih in deaminacije v nevronih začne prihajati do gradienta ionov NH_4^+ . Koncentracija ionov NH_4^+ se regenerira z delovanjem aminokislinskega prenašalnega sistema (angl. »amino acid shuttle«) [6].

Preko omenjenih metabolnih poti oz. sklopitev je hkrati zadovoljena energetska potreba obeh tipov celic in tudi uravnavanje in regeneracija koncentracije nevrottransmitorjev in glijotransmitorjev v sinaptični špranji.

1.2.3 Glijotransmisija

Definicija »glijotransmitorja« zahteva, da le-ta nastane oziroma se shranjuje v celicah glije, da sproščanje inducira fiziološki ali patološki dražljaj, ki povzroči odziv v sosednjih celicah fiziološkega ali patološkega pomena.

Astroцитi lahko skladiščijo glijotransmitorje v sekretornih mešičkih, kot so sinaptičnim mešičkom podobni mikromešički (SLMV; angl. »synaptic like microvesicles«), peptidergični mešički in pozni endosomi/lizosomi. Velikosti mešičkov so običajno v razponu med 30 nm in tudi več 100 nm, odvisno od tipa sekretornega mešička. Izločanje glijotransmitorjev iz mešičkov v zunajcelični prostor poteka podobno kot pri nevronih v procesu uravnavane eksocitoze, le da so odzivi na dražljaj v astrocitih počasnejši glede na nevrone (od 300 ms pa tudi do nekaj minut). Glijotransmitorji so lahko aminokisline (glutamat, D-serin), peptidi (ANP) in različne organske molekule (ATP, taurin) [8]. Poleg uravnavane od Ca^{2+} -odvisne eksocitoze, pa se glijotransmitorji lahko izločijo tudi preko kanalčkov in transporterjev v membrani astrocitov [8].

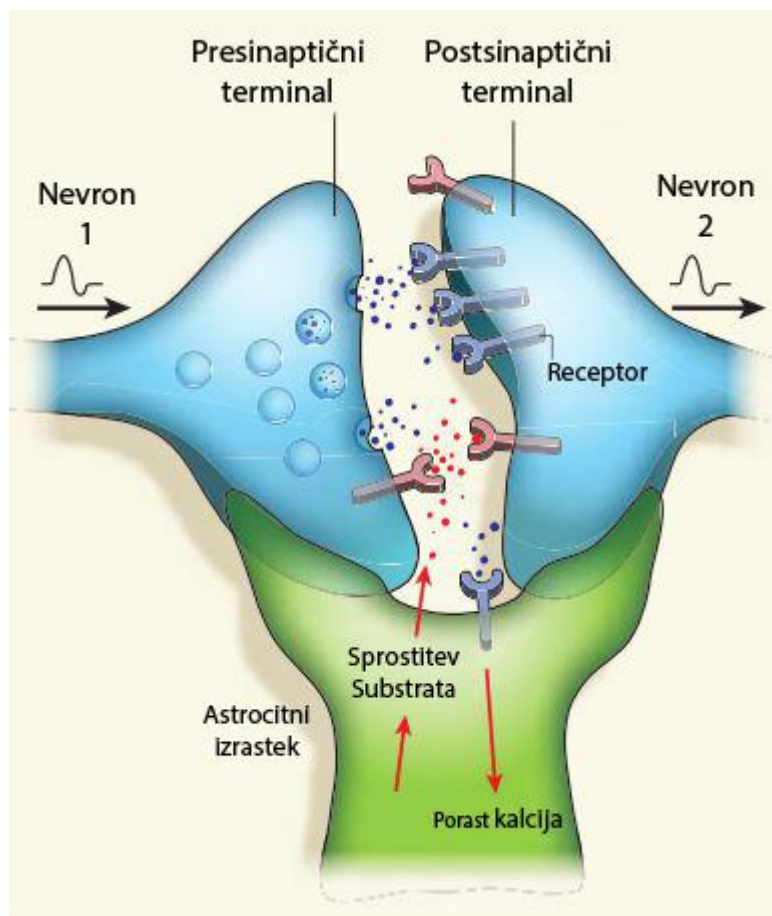
Astroцитi s sinapsami tvorijo t. i. »tripartitne sinapse« (slika 2). Astroцитni izrastki tesno obdajajo sinapse tako, da receptorji in transporterji na koncih astroцитnih izrastkov lahko aktivno sodelujejo pri zaznavanju in moduliranju sinaptične vsebine, kar posledično vpliva na prenos in širjenje signala.

Astroцитi izražajo številne vezikularne prenašalce, ki omogočajo kopičenje glijotransmiterjev v mešičkih. Poznani so vezikularni prenašalci za glutamat (vGLUT1,2,3), vezikularni prenašalec za ATP (vNUT) in vezikularni prenašalec za D-serin (VSERT). Med pomembne prenašalce pa spada tudi posebna oblika vakuolarne ATPazne črpalke, ki ustvarja protonski gradient mešičkov.

Mešički, v katerih astroцитi shranjujejo glijotransmitorje, preko lastnih proteinov SNARE interagirajo s proteini SNARE na plazemski membrani, kar ob prisotnosti ionov Ca^{2+} omogoči zlitje membran mešičkov s plazemsko membrano ter sprostitve glijotransmitorjev v sinaptično špranjo. Odzivnost astrocitov na ione Ca^{2+} je ključnega pomena za uravnavanje aktivnosti sinaps.

Astroцитi so med seboj povezujejo preko številnih presledkovnih stikov in tvorijo astroцитni sincicij. Nedolgo nazaj so odkrili, da znotraj astroцитnega sincicija potekajo kalcijevi valovi, preko katerih astroцитi komunicirajo s sosednjimi astroцитi. Predvideva

se, da ti valovi omogočajo neke vrste sinhrono uravnavanje sinaptične aktivnosti, saj omogočajo prenos informacije tudi do astrocitov, ki niso v neposredni bližini dražljaja [4].



Slika 2: Shematski prikaz tripartitne sinapse [2].

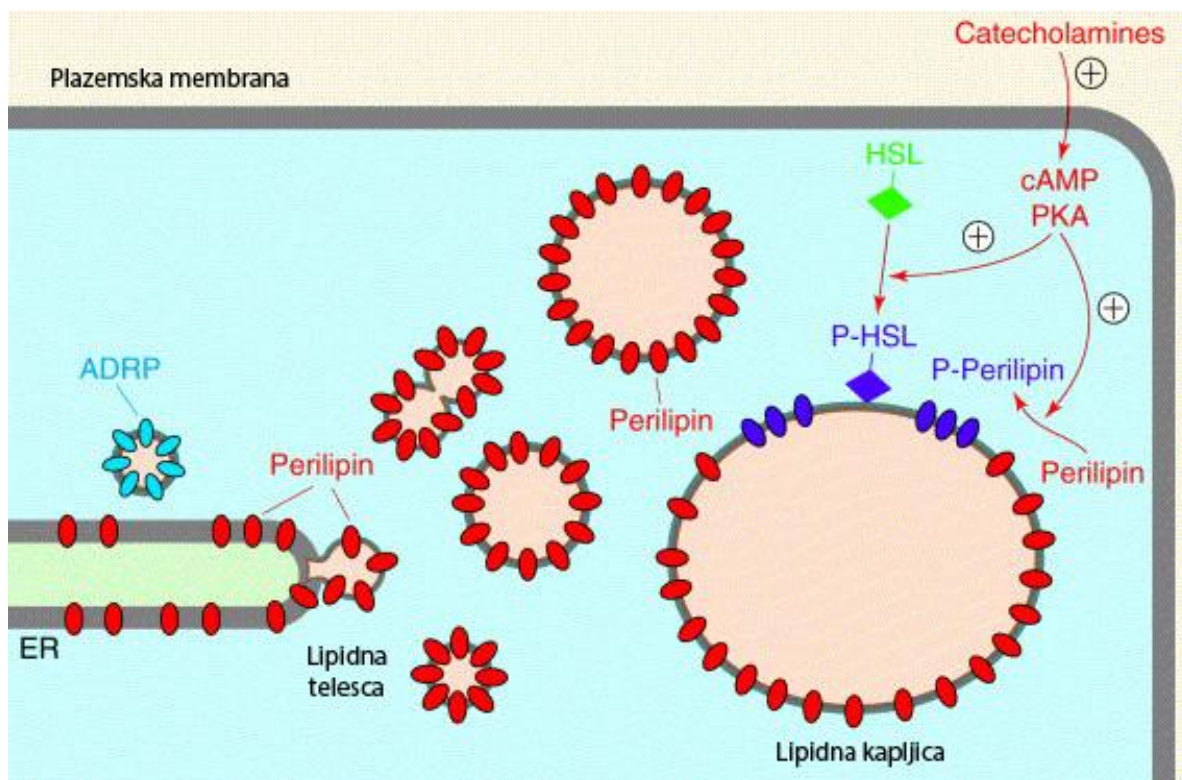
1.3 Lipidne kapljice

Ob odkritju so lipidne kapljice (LD, angl. »lipid droplets«) veljale za pasivno strukturo namenjeno predvsem skladiščenju lipidov (maščobnih kislin in holesterola). Z odkritjem številnih proteinov v plašču LD pa je postalo jasno, da so LD dinamični organeli, ki predstavljajo tako vir energije v obliki maščobnih kislin (β -oksidacija v mitohondrijih) kot tudi vir prekursorjev za izgradnjo lipoproteinov, hormonov in imajo pomembno vlogo pri izgradnji membran (fosfolipidi, holesterol). Količina LD v celicah je bistveno povečana pri različnih patoloških stanjih kot je debelost in arterioskleroza, biogeneza LD pa je spremenjena tudi v bolezenskih stanjih, ki niso direktno povezana z lipidi (kardiomipomatije, nevromiopatije, virusni hepatitis). Biogeneza LD je namreč

strogo uravnana, nanjo vplivajo številni znotraj- in zunajcelični dejavniki kot so pomanjkanje hranil, vnetni dejavniki, itd. [9].

LD so zgrajene iz fosfolipidnega monosloja in hidrofobnega jedra (sredice), ki ga sestavljajo nevtralni lipidi, večinoma različni triacilgliceridi in sterolni estri. V fosfolipidni monosloj so preko amfipatičnih heliksov pritrjeni različni proteini, kot so perilipini (PLIN), acetil-CoA sintaze in številni proteini udeleženi pri transportu mešičkov [9].

Perilipin 2 (tudi PLIN2, ADFP ali adipofilin) je ena izmed tarč označevanja LD pri naši raziskavi, predvideva se, da je v LD vseh celic. Proteini iz družine perilipinov tvorijo na površini LD perilipinski plašč, ki ščiti lipide pred prezgodnjo lipolizo. Takšna zaščita poveča stabilnost LD tudi med biogenezo. Preko fosforilacije perilipinov poteka tudi kontrola lipolize triacilgliceridov. Ob prisotnosti adrenalina se aktivira od cAMP-odvisna protein kinaza A (PKA), ki fosforilira perilipin in povzroči njegovo prerazporeditev v membrani LD. Takšna motnja pa olajša dostop hormonsko občutljivi lipazi (HSL), ki jo tudi aktivira fosforilacija s PKA (slika 3).

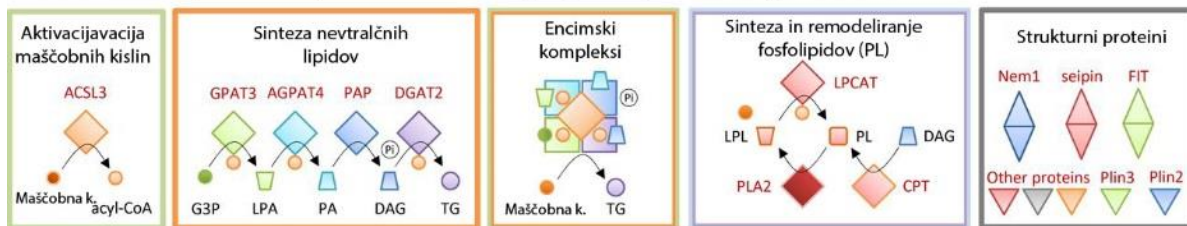


Slika 3: Shematski prikaz biogeneze in mobilizacije lipidnih kapljic preko hormonske aktivacije protein kinaze A (PKA), ki s fosforilacijo aktivira hormonsko občutljivo lipazo (HSL, hormone sensitive lipase) in perilipin [10].

