

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ajda FLAŠKER

**MERITVE FUZIJSKE PORE PRI PODGANJIH
LAKTOTROFIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ajda FLAŠKER

MERITVE FUZIJSKE PORE PRI PODGANJIH LAKTOTROFIH

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

MEASURMENTS OF FUSION PORE IN RAT LACTOTROPHS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za nevroendokrinologijo-molekularno celično fiziologijo na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija oddelka za biotehnologijo je dne 26. 03. 2009 odobrila naslov diplomskega dela in za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Marko Krefta, za recenzenta pa izr. prof. dr. Gregorja Majdiča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Član: izr. prof. dr. Gregor MAJDIČ

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Center za genomiko živali

Datum zagovora: 07. 09. 2009

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloge, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Ajda FLAŠKER

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 576.385:591.14:612.014.42(043.2)
KG	metoda vpete napetosti krpice membrane, oblika pritrjene celice/membranska kapacitivnost/eksocitoza/prolaktin/izločanje hormona/podganji laktotrofi/fuzijska pora/sfingozin
AV	FLAŠKER, Ajda
SA	KREFT, Marko (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2009
IN	MERITVE FUZIJSKE PORE PRI PODGANJIH LAKTOTROFIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 43 str., 20 sl., 49 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Z elektrofiziološkimi metodami smo raziskali, ali molekula sfingozina vpliva na dinamiko posameznih eksocitoznih dogodkov in na dinamiko fuzijske pore. Merili smo lastnosti elementarnih dogodkov fuzije mešička s plazmalemo celic hipofize pri kontrolnih razmerah in po stimulaciji s sfingozinom. Žeeli smo ugotoviti, na katere parametre eksocitoze vpliva sfingozin na laktotrofnih celicah. Merili smo izločevalno aktivnost posameznih laktotrofov z elektrofiziološko metodo vpete napetosti krpice membrane s konfiguracijo pritrjene celice (ang. cell-attached patch-clamp), s katero smo merili spremembe membranske kapacitivnosti (C_m). Pri meritvah s stimulacijsko raztopino smo po stimulaciji opazili daljše dolžine reverzibilnih eksocitoznih dogodkov, iz česar sklepamo, da sfingozin stabilizira fuzijsko poro in tako podaljša njen čas trajanja odprtosti in časovne intervale med dogodki. Amplitude diskretnih skokov membranske kapacitivnosti po stimulaciji s sfingozinom so se statistično značilno zmanjšale. To smo pripisali irreverzibilni fuziji predhodno večjih mešičkov s plazmalemo in nato s pojavitvijo manjših mešičkov, ki so se pojavili v bližini plazmaleme ter se zlivajo z njo. Pri meritvah s kontrolno raztopino nismo opazili statistično značilnih sprememb pred in po stimulaciji. Raziskava je potrdila našo hipotezo, da je eksocitoza pri laktotrofih sesalcev odvisna od stimulacije s sfingozinom. Sfingozin podaljša čas trajanja odprtosti fuzijske pore, kar verjetno zveča izločanje prolaktina v zunajcelični prostor.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 576.385:591.14:612.014.42(043.2)
CX	cell-attached patch-clamp/membrane capacitance/exocytosis/prolactin/hormone secretion/rat lactotrophs/fusion pore/sphingosine
AU	FLAŠKER, Ajda
AA	KREFT, Marko (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Program in Biotechnology
PY	2009
TI	MEASURMENTS OF FUSION PORE IN RAT LACTOTROPHS
DT	Diplomsko delo (University studies)
NO	X, 43 p., 20 fig., 49 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Using electrophysiological methods we have been investigating the role of sphingosine on the dynamics of individual exocytotic events and dynamics of the fusion pore. We have measured the frequency of elementary events of vesicles fusion to the plasma membrane in pituitary cells in normal and in sphingosine-stimulated conditions. We investigated which parameters of the exocytotic event were affected by sphingosine in lactotrophs cells. We have measured the exocytosis of isolated lactotrophs by electrophysiological method cell-attached patch-clamp, specifically, by monitoring the changes in membrane capacitance (C_m). The average fusion pore dwell-time was increased in measurements after the addition of sphingosine containing solution. We propose that sphingosine stimulates fusion pore formation and stabilizes its open state. The time intervals between ensuing events were increased after the stimulation. The amplitude of elementary events after stimulation with sphingosine was significantly smaller. This was probably due to irreversible fusion of bigger vesicles with the cell membrane, and subsequent fusion of smaller ones. In measurements following the stimulation with the control solution, we did not observe significant changes in parameters. Our study confirmed our hypothesis that exocytosis in mammalian lactotrophs is directly stimulated by sphingosine. Sphingosine stimulates increase of fusion pore dwell-time, which likely leads to increased secretion of prolactine to cell exterior.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
SLOVARČEK	IX
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	1
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MERITVE MEMBRANSKE KAPACITIVNOSTI IN ELEKTROFIZIOLOŠKA METODA PATCH-CLAMP« (METODA VPETE NAPETOSTI KRPICE MEMBRANE)	3
2.2 EKSOCITOZA	5
2.3 PROLAKTIN	6
2.3.1 Biološko delovanje prolaktina	7
2.3.2 Bolezenska stanja in zdravljenje	8
2.3.2.1 Hiperprolaktinemija	8
2.3.2.2 Hipoprolaktinemija	9
2.3.2.3 Makroprolaktinemija	9
2.4 LAKTOTROFI	9
2.4.1 Hipofiza	9
2.4.2 Morfologija laktotrofov	10
2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na izločanje PRL	11
2.4.4 Hipotalamo-hipofizni dopaminski sistem	13
2.5 SFINGOZIN	14
3 MATERIALI IN METODE	16