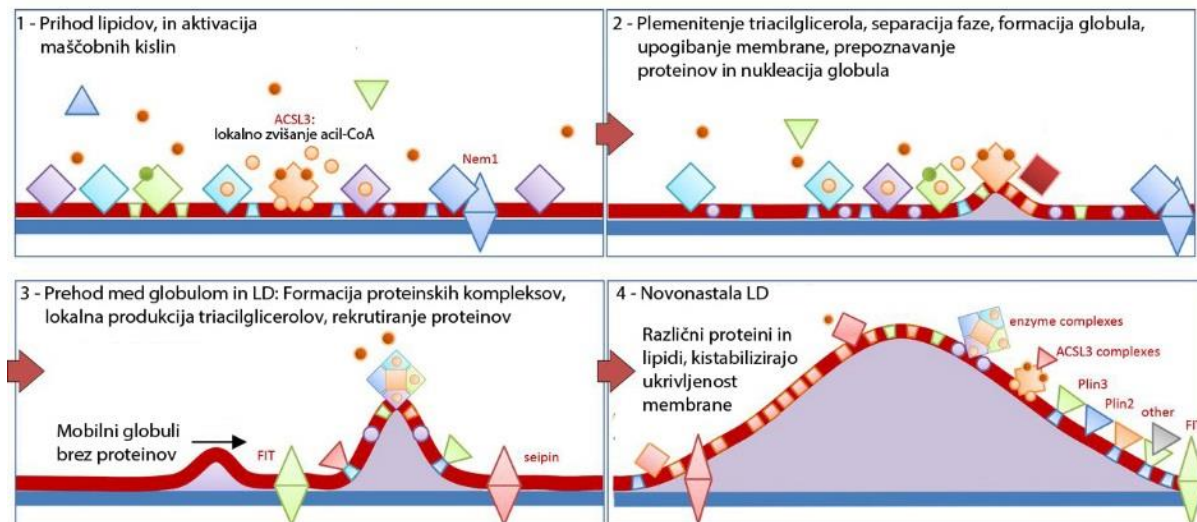
1.3.1 Biogeneza lipidnih kapljic

Biogeneza LD poteka v endoplazemskem retikulumu (ER). Začne se v perifernem predelu ER, med zorenjem pa se nastajajoča LD premika proti osrednjemu delu ER. Proces nastajanja LD se začne s prihodom maščobnih kislin v bližino ER. Maščobne kisline so osnovni substrat za sintezo TAG. V prvi stopnji mora poteči aktivacija maščobne kisline z vezavo acetil-CoA. Encimi, ki aktivirajo maščobne kisline so ligaze ACSL (angl. »long-chain-fatty-acid—CoA ligase«) (slika 4; B1). Lokalna koncentracija osrednjega prekursorja za nastanek TAG je nekoliko višja v bližini ACSL, zato se na teh mestih membrane ER izoblikujejo mesta povečane sinteze TAG. Začno nastajati globuli TAG in prične se separacija lipidnega dvosloja membrane ER in s tem nastajanje LD (slika 4; B2). V bližino takšnih globulov se počasi usmerijo proteini, ki zaznajo ukrivljenost membrane in stabilizirajo globule. En pomembnejših predstavnikov takšnih proteinov je ACSL3. Poleg zaznavanja ukrivljenosti membrane in stabilizacije globulov ACSL3 dodatno poveča lokalno produkcijo TAG, kar pospeši rast globulov. Med sintezo TAG nastajajo tudi številni bioaktivni lipidni intermediati, kot je diacilglicerol, ki jih prepoznajo nekateri proteini, ki dodatno stabilizirajo LD (primer PLIN3 iz družine perilipinov). LD rastejo oz. se povečujejo tudi z zlivanjem manjših globulov, ki nastajajo na različnih mestih membrane ER (slika 4; B3 in B4). Obstočnost LD je tekom biogeneze uravnana z remodeliranjem fosfolipidov, njihovih polarnih glav in hidrofobnih repov. Za stabilizacijo ukrivljenosti površine LD so namreč potrebne točno določene oblike fosfolipidov [9].

A - Shematska reprezentacija encimskih reakcij ki potekajo med biogenezo LD



B - Shematska reprezentacija biogeneze LD



Slika 4: Shematski prikaz reakcij udeleženi pri sintezi triacilgliceridov in potek biogeneze lipidnih kapljic [9].

2 Namen dela

Cilj raziskovalne naloge je določiti subcelično lokalizacijo lipidnih kapljic v celični kulturi astrocitov podganjega korteksa. Poznavanje lokalizacije LD pri fizioloških pogojih, je pomembno za predvidevanje in nadaljnjo preučevanje interakcij lipidnih kapljic z ostalimi celičnimi organeli.

3 Materiali in metode

Poskusi so bili izvedeni na primarni kulturi astrocitov podganjega korteksa. Za opazovanje subcelične lokalizacije LD smo se v raziskavi poslužili metode imunocitokemijskega označevanja znotrajceličnih organelov na fiksiranih celicah. Nekatere znotrajcelične organele pa smo obarvali tudi v živih celicah s specifičnimi fluorescenčnimi označevalci organelov. Po označevanju organelov smo celice obarvali še z nilsko rdečim barvilom (ang: Nile Red), ki označi LD, in celice nato posneli pod konfokalnim mikroskopom. Na pridobljenih slikah smo s pomočjo programske opreme določili kolokalizacijo fluorescenčno obarvanih organelov.

3.1 Priprava raztopin in gojišč

3.1.1 Hranilno gojišče za astrocite

Hranilno gojišče pripravimo iz gojišča DMEM (angl. »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«), v katerega v končni koncentraciji dodamo 1 mM Na-piruvat, 1 mM L-glutamin, 10 % zarodni goveji serum (FBS, angl. »fetal bovine serum«) ter 50 µg/mL mešanice antibiotikov penicilina in streptomicina. Hranilno gojišče steriliziramo z membranskim filtrom, ki ima pore premera 0,22 µm, zato ne prepušča delcev >0,22 µm. Na-piruvat v raztopini služi kot dodaten vir energije za celice. L-glutamin je esencialna aminokislina in jo k hranilnemu gojišču dodamo naknadno zato, ker je pri fiziološkem pH L-glutamin nestabilen in razpade na amonijak in piroglutamat (DMEM ne vsebuje L-glutamina).

3.1.2 Zunajcelična raztopina

Zunajcelična raztopina je bila pripravljena v milliQ destilirani vodi, katere upornost pri 25° C je bila ~18,2 MΩ cm⁻¹. Zunajcelična raztopina je vsebovala 10 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonska kislina), 131 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM D-glukoza, 1,8 mM CaCl₂ in 1 mM MgCl₂. Raztopino smo dobro premešali na magnetnem

mešalu in v naslednjem koraku z NaOH umerili pH na 7,2. Končna osmolarnost raztopine je bila ~300 mOsm. Osmolarnost smo izmerili z osmometrom Osmomat 030 (Gonotec GmbH, Nemčija).

3.1.3 Fosfatni pufer

Fosfatni pufer (PBS) pripravimo tako, da 1 tabletko raztopimo v 200 ml destilirane vode. Raztopina je na koncu vsebovala 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl in 10 mM fosfatni pufer.

3.1.4 BSA/PBS

3 % raztopino govejega serumskega albumina (BSA) v PBS pripravimo tako, da 1,2 g BSA raztopimo v 40 ml PBS.

3.1.5 Kozji serum

10 % kozji serum v 3 % BSA/PBS pripravimo tako, da 2 ml kozjega seruma vmešamo v 18 ml 3 % BSA/PBS.

3.1.6 Raztopina formaldehida za fiksacijo celic

Za fiksacijo celic smo uporabili 2 % raztopino formaldehida, ki smo jo pripravili iz izvorne 16 % raztopine formaldehida (ThermoScientific) v PBS.

3.2 Prekrivanje krovnikov s poli-L-lizinom(PLL)

Za boljše pritrdjanje celic na površino krovnika je potrebno krovna stekelca tretirati s PLL. Krovna stekelca smo najprej sterilizirali v mikrovalovni pečici (srednja jakost, 5 minut) in nato prenesli v petrijevko z etanolom. V etanolu smo jih ob občasnem stresanju pustili 10 minut. Stekelca smo nato v laminariju sprali z vodo, jih prenesli v

raztopino z 1 % PLL v destilirani vodi in inkubirali 10-15 minut pri sobni temperaturi. Nato smo stekelca 2-krat sprali z destilirano vodo, jih prenesli v petrijevko s premerom 22 mm, in počakali, da se posušijo. Krovna stekelca smo do uporabe hranili pri 4 °C.

3.3 Nasajanje astrocitov

Izvor astrocitov za nasajanje je bila predhodno pripravljena primarna celična kultura izolirana iz korteksa 2-3 dni starih podgan. Gojitveno posodo s predhodno pripravljeno celično kulturo smo najprej pogledali pod svetlobnim mikroskopom in ocenili kvaliteto kulture (rast celic, morebitne okužbe). Iz gojitvene posode smo nato odstranili hranilno gojišče in kulturo enkrat sprali s svežim hranilnim gojiščem. V naslednjem koraku smo celicam v gojitveni posodi dodali tripsin/EDTA in celice inkubirali v inkubatorju 5 min pri 37 °C, 95 % vlažnosti in 5% CO₂ atmosferi. Po 5 minutah smo pod mikroskopom preverili, če so se celice odlepile od podlage. Če smo opazili, da so na nekaterih območjih celice še pritrjene, smo gojitveno posodo narahlo pretresli. Suspenzijo celic smo nato s serološko pipeto prenesli v dve sterilni mikrocentrifugirki. Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 900 obratih, kar je pospešilo usedanje celic na dno mikrocentrifugirke. Po petih minutah centrifugiranja smo iz mikrocentrifugirk previdno odstranili tripsin/EDTA in usedlini celic dodali 600 µl svežega hranilnega gojišča, ki smo ga predhodno segreli na 37 °C. Morebitne celične skupke smo razbili z nežnim potiskanjem suspenzije celic preko injekcijskih igel notranjega premera 1,1 mm, 0,8 mm in 0,6 mm. Na krovno stekelce smo nanесли 40 µl suspenzije in s svetlobnim mikroskopom preverili gostoto celic na krovniku. Če smo ugotovili, da so celice na krovniku pregosto nasajene smo suspenzijo celic razredčili. Celice smo nasadili enakomerno po površini krovnika. To najlažje storimo tako, da suspenzijo nanašamo od sredine krovnika spiralno navzven. Potem, ko smo nasadili celice na krovnike, smo krovnike s celicami inkubirali v inkubatorju 20 minut pri 37 °C. V tem času so se celice pritrdile na podlago. V petrijevke z nasajenimi celicami smo dodali 2 ml hranilnega gojišča in celice do uporabe gojili v inkubatorju. Celice smo uporabili v poskusih 24-48 h po nasaditvi, odvisno od gostote kulture in morfologije celic.

3.4 Imunocitokemija

Krovnike z nasajenimi celicami smo najprej 3 minute spirali v 2 ml PBS. Nato smo jih prenesli v prazne petrijevke in nanje nanесли 250–300 µl 2 % formaldehida ter inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Sledili so trije koraki zaporednega spiranja fiksativa v PBS. V vsakem koraku smo krovnik spirali 3 minute in ga s pinceto prenesli v svežo raztopino PBS. Za zmanjšanje nespecifične vezave primarnih protiteles smo na krovnike nakapali 250 µl mešanice 10 % kozjega seruma in 3 % BSA v PBS in jih inkubirali 1 h pri 37°C. Po končani inkubaciji smo krovnike enkrat sprali v PBS. Celicam smo nato dodali 250 µl ustrezno redčenih primarnih protiteles proti različnim označevalcem celičnih organelov, redčitve za posamezne označevalce so bile:

- **Perilipin 2 (ADFP**, angl. »Adipose differentiation-related protein«)
Uporabili smo zajčje monoklonsko protitelo proti ADFP1 (Abcam plc., Anglija, 108323), ki smo ga redčili 1:100, 1:200, 1:300, 1:1.000 in 1:2.000. Za analizo smo uporabili posnetke pridobljene pri vseh omenjenih redčitvah;
- **LAMP1**
Uporabili smo zajčje poliklonsko protitelo proti LAMP1 (Abcam plc., Anglija, 24710), ki smo ga redčili 1:100;
- **ANP**
Uporabili smo zajčje poliklonsko protitelo proti ANP (Abcam plc., Anglija, ab14348), ki smo ga redčili 1:500, 1:1.000, 1:2.000 ali 1:3.000. Za analizo smo uporabili posnetke pridobljene pri vseh omenjenih redčitvah;
- **vGLUT1**
Uporabili smo zajčje protitelo proti VGLUT1 (SySy mBh, Nemčija, 135302), ki smo ga redčili 1:1.000;
- **D-serin**
Uporabili smo zajčje poliklonsko protitelo proti D-serinu (Gemabio, AP041), ki smo ga redčili 1:100, 1:1.000 ali 1:1.500. Za analizo smo uporabili posnetke pridobljene pri vseh omenjenih redčitvah.

Inkubacija s primarnimi protitelesi je pri vseh poskusih potekala 2 h pri 37 °C oziroma 12 h pri 4 °C, če smo imunocitokemijo izvajali v dveh delih. Po končani inkubaciji smo krovnike trikrat po 3 minute spirali v PBS, vsakič v sveži raztopini PBS. Sledilo je označevanje s sekundarnimi protitelesi. Uporabljali smo sekundarno protitelo konjugirano z Alexa Fluor 488, ki smo ga v vseh primerih redčili 1:500. Krovnike smo prekrili z 250 µl redčenih sekundarnih protiteles in inkubirali 45 minut pri 37°C. Krovnike smo nato spirali 3-krat po 3 minute v PBS, po vsakem spiranju smo jih prenesli v svežo raztopino. Po spiranju smo krovnike inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi v 50 nM raztopini nilsko rdečega barvila (Life Technologies, N-1142), ki označi lipidne kapljice, in krovnike enkrat sprali z zunajcelično raztopino. Izvorno 3,14 mM raztopino nilsko rdečega barvila smo razredčili v DMSO (dimetil sulfoksid). Vsa protitelesa smo redčili v 3 % BSA/PBS.

Po končanem označevanju smo krovnike prilepili na objektna stekelca. Še prej pa smo na sredino objektnih stekelc nanesti 7 µl sredstva proti bledenju fluorescence (SlowFade, Invitrogen, S36936) in krovnike previdno položili na objektno stekelce. Pri tem smo pazili, da je med stekelcema ostalo čim manj zračnih mehurjev. Za pritrditev krovnika na objektno stekelce smo nanesti lak za nohte po robu krovnika in počakali, da se posuši. Preparate smo do uporabe hranili pri 4° C.

3.5 Označevanje celičnih organelov s fluorescenčnimi barvili

Mitohondrije smo označili s zelenim fluorescenčnim barvilom MitoTracker Green FM (Molecular Probes, kat.št. M-7514), kisle organele z zelenim fluorescenčnim barvilom LysoTracker Green DND-26 (Molecular Probes, L-7526) in lipidne kapljice z nilsko rdečim fluorescenčnim barvilom (postopek opisan v predhodnem poglavju) oz. zelenim fluorescenčnim barvilom BODIPY 493/503 (Life Technologies, D-3922). Barvanje celic z nilsko rdečim barvilom in barvilom BODIPY 493/503 je potekalo na fiksiranih celicah, barvanje z barviloma MitoTracker in LysoTracker pa na živih celicah, pri čemer smo pazili, da koncentracija DMSO, v katerem smo raztapljali barvila, v končni raztopini ni

preseгла 0,5 %, zaradi možnih učinkov DMSO na fiziologijo celic pri višjih koncentracijah.

3.5.1 Označevanje z BODIPY 493/503

Izvorno raztopino BODIPY 493/503 v etanolu v koncentraciji 1 mg/ml smo 1.000-krat redčili v 3 % BSA/PBS. Celice smo najprej fiksirali v 2 % formaldehidu. Nato smo jih 5 min inkubirali v raztopini s fluorescenčnima označevalcema BODIPY 493/503 (1:1.000) in nilsko rdečim barvilom.

3.5.2 Označevanje z MitoTracker Green FM

Celice smo inkubirali 30 min pri 37°C v 2 ml raztopine MitoTracker s končno koncentracijo 50 nM ali 100 nM. Le-ti smo pripravili v zunajcelični raztopini iz izvorne 1 mM raztopine. Celicam smo nato dodali nilsko rdeče barvilo s končno koncentracijo 50 nM, ki smo jo pripravili iz izvorne 3,14 mM raztopine. V nilsko rdečem barvilu smo celice inkubirali 5 minut.

3.5.3 Označevanje z LysoTracker Green DND-26

Celice smo inkubirali 5 min pri 37°C v 1 ml raztopine LysoTracker s končno koncentracijo 200 nM. Le-to smo pripravili v zunajcelični raztopini iz izvorne 1 mM raztopine LysoTracker. Celicam smo nato dodali nilsko rdeče barvilo s končno koncentracijo 50 nM, ki smo jo pripravili iz založne 3,14 mM raztopine. V nilsko rdečem barvilu smo celice inkubirali 5 minut.

Po inkubaciji smo krovnike obarvane z barviloma MitoTracker ali LysoTracker vpeli v posebno kamrico, namenjeno za opazovanje živih celic na konfokalnem mikroskopu. Med snemanje so bile celice v zunajcelični raztopini.

Če ni drugače navedeno, so bile kemikalije od proizvajalca Sigma-Aldrich.

3.6 Mikroskopiranje

Za snemanje posnetkov smo uporabljali konfokalni mikroskop Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss AG, Nemčija). Za vzbujanje sekundarnih protiteles označenih s AlexaFluor

488 in pa barvil MitoTracker, LysoTracker in BODIPY 493/503 smo uporabljali argonski (Ar) laser z valovno dolžino 488 nm. Za vzbujanje nilsko rdečega barvila pa helij-neonski laser (He/Ne) z valovno dolžino 543 nm. Zeleno emisijsko svetlobo smo zajemali z ozkopasovnim emisijskim filtrom 505-530 nm (Alexa Fluor 488, Mitotracker, LysoTracker, BODIPY 493/503), rdečo emisijsko svetlobo pa z dolgopasovnim filtrom, ki je prepuščal svetlobo valovnih dolžin >560 nm (nilsko rdeče barvilo). Slike zelene in rdeče fluorescence smo zajemali zaporedno. Pri zajemanju slik smo uporabili objektiv s 63-kratno povečavo (Plan-Neofluar, 63x/1,4 Oil DIC, Carl Zeiss AG) ali 40-kratno povečavo (Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil DIC; Carl Zeiss AG), slike pa smo zajemali z 2-kratno digitalno povečavo in s 4-kratnim povprečenjem.

3.7 Analiza slik

Za analizo kolokalizacije smo uporabili predhodno po meri napisan program (Kreft in sod. 2004) za programsko orodje MATLAB (Math Works, ZDA). Program v 8-bitni sliki prešteje rumene slikovne točke, to je rdeče in hkrati zelene slikovne točke, ter samo rdeče in samo zelene slikovne točke. Pri analizi smo upoštevali le slikovne točke, ki imajo intenziteto fluorescence višjo od 51 a.u., to je 20 % najvišje možne intenzitete (255 a.u.).

V programu Excell (Microsoft, ZDA) smo nato izračunali delež kolokaliziranih-rumenih slikovnih točk (rdečih in hkrati zelenih) glede na vse rdeče slikovne točke (samo rdeče in pa rdeče, ko so bile hkrati zelene) v procentih za vsako sliko.

$$\text{kolokalizacija (\%)} = \frac{\text{št. rumenih slikovnih točk} \times 100}{\text{št. vseh rdečih slikovnih točk}}$$

Nato smo iz podatkov izračunali povprečne vrednosti in pa standardno napako povprečja za delež kolokaliziranih zelenih slikovnih točk z vsemi rdečimi slikovnimi točkami. Rezultate smo predstavili v tabeli in diagramu. Vsak poskus je bil izveden v paralelkah in v najmanj dveh neodvisnih ponovitvah. Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med poskusi smo uporabili enosmerno analizo variance (angl. »one-way ANOVA), ki ji je sledil Dunnov test (SigmaPlot, Systat Software Inc, ZDA). Kot

statistično značilne razlike smo upoštevali tiste, kjer je bila verjetnost P, da med poskusoma ni razlike, manjša od 0,001.

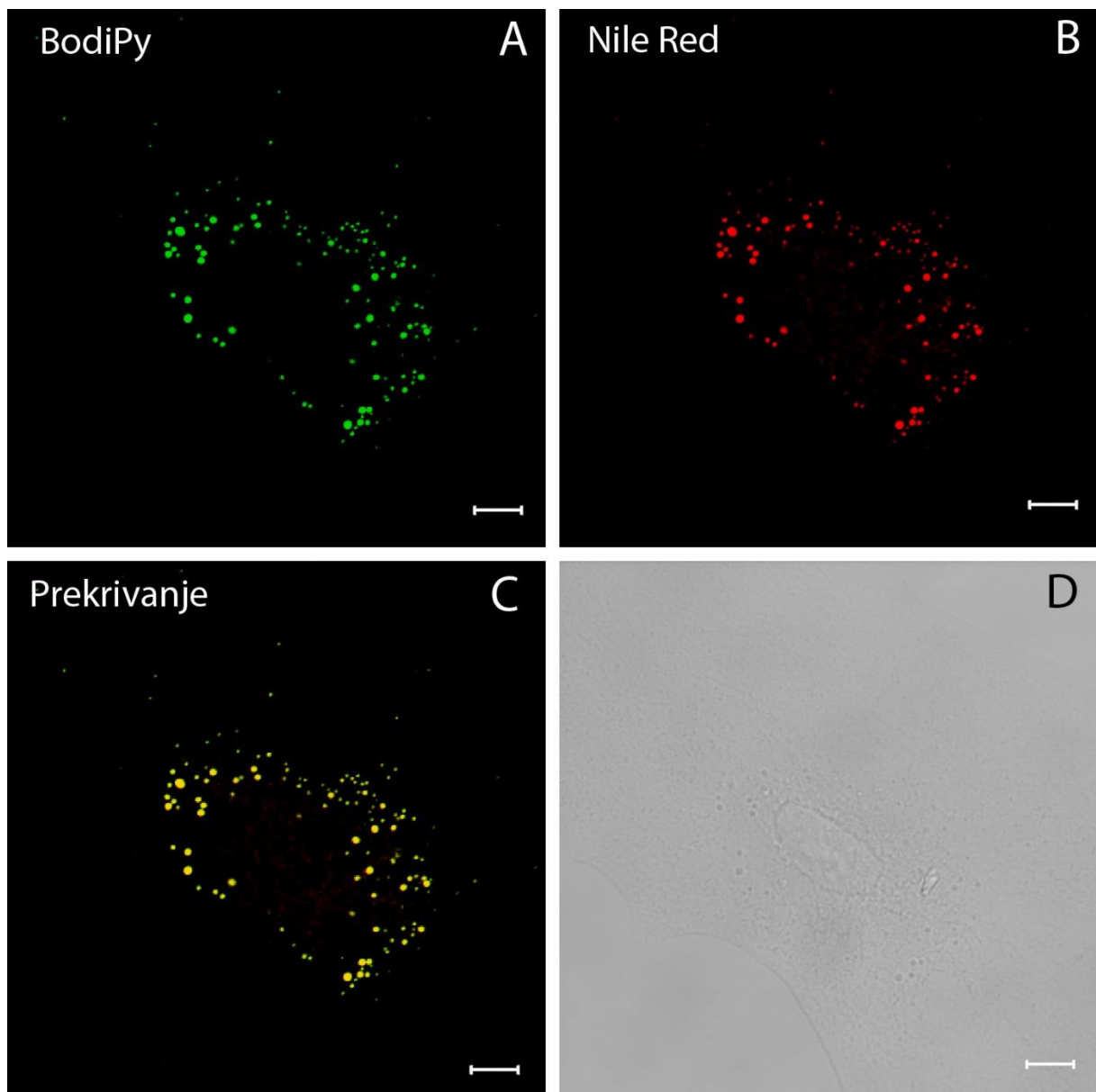
4 Rezultati

LD so v celicah lahko vir gradnikov za izgradnjo membran, poleg tega so tudi vir rezervne energije [10]. Znano je, da se v nekaterih celicah LD, ob višjih energijskih potrebah, premaknejo v neposredno bližino mitohondrijev, kjer poteka β -oksidacija maščobnih kislin, lahko pa so tudi prisotne v avtofagosomi, v katerih poteka njihova razgradnja [11]. Nedavno je bilo pokazano, da astrociti izločajo LD v zunajcelični prostor [12], vendar pa subcelična lokalizacija LD v astrocitih ter njihova morebitna interakcija z ostalimi organeli še ni bila raziskana.

Zanimala nas je subcelična lokalizacija LD v astrocitih v kulturi. Za opazovanje (ko)lokalizacije smo se poslužili barvanja organelov, ki smo jih označili bodisi imunocitokemijsko s specifičnimi protitelesi proti proteinom, ki so sestavni del organelov, ali fluorescenčnimi barvili, ki specifično označijo določen tip organela v celici (zelena fluorescenca). Po označevanju organelov je sledilo označevanje lipidnih kapljic z nilsko rdečim barvilom (rdeča fluorescenca). Celice smo nato posneli s konfokalnim mikroskopom (Slike 5-12) in jih analizirali tako, da smo v programu MATLAB in Excell določili delež kolokaliziranih zelenih svetlobnih točk (zelena fluorescenca) glede na vse rdeče svetlobne točke (fluorescenca nilsko rdečega barvila). Delež kolokalizacije fluorescenčno označenih organelov glede na organele označene z nilsko rdečim barvilom je prikazan v Tabeli 1 in Grafu 1.