3.1 POTEK DELA.....	16
3.2 MATERIALI	17
3.2.1 Primarna celična kultura.....	17
3.2.2 Gojišče in raztopine	17
3.2.2.1 Priprava medija F-12 s kanamicinom.....	17
3.2.2.2 Sestava hranilnega medija za laktotrofe (za pripravo 100 ml raztopine): ...	17
3.2.2.3 Zunajcelična raztopina (za pripravo 200 ml raztopine):.....	17
3.2.2.4 Stimulacijska raztopina	18
3.2.2.5 Kontrolna raztopina	18
3.2.3 Oprema in aparature	18
3.2.3.1 Droben laboratorijski material:.....	18
3.2.3.2 Aparature:	19
3.2.3.3 Programska oprema:	20
3.3 METODE	20
3.3.1 Izolacija laktotrofov iz podganje hipofize	20
3.3.2 Priprave krovnih stekelc	21
3.3.3 Izdelava steklenih mikropipet	21
3.3.4 Mikroskopiranje	22
3.3.5 Meritve skokovitih sprememb membranske kapacitivnosti z elektrofiziološko metodo »patch-clamp« (metoda vpetosti krpice membrane)	22
3.3.6 Analiza meritev.....	25
3.3.7 Statistične metode, uporabljene pri analizi rezultatov	26
4 REZULTATI.....	27
4.1 STIMULACIJA S SFINGOZINOM PODALJŠA DOLŽINE DOGODKOV IN ČASOVNE INTERVALE MED DOGODKI	27
4.2 SFINGOZIN POVZROČI ZMANJŠANJE AMPLITUDU DOGODKOV.....	29
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	34
5.1 RAZPRAVA.....	34
5.2 SKLEPI.....	35
6 POVZETEK.....	37
7 VIRI	39

ZAHVALA

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz postopka doseganja različnih konfiguracij patch-clamp.....	4
Slika 2: Dinamičen večstopenjski pogled na hipofizno fuzijsko »napravo«.	6
Slika 3: Shematski prikaz odrasle hipofizne žleze.....	10
Slika 4: Pregled uravnanega izločanja prolaktina.....	12
Slika 5: Shematski prikaz povezave med hiopotalamusom in hipofizo	14
Slika 6: Kemijska struktura sfingozina.	15
Slika 7: Shematski prikaz sfingozin-posrednega sproščanja v citoplazemski del sinaptobrevina.....	15
Slika 8: Hodogram poskusa.	16
Slika 9: Steklene mikropipete.	22
Slika 10: Mikroskop in mikromanipulator.....	22
Slika 11: Laktotrof in steklena merilna pipeta.....	24
Slika 12: Fotografija dela merilnega sistema.....	24
Slika 13: Shema merilnega sistema	25
Slika 14: Parametri, ki smo jih izračunali iz koordinat časovne osi in amplitud.....	26
Slika 15: Relativne dolžine dogodkov (dolžine odprtosti fuzijske pore) pred in po stimulaciji s kontrolno ali stimulacijsko raztopino.....	28
Slika 16: Relativni intervali med dogodkoma pred in po stimulaciji s kontrolno ali stimulacijsko raztopino.....	29
Slika 17: Primer diskretnih skokov v membranski kapaciteti pred stimulacijo s stimulacijsko raztopino.....	30
Slika 18: Primer diskretnih skokov v membranski kapaciteti po stimulaciji s sfingozinom (stimulacijskim medijem)	31
Slika 19: Relativne amplitude fuzijskih dogodkov pred in po stimulaciji s kontrolno ali stimulacijsko raztopino.....	32
Slika 20: Povezava med amplitudami dogodkov navzgor in navzdol pred ter po stimulaciji pri meritvah, stimuliranimi s sfingozinom..	33

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACTH	adrenokortikotropni hormon
BSA	goveji serumski albumin (ang. Albumin, bovine)
C _m	membranska kapacitivnost
D2R	dopaminski D2 receptor
DA	dopamin
DMEM	Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija
DMSO	dimetilsulfoksid
fF	femto farad (10^{-15} F)
FSH	folikel stimulirajoč hormon
GABA	γ -aminomaslena kislina (ang. γ -aminobutyric acid)
GH	rastni hormon
I _m	imaginarna komponenta toka
LH	luteinizirajoči hormon
mOsM	milni osmol (10^{-3} OsM)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (ang. messenger ribonucleic acid)
mV	milni volt (10^{-3} V)
MSH	melanocitni stimulirajoč hormon
M Ω	mega ohm (10^6 Ω)
NT	nevrotenzin
OT	oksitocin
pA	piko amper (10^{-12} A)
PIF	prolaktin zavirajoči faktor
PKC	protein kinaza C
PL	placentni laktogen
PLL	poli-L-lizin
PRF	prolaktin sproščajoči faktor
PRL	prolaktin
PRLR	prolaktinski receptor
PVH	paraventrikularno jedro
R _e	realna komponenta sinusnega toka
S1P	sfingozin-1-fosfat
SON	supraoptično jedro
SP	sfingozin
SST	somatostatin
TH	tirozin hidroksilaza
TRH	tirotropin sproščajoči hormon
TSH	tiroidni stimulirajoči hormon
VIP	vazoaktivni intestinalni peptid
VP	vazopresin

SLOVARČEK

eksocitoza	je celični proces evkariontskih celic za sproščanje signalnih snovi in encimov (Neher in Marty, 1982; Regazzi, 2007:ix) in za vgrajevanje lipidov in proteinov v plazmalemo (Regazzi, 2007:ix).
elektrofiziologija	je študij električnih lastnosti živih celic ali tkiv. Vključuje merjenje prevodnosti kanalčkov ali električnega toka v različnih merilnih skalah, od posameznih kanalnih proteinov do celih organov kot je srce (Gibson in sod., 2008). V nevroznanosti vključuje meritve električne aktivnosti nevronov, zlasti akcijskih potencialov.
fuzijska pora	je ozka cevasta struktura, ki nastane po zlitju membrane mešička s plazmalemo (v procesu eksocitoze; Vardjan in sod., 2007) in odpre nenačno prevodnost, tipično za nekaj piko Siemensov (Betz in Angelson, 1998). Fuzijska pora se lahko irreverzibilno razširi, kar privede do zlitra membrane (ang. full fusion) ali reverzibilno zapre (ang. kiss and run). Slednje omogoči, da mešiček ohrani obliko in funkcijo, hkrati pa zadrži del izločevalne vsebine (Vardjan in sod., 2007). Fuzijska pora je lahko sestavljena iz fosfolipidov, membranskih sidrišč SNARE proteinov ali kombinacije obojega (Chapman, 2002: 505).
gigaohmski pečat	je pečat, ki nastane z uporabo majhnega podtlaka na mikropipeti potem, ko se z njo dotaknemo celice. V nastalem pečatu se pojavi gigaohmska upornost (v območju gigaohmov).
membranska kapacitivnost (C_m)	je premo sorazmerna s površino plazmaleme (Zorec in sod., 1991; Neher in Marty, 1982) in sledi dodajanju/odvzemanju membrane zaradi eksocitoze/endocitoze mešičkov (Heinemann in sod., 1994; Neher 1992).
metoda vpete napetosti krpice membrane (ang. patch-clamp)	metoda s katero merimo električne tokove, ki tečejo skozi celično membrano.
plazmalema	ali celična membrana je tanka plast polarnih lipidnih molekul in proteinov (Boyer 2005: 225), približne debeline 5 nm (Albert, 1998: 347). Obdaja vse biološke celice (Boyer 2005: 225) in ločuje celično notranjost od

zunajceličnega okolja in ostalih celic ter deluje kot difuzijska pregrada in kot električni izolator (Sakmann, 1992). Plazmalema vsebuje visoko selektivne kanale in črpalke iz proteinskih molekul, ki omogočajo import ali eksport določenih molekul (Albert, 1998: 347).

sfingolipidi

so razred kompleksnih lipidov, ki vsebujejo amid-povezano maščobno kislino in dolgo-verižno (sfingoidno) osnovo, ki je pomembna strukturna komponenta celične membrane (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004).

sfingozin

je sfingolipidni metabolit in pomembna komponenta celične membrane, ki je lahko encimsko sproščena v citosol. Sfingozin je sekundarni obveščevalec (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004; Florent-Béchard in sod., 2009) in pomemben lipidni uravnalec (Darios in sod., 2009), ohranjen tako pri kvasovkah, kot pri človeku (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004).

SNARE

je naddružina membransko-povezanih proteinov, ki vključuje približno 60 aminokislin α -heliks obvito obvitih (ang.coiledcoil) domen, imenovanih motiv SNARE. Kompleksi so lokalizirani na posebnih membranskih predelih izločevalnih in sprejemnih signalnih poti, kjer sodelujejo pri specifičnih znotrajceličnih membranskih fuzijskih procesih (Li in Chin, 2003).