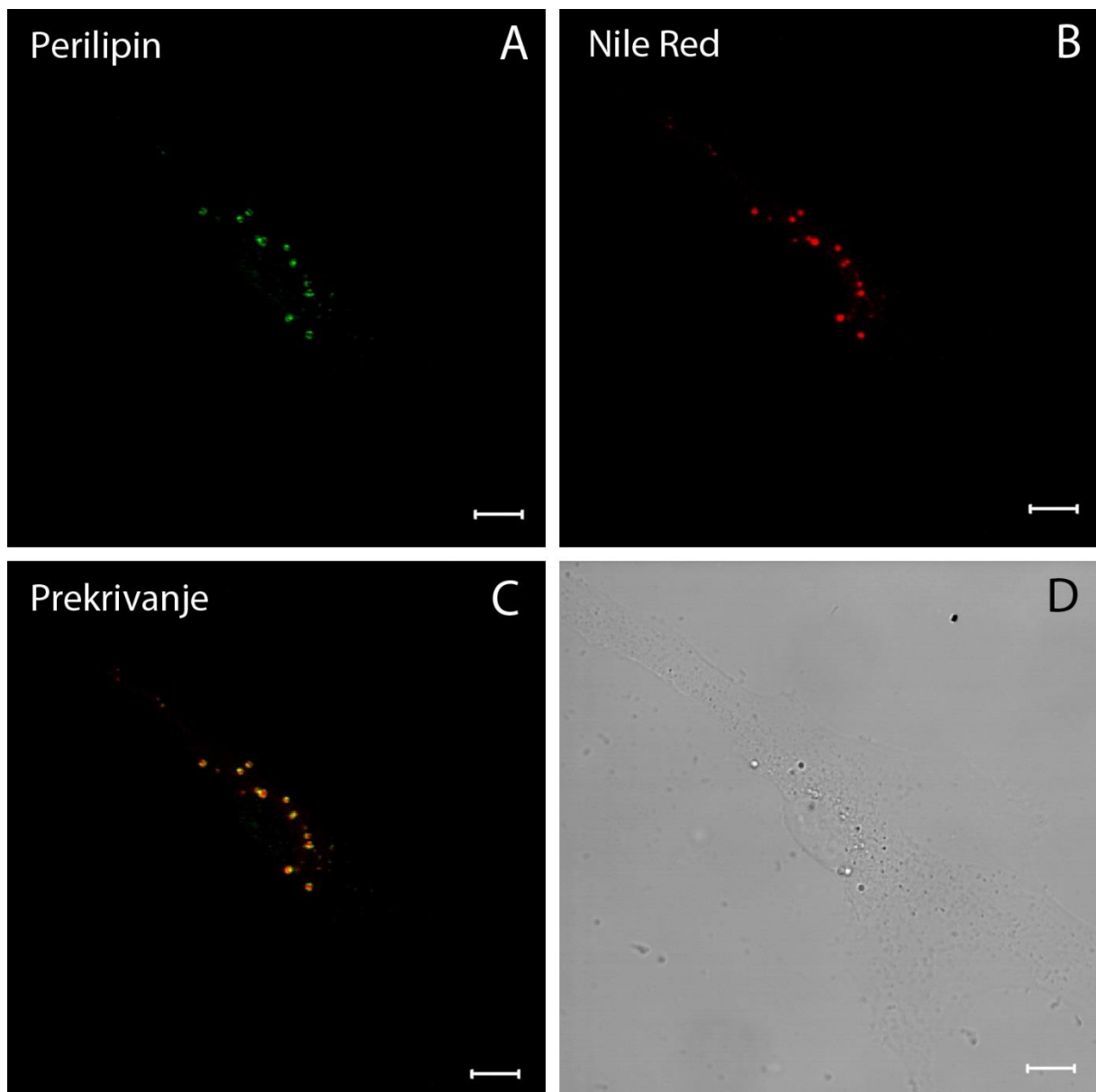
4.1 Kolokalizacija organelov, označenih z nilsko rdečim barvilom, z označevalcema lipidnih kapljic BODIPY 493/503 in perilipinom 2

Da bi preverili ali nilsko rdeče barvilo v astrocitih v kulturi obarva LD smo celice obarvali z zelenim fluorescenčnim barvilom BODIPY 493/503, ki tako kot nilsko rdeče barvilo obarva nevtralne lipide v sredici LD (slika 5). Iz slike je razvidno, da je stopnja prekrivanja (rumen signal) med rdečim (nilsko rdeče) in zelenim (BODIPY 493/503) signalom zelo visoka. Izračunali smo, da je delež kolokalizacije ~80 % (tabela 1, Graf 1), iz česar lahko sklepamo, da obe barvili v astrocitih v kulturi označita iste organele, LD.



Slika 5: Reprezentativni posnetek astrocita v kulturi označenega z nilsko rdečim barvilom in BODIPY 493/503. Sliko smo posneli s konfokalnim mikroskopom. (A) zelen fluorescenčni signal (BODIPY 493/503); (B) rdeč fluorescenčni signal (nilsko rdeče barvilo); (C) prekrivanje rdečega in zelenega kanala. Rumena signal predstavlja kolokalizacijo rdečega in zelenega fluorescenčnega signala. (D) posnetek klasične presevne svetlobne mikroskopije iste celice. Skala je bila 10 μm .

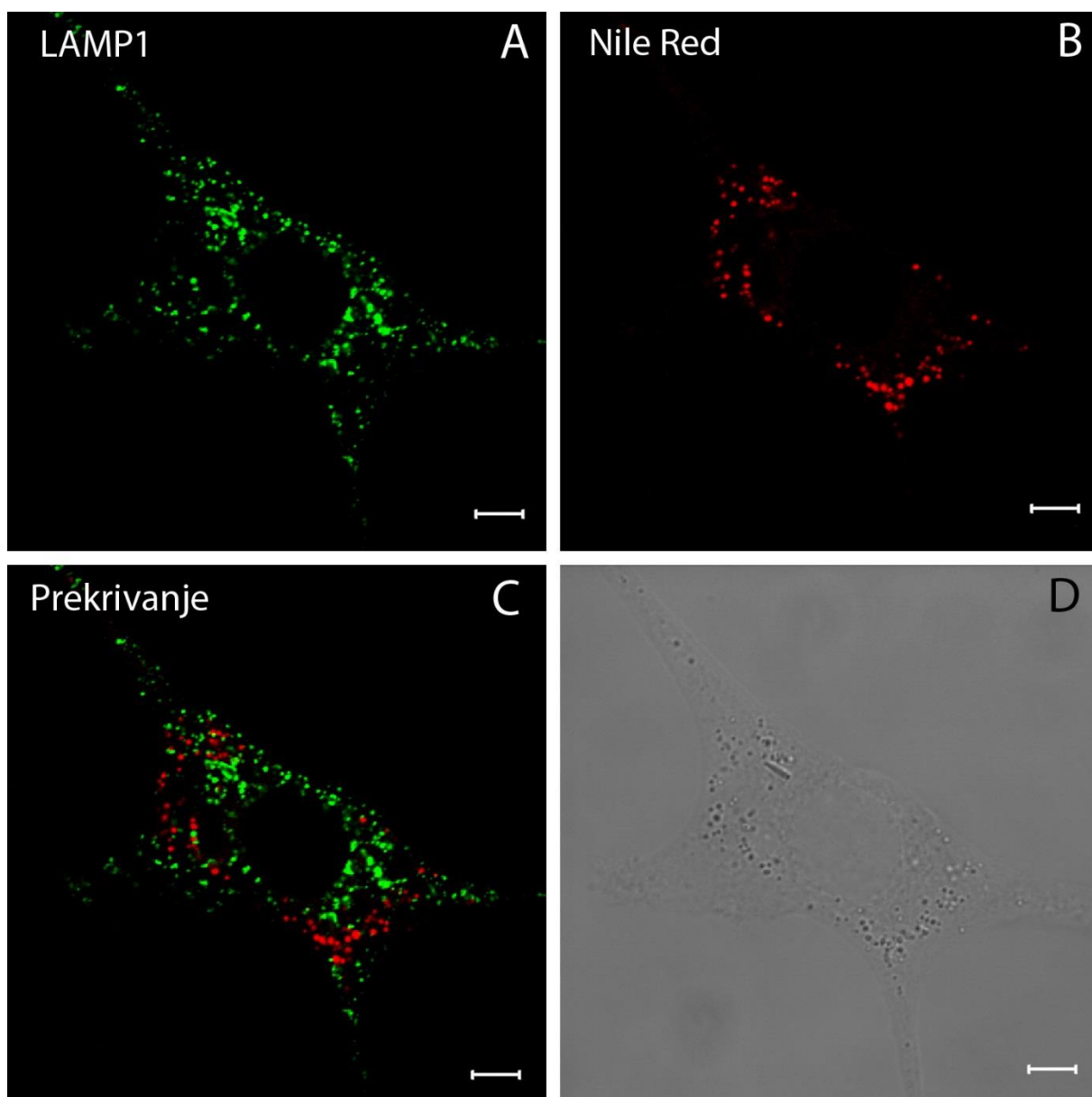
Perilipin 2 (PLIN2, tudi ADFP (adipofilin), ADRP (angl. »Adipose differentiation-related protein«), protein, ki je gradnik plašča LD, je bil kot označevalec LD že uporabljen na drugih celičnih tipih. Nas je zanimalo, če je prisoten tudi pri LD astrocitov in ali označuje iste celične organele kot nilsko rdeče barvilo. Perilipini so pomemben pri biogenezi in stabilizaciji LD, perilipinski »plašč« namreč ščiti lipide pred prezgodnjim delovanjem lipaz. Modifikacija perilipina je ključna pri mobilizaciji triacilgliceridov. Pri adrenergičnem odzivu, adrenalin aktivira kinaze (PKA), ki fosforilirajo perilipin. Fosforilacija povzroči destabilizacijo perilipinskega plašča, kar omogoča delovanje lipaz [10]. Iz slike 6 je razvidno, da je prekrivanje med rdečim signalom (nilsko rdeče) in zelenim signalom (perilipin 2) visoko, izračunan delež kolokalizacije je ~64 % (tabela 1) in se statistično značilno ne razlikuje glede na kolokalizacijo BODIPY 493/503 z nilsko rdečim barvilom (graf 1; ANOVA, Dunnov test), kar kaže na to da vsi trije označevalci LD (nilsko rdeče barvilo, BODIPY 493/503, perilipin 2) v astrocitih v kulturi označijo iste strukture, LD.



Slika 6.: Reprezentativni posnetek astrocita v kulturi označenega z nilsko rdečim barvilom in protitelesom proti perilipinu 2. Slike smo posneli s konfokalnim mikroskopom. (A) zelen fluorescenčni signal (protitelo proti perilipinu 2 in sekundarno protitelo označeno z Alexa Fluor 488); (B) rdeč fluorescenčni signal (nilsko rdeče barvilo); (C) prekrivanje rdečega in zelenega kanala. Rumena signal predstavlja kolokalizacijo rdečega in zelenega fluorescenčnega signala. Skala je 10 μ m.