1 UVOD

Elektrofiziološke tehnike vpete napetosti krpice membrane (ang. patch-clamp) omogočajo študije izločevalnih odzivov v posamezni celici (Almers in Neher, 1986). Celični izločevalni odziv lahko spremljamo kot časovne spremembe kapacitivnosti, ki nakazujejo spremembe membranske površine, zaradi zlivanja in odcepljanja izločevalnih granul (Zorec in sod., 1991; Almers in Neher, 1986). Membranska kapacitivnost (C_m) je premo sorazmerna s površino (Zorec in sod., 1991; Neher in Marty, 1982) in se pri eksocitozi zaradi dodajanja membrane mešička poveča (Heinemann in sod., 1994; Neher 1992).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Eksocitoza je splošna lastnost vseh evkariontskih celic. Na molekulski ravni so mehanizmi eksocitoze še malo znani. V podganjih adenohipofiznih celicah, laktotrofih poteka izločanje hormona prolaktina z eksocitozo v bazalnih in stimuliranih razmerah (Vardjan in sod., 2009). V procesu eksocitoze se mešički s hormonom zlivajo s plazmalemo. Pri laktotrofih zlivanje ni nenaden dogodek, temveč je postopno in ponavljajoče se (Vardjan in sod., 2009). Po zlitju se med membrano mešička in plazmalemo vzpostavi ozka cevasta struktura – fuzijska pora (Vardjan in sod., 2007). Izločevalne molekule se iz mešičkov sproščajo na dva načina. Fuzijska pora se lahko ireverzibilno razširi, kar privede do zlitja membrane (ang. full fusion) ali reverzibilno zapre (ang. kiss and run), kar omogoči, da mešiček ohrani obliko in funkcijo, hkrati pa zadrži del izločevalne vsebine (Vardjan in sod., 2007). Lastnosti fuzijske pore lahko raziskujemo na ravni posameznega mešička z elektrofiziološko metodo vpete napetosti krpice membrane (ang. cell-attached patch-clamp), in sicer z meritvami membranske prevodnosti ter kapacitivnosti (Vardjan in sod., 2009).

Sfingolipidni metabolit sfingozin je pomembna komponenta celične membrane, ki je lahko encimsko sproščena v citosol (Colombaioni in sod., 2004) in pomemben lipidni uravnalec eksocitoze (Darios in sod., 2009). Sfingozin modulira sproščanje prenašalcev v živčnem sistemu, neposredno zavre napetostno-odvisne kalcijeve kanale v hipofiznih celicah in je povezan z ustavitevijo celične rasti ter s celično smrtjo v več celičnih tipih (Colombaioni in Garcia-Gil 2004). V sinaptičnih mešičkih aktivira sinaptobrevin in tvori kompleks SNARE, ki posreduje v membransko fuzijo. S pomočjo sinaptobrevina sfingozin stimulira eksocitozo v izoliranem živčnem terminalu, motorični ploščici, nevroendokrinih celicah in nevronih hipokampa (Darios in sod., 2009).

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V diplomski nalogi smo uporabili izolirane podganje laktotrofe, ker v njih poteka izločanje hormona prolaktina z eksocitozo v bazalnih in stimuliranih razmerah (Vardjan in sod., 2009). Z elektrofiziološko metodo smo raziskali, ali molekula sfingozina vpliva na dinamiko posameznih eksocitoznih dogodkov in na dinamiko fuzijske pore. S temi poskusi smo prispevali k razumevanju mehanizmov eksocitoze pri stimuliranih laktotrofih, saj so mehanizmi nastanka in razširjanja fuzijske pore med plazmalemo ter mešičkom še neznani.

(Vardjan in sod., 2007). V primeru, da sfingozin stimulira eksocitozo pri podganjih laktotrofih, je lahko pomemben ligand za uravnavanje izločanja hormonov.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

V diplomskem delu smo želeli preveriti, ali ima sfingozin vpliv na uravnavano eksocitozo na ravni zlivanja posameznega mešička pri podganjih laktotrofih. Zato smo merili pojavnost elementarnih dogodkov fuzije mešička s plazmalemo celic laktotrofov pri normalni in s sfingozinom spremenjeni zunajcelični raztopini.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MERITVE MEMBRANSKE KAPACITIVNOSTI IN ELEKTROFIZIOLOŠKA METODA »PATCH-CLAMP« (METODA VPETE NAPETOSTI KRPICE MEMBRANE)

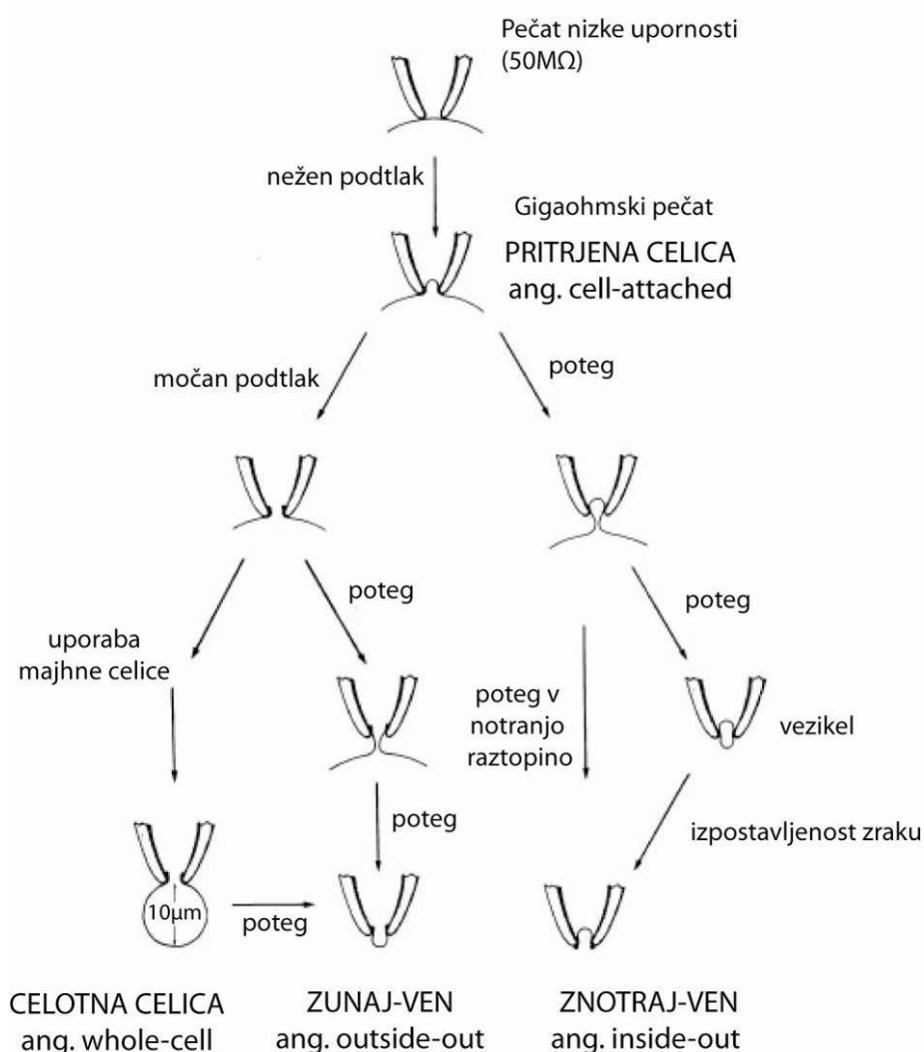
Začetki metode vpete napetosti krpice membrane (ang. patch-clamp) segajo v leto 1976. Takrat so pomenili pravo eksplozijo eksperimentov, do takrat nemogočih meritiv na področju bioloških membran (Neher in Marty, 1982; Bekkers, 1997: 40). Zanj sta izumitelja Sakmann in Neher leta 1991 prejela Nobelovo nagrado (Bekkers, 1997: 40). Metoda je bila prvotno namenjena meritvam tokov skozi posamezen acetilholinski receptorski kanalček v skeletnih mišicah (Zorec in sod., 1991). Nepričakovano je omogočila tudi študije različnih fizioloških problemov, kot je uporaba proste plazmaleme (celične membrane) (ang. cell-free membrane patches as a bioassay), študije eksocitoze, endocitoze in izločevalnih mehanizmov z meritvami membranske kapacitivnosti (Zorec in sod., 1991), karakterizacije sinaptične signalizacije med celicami na molekularnem nivoju (Sakmann, 1992) in delovanje vzdražnih ter zavirajočih postsinaptičnih potencialov (Neher, 1992). Z meritvami posameznih receptorskih kanalčkov so dokazali njihove številne izoformne oblike, kar je prispevalo k pojasnjevanju sinaptične komunikacije v centralnem živčnem sistemu (Sakmann, 1992). Uporaba teh elektrofizioloških metod je omogočila ugotavljanje medsebojnih vplivov med sekundarnimi obveščevalci, G-proteini in drugimi proteini uravnavanja. Elektrofiziološka metoda dopušča enostavno dovajanje ionov, kelatorjev, sekundarnih obveščevalcev, fluorescentnih sond itd. v celico, z vključitvijo teh snovi v merilno pipeto (Neher, 1992).

Plazmalema ločuje celično notranjost od zunajceličnega okolja in ostalih celic ter deluje kot difuzijska pregrada in kot električni izolator. To omogoča diferenciacijo celic s specializiranimi funkcijami. Koordinirano obnašanje multiceličnega organizma zahteva izmenjavo signalov med posameznimi celicami. Ker mora biti signal prenesen iz ene celice na drugo, morajo obstajati mehanizmi, ki omogočajo prečkanje izolacijske plazmaleme (Sakmann, 1992). V normalnih razmerah njen debelina ustreza 5 nm in relativni dielektrični konstanti 2–3 (Gillis in sod., 1995: 158).

Elektrofiziološke tehnike vpete napetosti krpice membrane (ang. patch-clamp) omogočajo študije izločevalnih odzivov v posamezni celici. Med izločevanjem se membrana izločevalnih mešičkov najprej dostavi do plazmaleme in šele nato se zlige z njo (Almers in Neher, 1986). Celični odziv izločanja lahko spremljamo kot časovne spremembe kapacitivnosti, ki nakazujejo spremembe membranske površine, zaradi zlivanja in odcepljanja izločevalnih mešičkov (Zorec in sod., 1991; Almers in Neher, 1986). Membranska kapacitivnost (C_m) je premo sorazmerna s površino (Zorec in sod., 1991; Neher in Marty, 1982) in se pri eksocitozi zaradi dodajanja membrane mešička poveča (Heinemann in sod., 1994; Neher 1992). Merjenje C_m vpete napetosti krpice membrane razkrije diskretne skoke v C_m (Zorec in sod., 1991; Neher in Marty, 1982), ki predstavljajo interakcije med posameznimi granulami in plazmalemo (Kreft in Zorec, 1997; Gillis in

sod., 1995: 156). C_m je ključni parameter pri spremljanju eksocitoze (Gillis in sod., 1995: 158).