4.2 Kolokalizacija lipidnih kapljic, označenih z nilsko rdečim barvilom, s poznimi endosomi/lizosomi in kislimi organeli

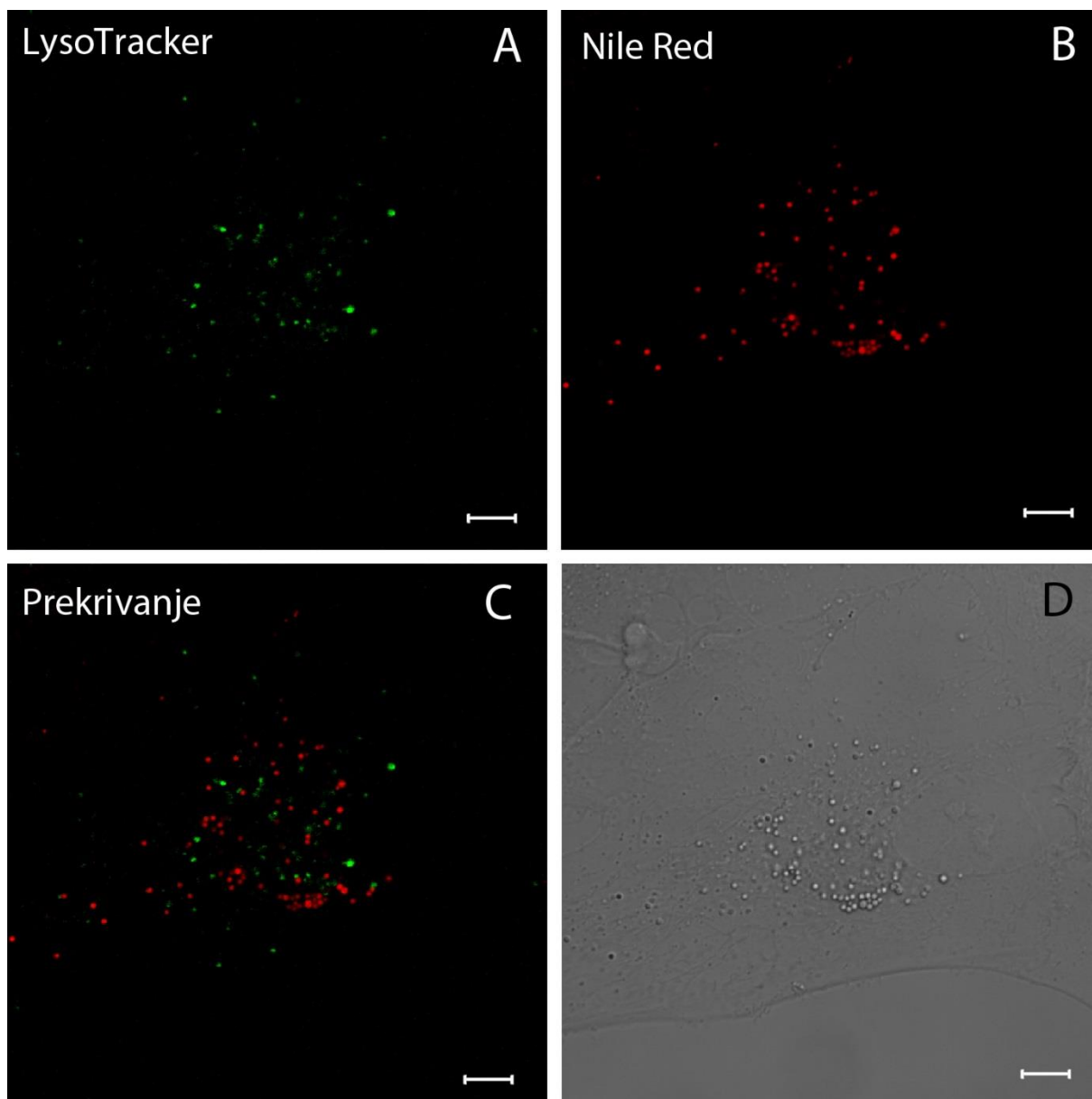
LD se v nekaterih celicah lahko nahajajo v avtofagosomih [11]. Avtofagija je kataboličen proces razgradnje celici lastnih sestavin s pomočjo lizosomov, katere lahko celica ponovno uporabi in s tem pridobi nujno potrebna hranila v času pomanjkanja hranil. Da bi preverili, ali se LD v astrociti nahajajo v lizosomih (300-500 nm) ali avtofagosomih, smo astrocite označili s protitelesi proti proteinu LAMP1 (»Lysosomal-Associated Membrane Protein 1«) in jih nato obarvali z nilsko rdečim barvilom. LAMP1 je transmembranski glikoprotein in se nahaja v membrani poznih endosomov/lizosomov, lahko pa tudi avtofagosomov. Predstavlja kar 50 % vseh proteinov v membrani lizosomov. Predvideva se, da sodeluje pri vzdrževanju integritete lizosomov, pH, ki je v poznih endosomih/lizosomih kisel, in pri presnovi lizosomov [13]. Prekrivanja med rdečim signalom (nilsko rdeče barvilo) in zelenim signalom (LAMP1) na slikah nismo opazili (slika 7). Delež kolokalizacije je bil zgolj ~10 % (graf 1, Tabela 1).



Slika 7: Reprezentativni posnetek astrocita v kulturi označenega z nilsko rdečim barvilom in protitelesom proti LAMP1. Sliko smo posneli s konfokalnim mikroskopom. (A) zelen fluorescenčni signal (protitelo proti LAMP1 in sekundarno protitelo označeno z Alexa Fluor 488); (B) rdeč fluorescenčni signal (nilsko rdeče); (C) prekrivanje rdečega in zelenega kanala. Rumena signal predstavlja kolokalizacijo rdečega in zelenega fluorescenčnega signala. Skala je 10 μm .

Poleg označevalcev lizosomalnih membran, kot je protein LAMP1, se za označevanje lizosomov in spremljanje avtofagocitoze uporablja tudi barvilo LysoTracker, ki se v celici kopiči v lizosomih in drugih kislih organelih. Žive celice smo obarvali z barvilom LysoTracker in nato še z nilsko rdečim barvilom. Izrazitega prekrivanja (rumenega signala) med rdečim signalom (nilsko rdeče) in zelenim signalom (LysoTracker) na slikah nismo opazili (slika 8). Delež kolokalizacije fluorescenčnega signala barvila LysoTracker z nilsko rdečim barvilom je bil majhen ~14 % (graf 1, Tabela 1) in se ni

statistično značilno razlikoval od deleža kolokalizacije med signaloma LAMP1 in nilsko rdečega barvila.



Slika 8: Reprezentativni posnetek astrocita v kulturi označenega z nilsko rdečim barvilom in fluorescenčnim označevalcem LysoTracker. Slike smo posneli s konfokalnim mikroskopom. (A) zelen fluorescenčni signal (LysoTracker); (B) rdeč fluorescenčni signal (nilsko rdeče); (C) prekrivanje rdečega in zelenega kanala. Rumena signal predstavlja kolokalizacijo rdečega in zelenega fluorescenčnega signala. Skala je 10 μ m.

Delež kolokalizacije LAMP1 oz. barvila LysoTracker z nilsko rdečim barvilom se je statistično značilno razlikoval od deležev kolokalizacije označevalcev LD BODIPY 493/503 in pa perilipina 2 ($P < 0,001$, ANOVA; Graf 1), kar kaže na to, da se LD v astrocitih v kulturi, ki je bogata s hranili, ne nahajajo v lizosomih ali avtofagosomih.

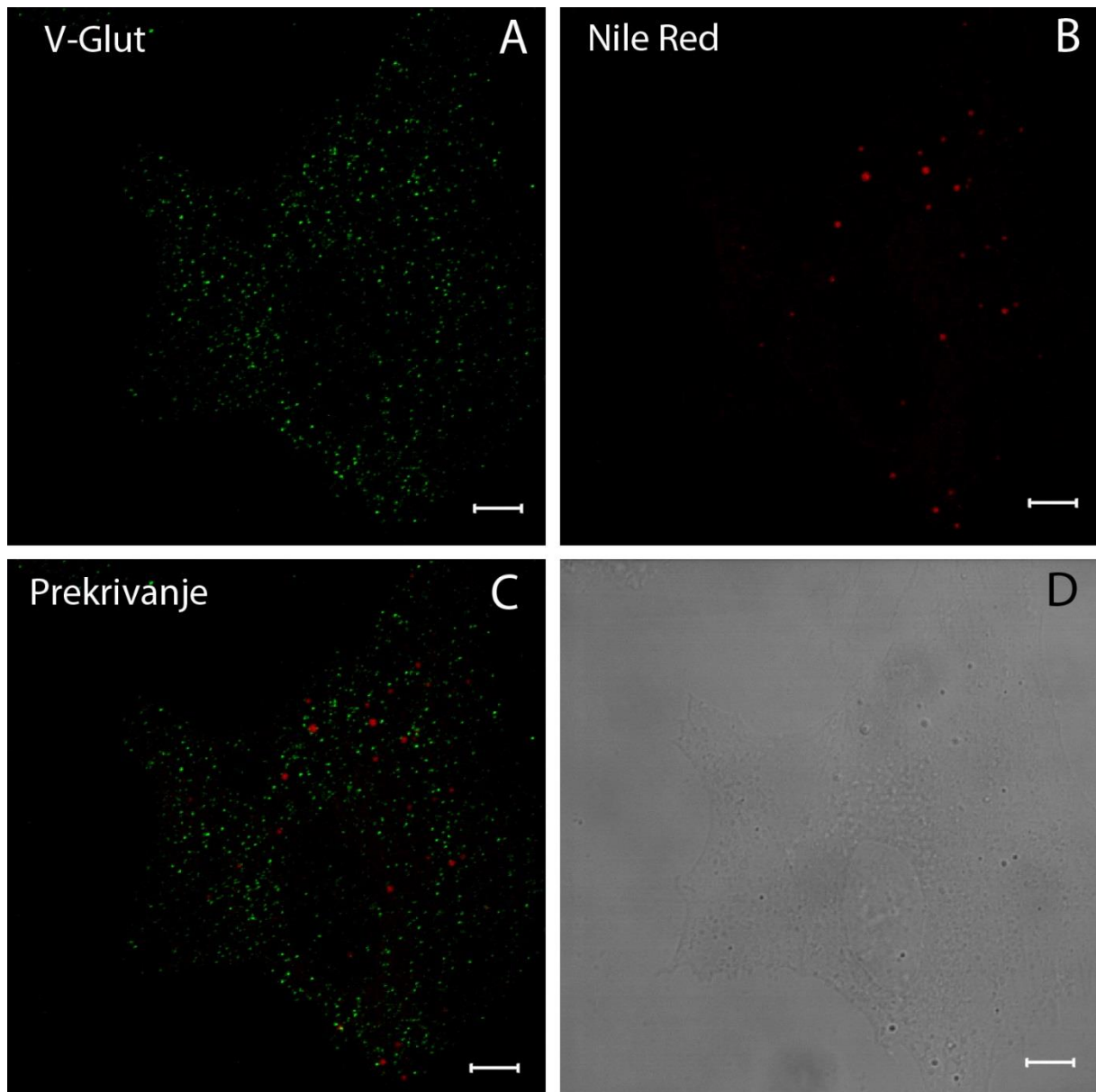
4.3 Kolokalizacija lipidnih kapljic, označenih z nilsko rdečim barvilom, z majhnimi sinaptičnim mešičkom podobnimi mešički

vGLUT1 (angl. »vesicular glutamate transporter 1«) je pomemben, od Na⁺ odvisen prenašalec glutamata, ki je v membrani mešičkov, v katerih se skladišči živčni prenašalec glutamat. Glutamat je eden najpomembnejših nevrottransmitorjev v CŽS, je tako v nevronih kot tudi v astrocitih. Mešički, ki vsebujejo glutamat, so v astrocitih po velikost podobni tistim v nevronih (~30-100 nm). Poimenujemo jih majhni sinaptičnim mešičkom podobni mikromešički ali SLMV (angl. »small synaptic-like microvesicles«). Ti mešički v astrocitih zelo verjetno vsebujejo tudi nevrottransmitor D-serin, ki je koaktivator glutamatnih receptorjev NMDA. Po stimulaciji lahko pride do sproščanja vsebine SLMV, glutamata in D-serina, iz celice v zunajcelični prostor v procesu eksocitoze [8].