Poznamo več različnih konfiguracij metode vpete napetosti krpice membrane (ang. patch-clamp) (Slika 1). Z gigapečatom dosežemo konfiguracijo pritrjene celice (ang. cell-attached), z aplikacijo močnejšega podtlaka dobimo posnetek celotne celice (ang. whole-cell recording), z vlečno silo pa znotraj-navzven (ang. inside-out) ali zunaj-navzven (ang.outside-out patch) konfiguracijo (Bekkers, 1997: 40–43) (Slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz postopka doseganja različnih konfiguracij patch-clamp. (Prirejeno po Hamill in sod. 1981, cit. po Bekkers, 1997: 42) Pri naših poskusih smo uporabljali le konfiguracijo pritrjene celice (ang. cell attached).

Vse opisane konfiguracije imajo specifične aplikacije. V nekaterih primerih je zaželeno, da na proces čim manj vplivamo, torej da pustimo membrano nedotaknjeno brez vplivanja na celično notranjost. V drugih primerih bi želeli pridobiti kvantitativne podatke pod čim večjo eksperimentalno kontrolo, kar pomeni, da vplivamo na proces (Neher, 1992). Meritve pritrjene celice (ang. cell attached) se približujejo prvemu namenu, saj celica

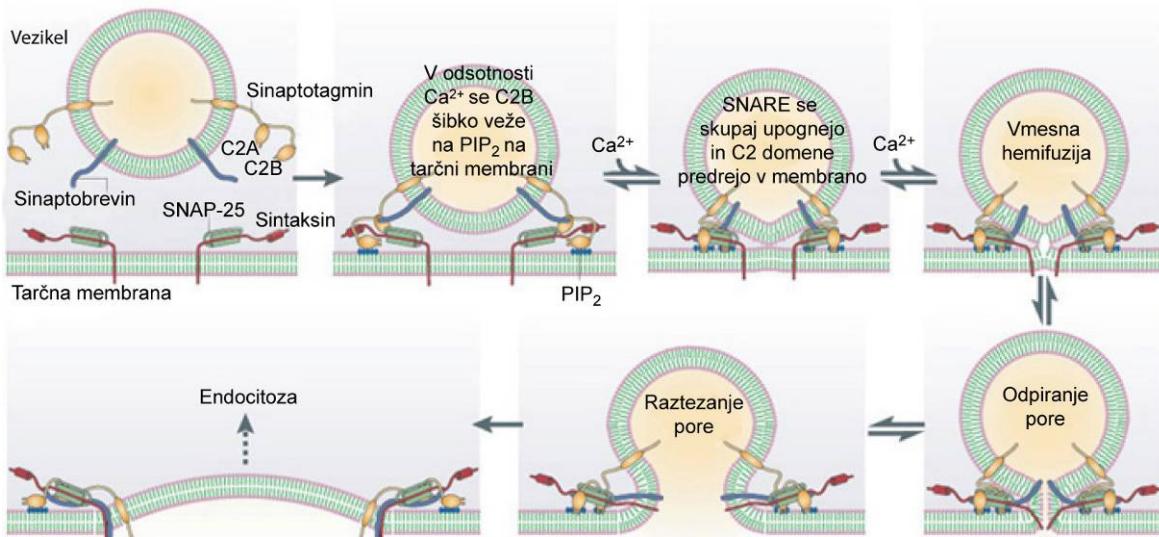
ostane večinoma nedotaknjena (Neher, 1992; Bekkers, 1997: 41) in tako omogoča opazovanje odpiranja ter zapiranja kanalov ali merjenje akcijskega potenciala zunajcelično (Neher, 1992).

2.2 EKSOCITOZA

Eksocitoza je celični proces evkarijontskih celic za sproščanje snovi, kot so peptidni hormoni, nevrotransmiterji, encimi (Neher in Marty, 1982; Regazzi, 2007:ix) ali za vstavljanje specifičnih lipidov in proteinov v plazmalemo (Regazzi, 2007:ix). Poznamo konstitutivno in uravnavano eksocitozo (Alberts in sod., 2004: 519). Konstitutivna eksocitoza nenehno poteka v vseh evkarijontskih celicah, zato se površina membrane ves čas spreminja; uravnavana eksocitoza pa poteka samo v celicah, ki so specializirane za izločanje. Specializirane izločevalne celice proizvajajo velike količine posebnih produktov, kot so hormoni, sluz ali prebavni encimi, ki so hranjeni v izločevalnih mešičkih za kasnejše izločanje. Ti mešički se akumulirajo blizu plazmaleme in čakajo na signal, ki jih bo stimuliral, da se bodo združili s plazmalemo in sprostili njihovo vsebino v celično zunanjost (Alberts in sod., 2004: 522). Pomemben sprožilec izločanja hormona iz hipofiznih celic je dvig citosolnega kalcija ($[Ca^{2+}]_i$), ki ga hipofizne celice uravnavajo s povečanjem membranskega toka kalcija iz zunajceličnega prostora in/ali s sprosttvijo njegovih znotrajceličnih zalog (Zorec, 1996). Uravnavana eksocitoza je dvodelen proces, ki vključuje pripenjanje izločevalnih mešičkov na specifično mesto plazmaleme, s kasnejšo fuzijo in sproščanjem vsebine mešička (Watson, 1999). Mešički se nenehno cepijo od trans Golgijeve mreže in se v procesu eksocitoze zlivajo s plazmalemo (Alberts in sod., 1998: 478). Na molekulski ravni so mehanizmi eksocitoze še malo znani (Betz in Angelson, 1998; Regazzi, 2007:ix; Vardjan in sod., 2007; Stenovec in sod., 2004). Narava pore je lahko proteinska ali lipidna (Burgoyone in Alvarez de Toledo, 2000). Pri molekularnih mehanizmih eksocitoze sodelujejo številni proteini (kompleks SNARE (Burgoyone in Alvarez de Toledo, 2000; Darios in sod., 2009), GTP- povezani proteini, G-proteini (Watson, 1999)), ki uravnavajo in medsebojno reagirajo z membranski lipidi (Watson, 1999; Betz in Angelson, 1998; Darios in sod., 2009) (Slika 2). Odpiranje in zapiranje fuzijske pore je med fuzijskim procesom natančno uravnano (Burgoyone in Alvarez de Toledo, 2000). Električne lastnosti posamezne fuzijske pore so bile najbolj raziskane v celicah, ki vsebujejo relativno velike mešičke (Betz in Angelson, 1998).