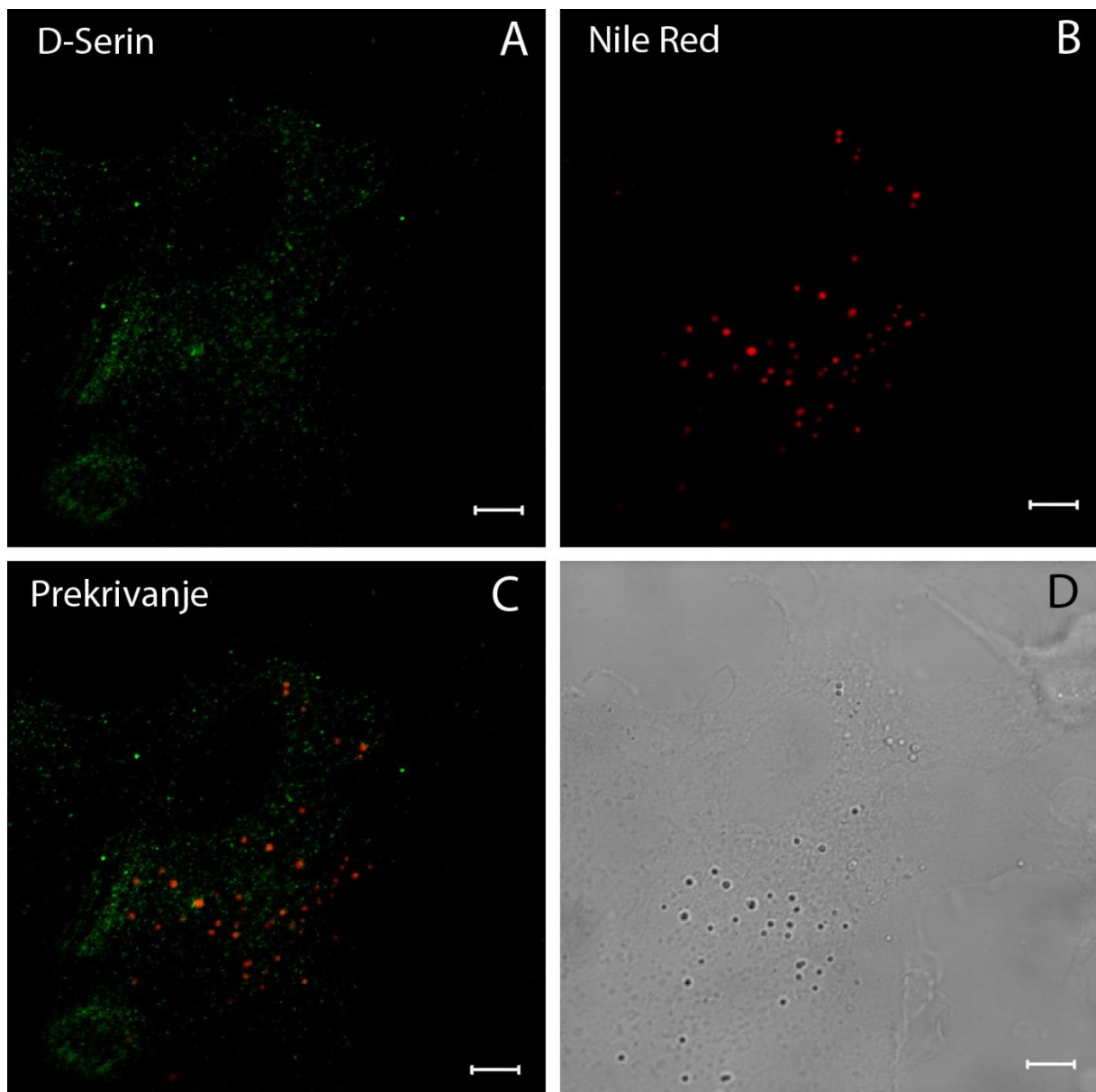
Da bi preverili morebitno interakcijo LD z SLMV v astrocitih smo mešičke imunocitokemijsko obarvali s protitelesi proti vGLUT1 (slika 9) oz. D-serinu (slika 10), nato pa smo celice obarvali še z barvilom Nile. Delež kolokalizacije fluorescenčnega signala vGLUT1 z nilsko rdečim barvilom je bil ~7 %, medtem ko je bil delež kolokalizacije fluorescenčnega signala D-serin ~35 % in se je statistično značilno razlikoval od deleža kolokalizacije vGLUT1 (graf 1, Tabela 1).

Iz rezultatov lahko sklepamo, da se D-serin in vGLUT1 nahajata v različnih subpopulacijah SLMV. V prid temu, je tudi opažanje, da se delež kolokalizacije vGLUT1 statistično značilno razlikuje od deležev kolokalizacije BODIPY 493/503 in perilipina 2 (graf 1; $P < 0,001$, ANOVA). Medtem, ko se je delež kolokalizacije D-serina z nilsko rdečim barvilom statistično značilno razlikoval od deleža kolokalizacije BODIPY 493/503 z nilsko rdečim barvilom, ne pa od deleža kolokalizacije perilipina 2 z nilsko rdečim barvilom (graf 1, ANOVA). Možno je, da se mešički z D-serinom nahajajo v bližini LS ali so z njimi v stiku, kar bi pojasnilo, zakaj ne opazimo razlike med kolokalizacijo D-serina z nilsko rdečim barvilom in perilipina 2 z nilsko rdečim barvilom.

V nadaljevanju bi lahko to preverili tako, da bi določili stopnjo prekrivanja perilipinskega plašča, ki bi ga označili s protitelesi proti perilipinu 2, z D-serinom.



Slika 9: Reprezentativni posnetek astrocita v kulturi označenega z nilsko rdečim barvilom in protitelesom proti vGLUT1. Slike smo posneli s konfokalnim mikroskopom. (A) zelen fluorescenčni signal (protitelo proti vGLUT1 in sekundarno protitelo označeno z Alexa Fluor 488); (B) rdeč fluorescenčni signal (nilsko rdeče); (C) prekrivanje rdečega in zelenega kanala. Rumena signal predstavlja kolokalizacijo rdečega in zelenega fluorescenčnega signala. Skala je 10 μ m.

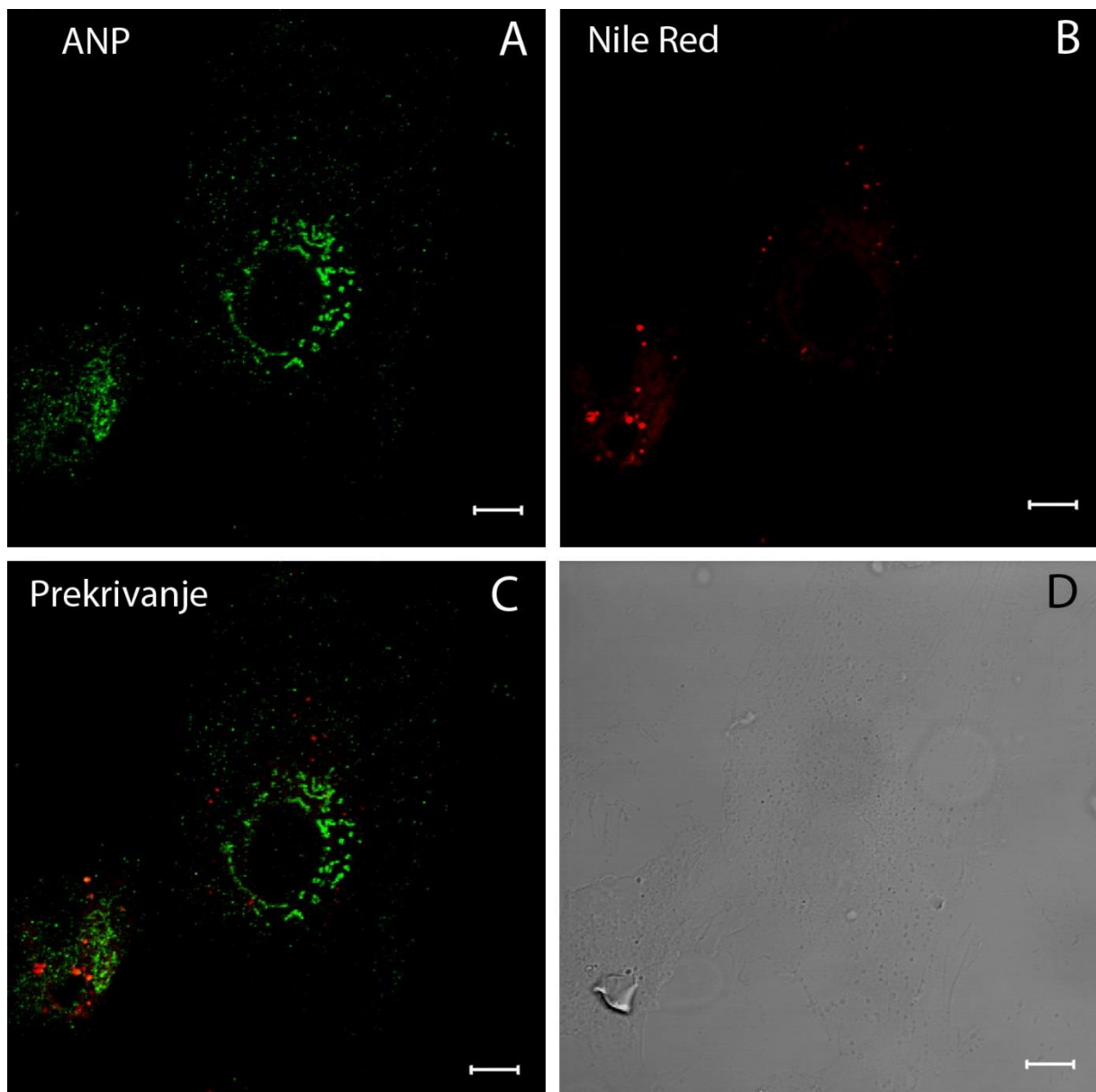


Slika 10: Reprezentativni posnetek astrocita v kulturi označenega z nilsko rdečim barvilom in protitelesom proti D-serinu. Slike smo posneli s konfokalnim mikroskopom. (A) zelen fluorescenčni signal (protitelo proti D-serinu in sekundarno protitelo označeno z Alexa Fluor 488); (B) rdeč fluorescenčni signal (nilsko rdeče); (C) prekrivanje rdečega in zelenega kanala. Rumena signal predstavlja kolokalizacijo rdečega in zelenega fluorescenčnega signala. Skala je 10 μm .

4.4 Kolokalizacija lipidnih kapljic, obarvanih z nilsko rdečim barvilom, s peptidergičnimi mešički

Astroцитi poleg lizosomalnih mešičkov vsebujejo tudi manjše peptidergične mešičke (100-600 nm), ki vsebujejo proteine in peptide, kot je hormon ANP (atrijski natriuretični peptid; Vardjan in Zorec, 2015). Z označevanjem hormona ANP smo želeli preveriti morebitno interakcijo LD s peptidergičnimi mešički v astroцитih. ANP je hormon z diuretičnim in vazorelaksantnim učinkom. Mehanizem delovanja in sproščanja je bolje preučen v srčnih miocitih, kjer je bil tudi odkrit. Točna funkcija v možganih še ni poznana, predvideva pa se, da kontrolira pretok krvi. ANP je v astroцитih shranjen v specifičnih sekretornih mešičkih, iz katerih se izloča v procesu eksocitoze [8].

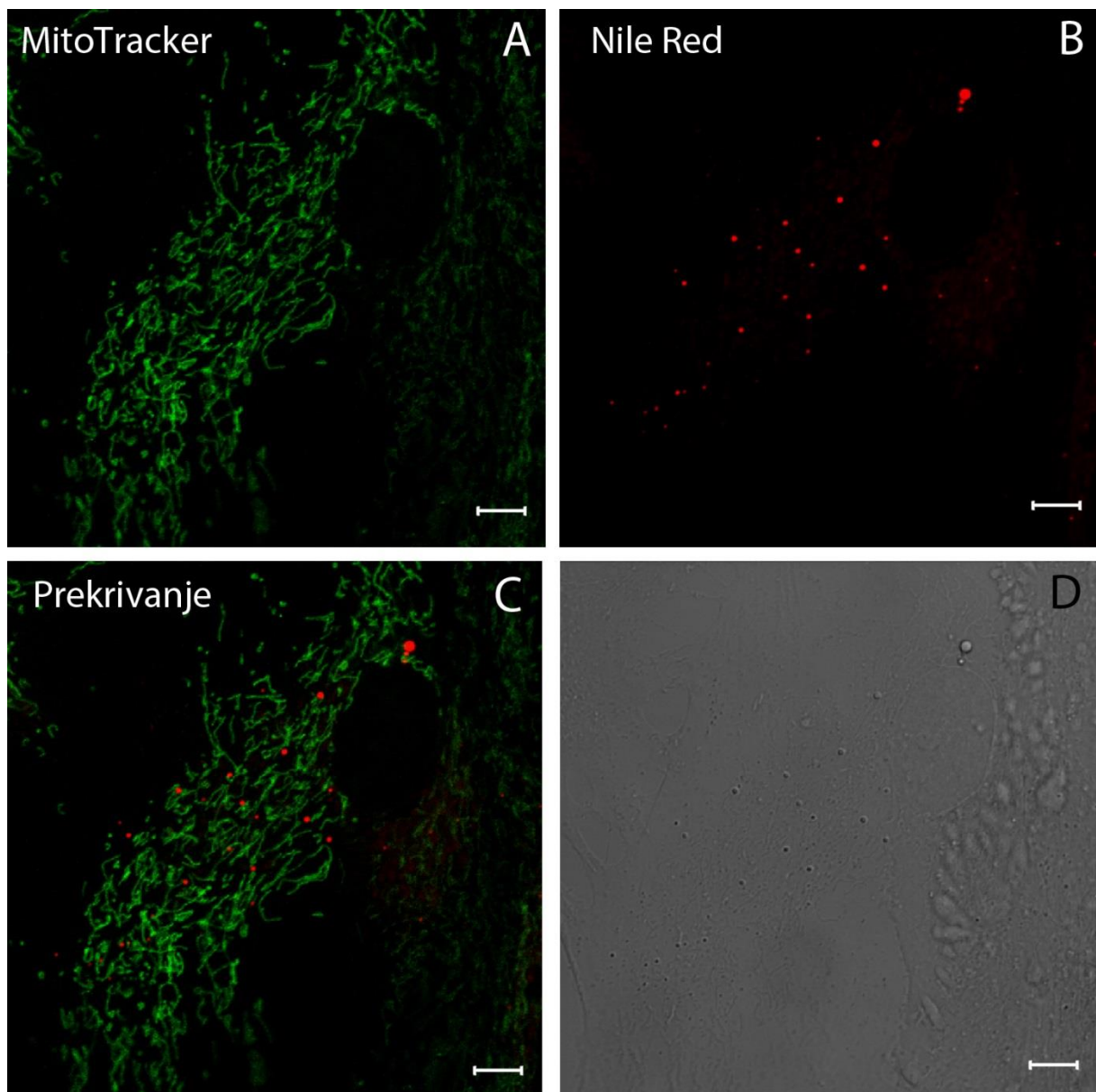
Prekrivanja (rumenega signala) med rdečim signalom (nilsko rdeče) in zelenim signalom (ANP) na slikah nismo opazili (slika 11). Delež kolokalizacije je znašal ~13 %, iz česar lahko zaključimo, da peptidergični mešički označeni s protitelesom proti ANP, predstavljajo drug tip organelov kot LD.



Slika 11: Reprezentativni posnetek astrocita v kulturi označenega z nilsko rdečim barvilom in protitelesom proti perilipinu. Sliko smo posneli s konfokalnim mikroskopom. (A) zelen fluorescenčni signal (protitelo proti ANP in sekundarno protitelo označeno z Alexa Fluor 488); (B) rdeč fluorescenčni signal (nilsko rdeče); (C) prekrivanje rdečega in zelenega kanal. Rumen signal predstavlja kolokalizacijo rdečega in zelenega fluorescenčnega signala. Skala je 10 μm .

4.5 Kolokalizacija lipidnih kapljic, obarvanih z nilsko rdečim barvilom, z mitohondriji

Mitohondriji so aktivno udeleženi v metabolizmu lipidov (β -oksidacija), zato nas je zanimala morebitna kolokalizacija oziroma bližina lipidnih kapljic in mitohondrijev. V ta namen smo žive celice obarvali z zelenim fluorescenčnim barvilom MitoTracker, ki specifično obarva mitohondrije, in hkrati z nilsko rdečim barvilom. Očitnega prekrivanja med zelenim fluorescenčnim signalom (MitoTracker) in rdečim fluorescenčnim signalom (nilsko rdeče) nismo opazili (slika 12), vseeno pa je delež kolokalizacije znašal ~34 % (tabela 1, Graf 1). Dokaj visok delež kolokalizacije je najverjetneje posledica bližine lipidnih kapljic in mitohondrijev, kar je jasno razvidno tudi iz slike 12.

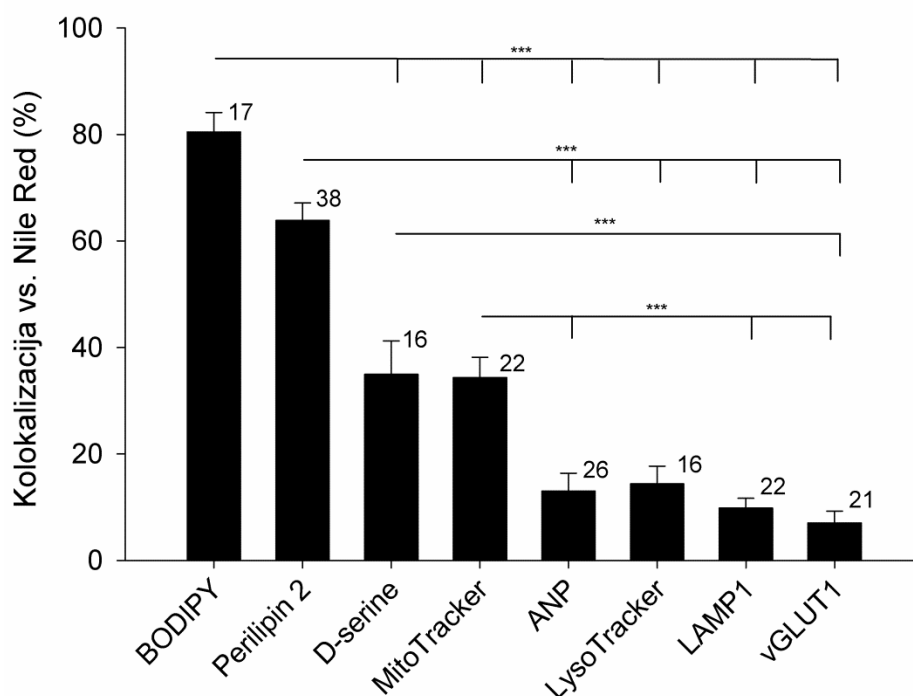


Slika 12: Reprezentativni posnetek astrocita v kulturi označenega z nilsko rdečim barvilom in fluorescenčnim označevalcem MitoTracker. Slike smo posneli s konfokalnim mikroskopom. (A) zelen fluorescenčni signal (MitoTracker); (B) rdeč fluorescenčni signal (nilsko rdeče); (C) prekrivanje rdečega in zelenega kanala. Rumena signal predstavlja kolokalizacijo rdečega in zelenega fluorescenčnega signala. Skala je 10 μm .

Tabela 1: Delež kolokalizacije fluorescenčno označenih celičnih organelov (zelene svetlobne točke) glede na lipidne kapljice obarvane z nilsko rdečim (rdeče svetlobne točke) v podganjih astrocitih v kulturi.

Označevalec	Celični organel	Kolokalizacija z nilsko rdečim (%) Povprečje ± SE	N
BODIPY 493/503	LD	80,47 ± 3,64	17
Perilipin 2	LD	63,83 ± 3,29	38
D-serine	SLMV	34,93 ± 6,31	16
MitoTracker	Mitohondriji	34,33 ± 3,82	22
ANP	Peptidergični mešički	13,01 ± 3,36	26
LysoTracker	Lizosomi/kisli mešički	14,36 ± 3,35	16
LAMP1	Lizosomi	9,84 ± 1,83	22
vGLUT1	SLMV	7,04 ± 2,20	21

N; število analiziranih celic; *SE*; standardna napaka povprečja; *LD*, lipidne kapljice, *SLMV*, small synaptic microvesicles (majhni sinaptičnim mešičkom podobni mikromešički)



Graf 1: Ponazoritev deleža prekrivanja (kolokalizacija) zelenih slikovnih točk glede na vse rdeče (nilsko rdeče) slikovne točke za različne fluorescenčne označevalce organelov. Stolpci ponazarjajo povprečne vrednosti ± standardno napako povprečja. Številke ob stolpcih prikazujejo število analiziranih celic. Z zvezdico so označene statistično značilne razlike (****P* < 0,001; enosmerna ANOVA z Dunnovim testom)

5 Razprava

Študije LD na različnih celicah (fibroblasti, adipociti, hepatociti, rakave celice) so pokazale, da je kopičenje LD v celicah pokazatelj celičnega stresa. Biogeneza LD se namreč v nekaterih celicah močno poveča v prisotnosti stresnih dejavnikov, kot je pomanjkanje hranil, kisika, v prisotnost vnetnih dejavnikov. Mehanizmi, ki uravnavajo homeostazo LD v celicah CŽS (nevroni, glija) so še dokaj neraziskani. Znano je, da je v normalnih fizioloških stanjih raven LD v CŽS nizka, biogeneza LD pa se poveča v patoloških stanjih, pri nastanku tumorjev, vnetjih in nevrodegenerativnih boleznih.

LD so pomemben vir maščobnih kislin, ki služijo kot rezervni vir energije (β -oksidacija v mitohondrijih) in holesterola, poleg tega so izvor prekurzorjev glavnih gradnikov membran – fosfolipidov. Nedavno je bilo pokazano, da kar 20 % celotne energije v CŽS izvira iz β -oksidacije maščobnih kislin. Med drugim se predvideva, da med povečano aktivnostjo nevronov v astrocitih sočasno z aerobno glikolizo, ki vodi v nastanek laktata, ki ga astrociti posredujejo nevronom, poteka tudi β -oksidacija maščobnih kislin v mitohondrijih [14]. Ali pri tem kot vir maščobnih kislin sodelujejo LD še ni bilo raziskano. Lipidi v CŽS sodelujejo tudi pri izgradnji in remodeliranju membran, kar je iz vidika nevroplastičnosti in sinaptogeneze izrednega pomena. V veliki meri tvorijo mielinske ovojnice, ki vsebujejo kar 80 % lipidov, in s tem omogočajo hitro širjenje električnega signala po aksonih. Propad oligodendrocitov ali nepravilna izgradnja mielinskih ovojnic vodi v številna patološka stanja (multipla skleroza, levkodistrofije). Zanimivo je, da so LD opazili v neposredni bližini propadajočih mielinskih ovojnic. Študije presnove lipidov in pri tem sodelujočih organelov kot so LD, avtofagosomi, mitohondriji, peroksisomi so zato korak v pravo smer k reševanju uganke delovanja človeških možganov.

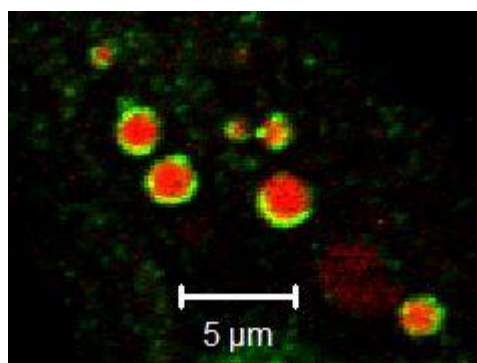
Molekularni mehanizmi uravnavanja biogeneze in razgradnje LD v celicah glije tako v fizioloških kot tudi patoloških stanjih CŽS so slabo raziskani. Biogeneza LD se v mikrogliji poveča v prisotnosti dejavnikov vnetja, kot je lipopolisaharid LPS [15]. Nedavno je bilo pokazano, da astrociti v kulturi vsebujejo LD, ki se ob stimulaciji z ATP izločajo iz celic v zunajcelični prostor z odcepljanjem velikih mešičkov (premera do 8 μ m) s plazemske membrane. Ti mešički naj bi vsebovali tudi mitohondrije in ATP [12].

Kakšna je njihova vloga *in vivo* v CŽS še ni raziskano. LD pa so vpletene tudi v razvoj nevrodegenerativnih bolezni. V začetnih fazah nevrodegeneracije se zaradi okvare mitohondrijev in nastanka reaktivnih kisikovih spojin (ROS) v nevronih posledično poveča biogeneza LD v celicah glije, kar spodbudi sam proces nevrodegeneracije [16].

Tekom biogeneze in razgradnje so LD lahko v stiku z različnimi znotrajceličnimi organeli, z ER, kjer najverjetneje poteka njihova biogeneza, avtofagosomi, v katerih se razgrajujejo, in pa mitohondriji, kjer poteka razgradnja maščobnih kislin, katerih vir so najverjetneje LD. V astrocitih, najštevilčnejših celicah glije v CŽS, subcelična lokalizacije LD še ni bila raziskana. V našem delu smo želeli določiti subcelično lokalizacijo LD v podganjih kortikalnih astrocitih v kulturi, kar bi pripomoglo k razumevanju metabolizma LD v astrocitih. V ta namen smo v celicah sočasno s fluorescenčnimi označevalci označili različne celične organele (zelena fluorescenčna barvila, imunocitokemijsko označevanje s protitelesi) in pa LD (nilsko rdeče barvilo). Celice smo nato opazovali s konfokalnim mikroskopom in na zajetih posnetkih analizirali kolokalizacijo (prekrivanje) fluorescenčno označenih zelenih in rdečih svetlobnih točk, pri tem pa smo uporabili za ta namen izdelan računalniški program (Kreft in sod. 2004).