V laktotrofih poteka izločanje hormona prolaktina z eksocitozo v bazalnih in stimuliranih razmerah (Vardjan in sod., 2009). V procesu eksocitoze se mešički s hormonom zlivajo s plazmalemo. Pri laktotrofih zlivanje ni nenaden dogodek, temveč je postopno in ponavljajoče (Vardjan in sod., 2007). Po zlitju se med membrano mešička in plazmalemo vzpostavi ozka cevasta struktura – fuzijska pora (Vardjan in sod., 2007), ki odpre nenadno prevodnost, tipično za nekaj sto pikoSiemensov in katere nadaljnja usoda je nepredvidljiva (Betz in Angelson, 1998). Lastnosti fuzijske pore (reverzibilno odpiranje (Betz in Angelson, 1998) in kinetiko (Burgoyone in Alvarez de Toledo, 2000)) lahko raziskujemo na ravni posameznega mešička z elektrofiziološko metodo vpete napetosti krpice membrane (ang. cell-attached patch-clamp), in sicer z meritvami membranske prevodnosti ter kapacitivnosti (Vardjan in sod., 2009). Povečanje površine plazmaleme pomeni eksocitozo,

zmanjšanje površine pa odraža endocitozo (Betz in Angelson, 1998; Neher in Marty, 1982).



Slika 2: Dinamičen večstopenjski pogled na hipofizno fuzijsko »napravo«, ki je sestavljena iz sinaptotagmina, SNARE (sinaptobrevin, sintaksin in SNAP-25) in fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PtdIns(4,5)P₂). Pri procesu eksocitoze imajo vlogo tudi ostali faktorji, vendar niso prikazani. Fuzijska pora je lahko sestavljena iz fosfolipidov, membranskih sidrišč proteinov SNARE ali iz kombinacije obojega (povzeto po Chapman, 2002: 505).

Izločevalne molekule se iz mešičkov sproščajo na dva načina. Fuzijska pora se lahko ireverzibilno razširi, kar privede do zlitja membrane (ang. full fusion), ali reverzibilno zapre (ang. kiss and run), kar omogoči, da mešiček ohrani obliko in funkcijo, hkrati pa zadrži del izločene vsebine (Vardjan in sod., 2007). Fuzijska pora lahko tudi koleba med zaprtim in odprtym stanjem različno dolgo časovno obdobje, ki lahko traja nekaj sekund in se nato konča z nepropustnim zaprtjem ali odprtjem (Betz in Angelson, 1998; Vardjan in sod., 2009). Dogodki eksocitoze v izločevalnih celicah lahko vključujejo več kot en mešiček, kar imenujemo sestavljena eksocitoza. Pred eksocitozo se mešički homotipično združijo in tvorijo velike strukture večih mešičkov, ki se nato združijo s plazmalemom. Ta pojav imenujemo multivezikularna eksocitoza (Vardjan in sod., 2009). Hipofizni laktotrofi so zaradi različnih lastnosti primerni za študij eksocitoze tako posameznih mešičkov, kot sestavljene eksocitoze (Vardjan in sod., 2007; Vardjan in sod., 2009; Stenovec in sod., 2004).