Naša analiza je pokazala, da LD obarvane z nilsko rdečim barvilom v veliki meri kolokalizirajo s perilipinom 2 (~60 %) in označevalcem LD BODIPY 493/503 (~80 %). Visok odstotek kolokalizacije označevalcev BODIPY 493/503 in perilipina 2 z nilsko rdečim barvilom je pričakovan. Oba označevalca sta bila namreč predhodno že uporabljena kot označevalca LD v drugih celicah. S tem smo potrdili, da so opazovani organeli, označeni z nilsko rdečim barvilom, res LD in ne morda kakšne druge celične strukture. Pri interpretaciji rezultatov se moramo dobro zavedati delovanja programa in pa načina samega označevanja. Med mikroskopiranjem preparatov označenih s protitelesi proti perilipinu 2 smo namreč opazili, da zelen signal (perilipin 2) kolokalizira z rdečim (nilsko rdeče barvilo) le na obrobju z nilsko rdečim barvilom označenih LD, a še tam samo delno (slika 13). Poleg tega je bila kolokalizacija perilipina glede na BODIPY manjša (60 % vs. 80 %). Opaženje je bilo bolj očitno pri večjih LD, kjer je bila zelo jasno razvidna z nilsko rdečim barvilom obarvana sredica LD, okrog le-te pa je bil zelen fluorescenčni signal, ki je najverjetneje predstavljal perilipinski plašč. Pri označevanju z barvilom BODIPY, ki tako kot nilsko rdeče barvilo obarva nevtralne lipid

v sredici LD, takšnih obrob po pričakovanjih nismo opazili. Pri manjših LD je bil perilipinski obroč manj izrazit ali celo neopazen, predvidevamo, da zaradi omejene ločljivosti konfokalnega mikroskopa (meja ločljivosti je ~250 nm). Če bi želeli to opažanje potrditi tudi za LD manjših velikosti, bi morali pri opazovanju uporabiti super-resolucijsko mikroskopijo, kot sta na primer mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo vzorca (SIM, angl. »structured illumination microscopy«) ter mikroskopija z vzbujenim praznjenjem emisije (STED, angl. »stimulated emission depletion«), kjer lahko dosežemo večje ločljivosti (meja ločljivosti je 30-120 nm). Podobno kot v naši študiji, so v astrocitih protitelesa proti LAMP1, ki je lizosomski membranski protein, pri lizosomih večjih velikosti obarvala samo zunanji rob lizosomov, notranjost lizosomov pa je bila obarvana z rdečim dekstranom [17]. Iz naštetih opazovanj lahko sklepamo, da kljub temu, da med posameznimi organeli z uporabo računalniškega programa ne dobimo visoke stopnje kolokalizacije, to še ne pomeni, da fluorescenčni označevalci ne označijo istega tipa organela.



Slika 13: Povečava večjih lipidnih kapljic, kjer se jasno vidi lokalizacija zelenega signala na zunanjem robu lipidnih kapljic.

Znatna je bila tudi kolokalizacija LD označenih z nilsko rdečim barvilom in mitohondrijskega označevalca MitoTracker (~35 %). Dokaj visok delež kolokalizacije z mitohondriji se zdi intuitiven. V mitohondrijih namreč poteka metabolizem lipidov (β -oksidacija), kar iz funkcionalnega vidika predvideva bližino struktur, ki bi bile vir lipidov (LD). Možno pa je tudi, da je opažena bližina mitohondrijev in LD le posledica številnih mitohondrijev v astrocitih, zaradi česar je večji del celice pri dani ločljivosti konfokalnega mikroskopa obarvan z barvilom MitoTracker. Natančneje bi lahko interakcije mitohondrijev in LD proučili s super-resolucijsko mikroskopijo STED in SIM ali elektronsko mikroskopijo, kjer je meja ločljivosti lahko tudi 50 pm.

Kolokalizacija mešičkov obarvanih z nilsko rdečim barvilom in lizosomov (LAMP1), kislimi mešički (LysoTracker), SLMV (vGLUT1) in peptidergičnimi mešički (ANP) je bila majhna (<15 %) in verjetno bolj posledica naključnih interakcij. Majhna kolokalizacija med vGLUT1-označenimi SLMV in peptidergičnimi mešički je bila pričakovana. Pričakovali pa smo, glede na to, da lahko v nekaterih celicah poteka razgradnja LD v avtofagosomih, da bomo opazili višjo stopnjo kolokalizacije LD označenih z nilsko rdečim barvilom in mešički označenimi z barvilom LysoTracker in protitelesom LAMP1. Glede na to, da je razgradnja LD v avtofagosomih v nekaterih celicah uravnana in se sproži v času povečanih potreb po energiji, bi bilo v prihodnje smiselno preveriti kolokalizacijo LD in mešičkov označenih s protitelesom LAMP1 in barvilom LysoTracker v astrocitih med stanjem stradanja.

Zanimivo je, da smo opazili dokaj visok delež kolokalizacije (~35 %) med LD obarvanimi z nilsko rdečim barvilom in celičnimi strukturami obarvanimi s protitelesi proti D-serinu, ki se v astrocitih tako kot glutamat kopiči v SLMV. Protitelesa proti D-serinu so poleg izrazitih točkastih struktur, ki najverjetneje predstavljajo z D-serinom označene mešičke, obarvala tudi ozadje v celici, in to navkljub številnim optimizacijam postopka imunocitokemijskega označevanja. Možno je, da protitelesa označijo D-serin v citosolu celic, še preden se le-ta preko prenašalcev prenese v notranjost SLMV. LD lahko asociirajo s citosolnimi proteini, morda tudi aminokislinami, kot je D-serin, kar bi pojasnilo dokaj visoko stopnjo kolokalizacije med LD in D-serinom. To bi tudi pojasnilo, zakaj pri označevanju glutamatnih SLMV, kjer nismo označili samega glijotransmiterja, temveč smo uporabili protitelesa proti vGLUT1 (glutamatni transporter v membrani SLMV), nismo imeli težav z označevanjem ozadja. V prihodnje bi bilo torej za označevanje D-serinskih SLMV bolje razviti protitelo proti vezikularnemu transporterju za D-serin vSERT. Manjša verjetnost pa je, da SLMV, ki vsebujejo D-serin, predstavljajo populacijo mešičkov, ki se razlikuje od glutamatnih SLMV, in da so le-ti v stiku z LD, tako kot mitohondriji, kjer smo opazili podobno stopnjo kolokalizacije z LD (~35 %).

V skladu z raziskavami na drugih celicah so naše študije pokazale, da so LD v astrocitih v kulturi samostojni organeli, ki se zelo verjetno nahajajo v neposredni bližini mitohondrijev, kjer poteka razgradnja maščobnih kislin. Vsebujejo perilipine, proteine vpletene v uravnavanje metabolizma LD, kar kaže na to, da gre za dinamične organele,

katerih biogeneza/razgradnja v astrocitih je uravnana. V prihodnjih raziskavah bi bilo zanimivo preveriti kolokalizacijo LD v astrocitih z ER, kjer naj bi potekala biogeneza LD. Smiselno bi bilo tudi opazovati metabolizem LD v mešani kulturi astrocitov in nevronov in tudi *in situ* v tkivnih rezinah, kjer pa bi bilo potrebno ločiti astrocite od nevronov in ostalih celic s specifičnimi označevalci za posamezen tip celice. Znano je, da sta metabolizma nevronov in astrocitov sklopljena preko laktata, glutamata in glukoze, možno pa je, da sta sklopljena tudi preko maščobnih kislin. Astrocitne LD lahko za nevrone predstavljajo vir maščobnih kislin (kot je glikogen vir glukoze). Nedavne študije so pokazale, da se iz astrocitov v kulturi LD lahko izločijo v zunajcelični prostor v velikih mešičkih, ki se odcepijo od plazemske membrane, kar morda predstavlja način dostave LD nevronom.

Po pridobitvi informacij o subcelični lokalizaciji LD, količini LD in mehanizmi uravnavanja LD v astrocitih v fizioloških stanjih bi se bilo smiselno usmeriti na raziskave LD v različnih patoloških stanjih (živalski modeli nevrodegenerativnih bolezni). Zanimivo bi bilo preveriti vlogo LD pri razvoju multiple skleroze, kjer je povezava med metabolizmom lipidov in propadom mielinskih ovojnic (oligodendrocitov) dokaj verjetna. Celoten metabolizem je močno spremenjen tudi v rakavih celicah, zato bi bilo zanimivo preučiti, kakšna je vloga LD v glioblastomu, kjer se količina LD v celicah poveča. Poznavanje vloge metabolizma LD v patoloških stanjih bi tako lahko pripomoglo k razvoju novih zdravil.

6 Sklepne ugotovitve

Potrditev kolokalizacije lipofilnega fluorescenčnega nilsko rdečega barvila z markerjem lipidnih kapljic – perilipinom , dokazuje obstoj LD v kortikalnih astrocitih podgan. V povezavi s prejšnjimi raziskavami prisotnost perilipina potrjuje aktivno regulacijo homeostaze in dinamičnost LD

Glede na stopnjo kolokalizacije LD in mitohondrijev lahko sklepamo, da se LD nahajajo v bližini mitohondrijev zaradi β -oksidacije maščobnih kislin, ki v njih poteka.

Naša opažanja namigujejo tudi na interakcije LD z D-serinskimi SLMV, vendar pa bi bilo v tem primeru potrebno izvesti dodatne raziskave.

Iz nizke stopnje kolokalizacije v primerih označevanja ANP, LAMP1, vGLUT ter označevanja z barvilom LysoTracker, lahko sklepamo, da so interakcije LD s peptidergičnimi vezikli, lizosomi in glutamatnimi SLMV malo verjetne

V prihodnosti bi bilo zanimivo raziskave razširiti še na ostale celične organele ter različna patološka stanja nevrodegenerativnih in demielinirajočih bolezni.

7 Literatura

- [1] A. Verkhratsky, V. Parpura, and J. J. Rodríguez, "Where the thoughts dwell: The physiology of neuronal-glia 'diffuse neural net,'" *Brain Res. Rev.*, vol. 66, no. 1–2, pp. 133–151, 2011.
- [2] N. J. Allen and B. a Barres, "Neuroscience: Glia - more than just brain glue.," *Nature*, vol. 457, no. 7230, pp. 675–677, 2009.
- [3] S. T. Dheen, C. Kaur, and E.-A. Ling, "Microglial activation and its implications in the brain diseases.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, no. 11, pp. 1189–1197, 2007.
- [4] D. D. Wang and A. Bordey, "The astrocyte odyssey," *Prog. Neurobiol.*, vol. 86, no. 4, pp. 342–367, 2008.
- [5] M. Bélanger, I. Allaman, and P. J. Magistretti, "Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation," *Cell Metab.*, vol. 14, no. 6, pp. 724–738, 2011.
- [6] M. Kreft, L. K. Bak, H. S. Waagepetersen, and A. Schousboe, "Aspects of astrocyte energy metabolism, amino acid neurotransmitter homeostasis and metabolic compartmentation," *ASN Neuro*, vol. 4, no. 3, pp. 187–199, 2012.
- [7] L. K. Bak, A. Schousboe, and H. S. Waagepetersen, "The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer," *J. Neurochem.*, vol. 98, no. 3, pp. 641–653, 2006.
- [8] V. Parpura and R. Zorec, "Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes," *Brain Res. Rev.*, vol. 63, no. 1–2, pp. 83–92, 2010.
- [9] A. Pol, S. P. Gross, and R. G. Parton, "Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites," *J. Cell Biol.*, vol. 204, no. 5, pp. 635–646, 2014.

- [10] D. J. Murphy and J. Vance, "Mechanisms of lipid-body formation," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 24, no. 3, pp. 109–115, 1999.
- [11] Y. Uchiyama and E. Kominami, "Autophagy Regulates Lipid Droplet Formation and Adipogenesis," 2013.
- [12] A. M. Falchi, V. Sogos, F. Saba, M. Piras, T. Congiu, and M. Piludu, "Astrocytes shed large membrane vesicles that contain mitochondria, lipid droplets and ATP," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 139, no. 2, pp. 221–231, 2013.
- [13] E. L. Eskelinen, "Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy," *Mol. Aspects Med.*, vol. 27, no. 5–6, pp. 495–502, 2006.
- [14] A. Panov, Z. Orynbayeva, V. Vavilin, and V. Lyakhovich, "Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [15] A. Khatchadourian, S. D. Bourque, V. R. Richard, V. I. Titorenko, and D. Maysinger, "Dynamics and regulation of lipid droplet formation in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglia," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1821, no. 4, pp. 607–617, 2012.
- [16] L. Liu, K. Zhang, H. Sandoval, S. Yamamoto, M. Jaiswal, E. Sanz, Z. Li, J. Hui, B. H. Graham, A. Quintana, and H. J. Bellen, "Article Glial Lipid Droplets and ROS Induced by Mitochondrial Defects Promote Neurodegeneration," *Cell*, vol. 160, no. 1–2, pp. 177–190, 2015.
- [17] N. Vardjan, M. Gabrijel, M. Potokar, U. Švajger, M. Kreft, M. Jeras, Y. de Pablo, M. Faiz, M. Pekny, in R. Zorec, "IFN- γ -induced increase in the mobility of MHC class II compartments in astrocytes depends on intermediate filaments," *J. Neuroinflammation*, vol. 9, št. 1, str. 144, 2012.
- [18] <http://www.networkglia.eu/en>, (20.8.2015), Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin (MDC) Berlin-Buch
- [19] <https://en.wikipedia.org/wiki/Myelin>, (25.8.2015), ustvarjeno na wikipediji 1.7.2006, uporabnik Arcadian