2.3 PROLAKTIN

Prolaktin (PRL) je polipeptidni hipofizni hormon (Serri in sod., 2003; Freeman in sod., 2000), ki je sintetiziran in se izloča iz specializiranih celic prednjega režnja hipofize – laktotrofov (Freeman in sod., 2000; H. Corrette in sod., 1995: 116; Yang in sod., 2008; Horseman, 2001: 232) in tudi iz drugih nehipofiznih celic (Yang in sod., 2008; Poyraz in sod., 2008), kot so limfociti T in B (Yang in sod., 2008). PRL je del družine proteinskih hormonov, ki poleg prolaktina vključuje rastni hormon (GH), sesalčji placentni laktogen (PL) (Freeman in sod., 2000; Manzon, 2002) in somatotaktin teleostov (SL) (Manzon,

2002). Predvideva se, da je družina omenjenih proteinskih hormonov GH/PRL/PL/SL nastala iz skupnega predniškega gena pred približno 850 milijoni let. Ta ocena se ujema z odkritjem PRL in rastnemu hormonu podobnih proteinov v nevretenčarjih (Manzon, 2002), kar nakazuje, da je prolaktin evolucijsko star hormon (Freeman in sod., 2000). Veliko pomembnih funkcionalnih domen, aktivacijskih receptorskih mehanizmov in signalnih transdukcijskih poti je ohranjenih med ribami ter sesalci (Manzon, 2002).

Sesalčji PRL je sintetiziran kot prohormon, ki vsebuje peptidni signal približno 28-ih aminokislin (Manzon, 2002). Kodira ga en sam gen (10 kb), ki se pri človeku nahaja na šestem kromosomu. Njegova molekulska masa je 23 kDa, sekvenca hormona pa lahko variira glede na vrsto organizma med 197 do 199 AK (Freeman in sod., 2000). PRL kroži po krvotoku do perifernega tarčnega tkiva, kot so jajčniki, mlečna žleza, kosti, in do centralnega živčnega sistema (Horseman, 2001: 232). Za razliko od ostalih hipofiznih hormonov je vključen v veliko raznolikih fizioloških procesov v različnih organih (Corrette in sod., 1995:116).

PRL deluje na tarčno tkivo preko prolaktinskih receptorjev (PRLR), ki so transmembranski proteini z enim prehodom verige (Freeman in sod., 2000; Horseman, 2001: 232). V sesalcih so dolge, srednje in kratke PRLR izoblike, ki nastanejo z alternativnimi spoji in uporabo promotorja (Freeman in sod., 2000). Pomen PRL je razviden iz širokega spektra funkcij v vretenčarjih in njihovo stopnjo ohranjenosti skozi celoto evolucijo (Manzon, 2002).

Na izločanje prolaktina vplivajo najrazličnejši dražljaji iz zunanjega in notranjega okolja (Freeman in sod., 2000). Glavni zaviralec izločanja PRL je dopamin (prolaktin-zavirajoči faktor) (Corrette in sod., 1995: 119), ki preko dopaminskih D2 receptorjev (D2R) tonično zavira sintezo PRL in izločanje iz laktotrofov (Andersen in Rosenfeld, 2001; Schluff in sod., 2002; Molitch, 1995; Ben-Jonathan in sod., 1996).

2.3.1 Biološko delovanje prolaktina

Prolaktin ima številne učinke na sesalčje žleze, prav tako vpliva tudi na reproduksijski sistem sesalcev (Serri in sod., 2003; Freeman in sod., 2000) ter na vedenje, povezano z razmnoževanjem, kot je materinsko vedenje in parjenje. Pri nekaterih sesalcih, zlasti glodalcih, vpliva tudi na vzdrževanje lutealne faze in izločanje rumenega telesca (*corpus luteum*). Ima ključno vlogo za laktacijo, razvoj mlečne žleze (mamogenezo), nastajanje mleka (laktogenezo), vzdrževanje mleka. Poleg mnogovrstnega vpliva na reproduksijsko in laktacijsko vlogo ima tudi pomemben vpliv na homeostazo organizma z uravnavanjem imunskega sistema, osmotskega ravnotežja, angiogeneze (Freeman in sod., 2000) in avtoimune bolezni, kot je multipla skleroza (Yang in sod., 2008).

2.3.2 Bolezenska stanja in zdravljenje

2.3.2.1 Hiperprolaktinemija

Hiperprolaktinemija je stanje zvišanega serumskega prolaktina. Normalna vrednost v človeškem serumu je okoli 30 ng/mL. Bolezensko zvišanje se pojavlja v manj kot 1 % populacije. Pri 10–40 % pacientov se hkrati pojavi še sekundarna amenoreja (izostanek menstruacije), pri 75 % pa se poleg hiperprolaktinemije pojavi še galaktoreja (izločanje mleka ali mleku podobne tekočine pri moškem ali ženski brez povezave z nosečnostjo) (Shenenberger in sod., 2007). Hiperprolaktinemija je lahko spodbujena s fiziološkimi, farmakološkimi ali patološkimi vzroki. Normalno je izločanje PRL spremenjeno zaradi nosečnosti, laktacije, fizičnega ali psihološkega stresa (Jerrell in sod., 2009). Hiperprolaktinemija je pogosteje pri popubertetnih in odrasajočih otrocih, kot pri odraslih, predpubertetnih dekletih ali moških (Jerrell in sod., 2009). Pogosteje zanjo zbolevajo ženske, običajno pa jo spremlja še oligomenoreja (neredna menstruacija), ali amenoreja. Pri obeh spolih zasledimo še probleme z vidom ali glavobole (Shenenberger in sod., 2007). Povišana raven PRL lahko vodi do zmanjšanega spolnega nagona, hirsutizma (poraščenost moškega tipa pri otrocih in ženskah), ginekomastije (povečanje žlezjnega tkiva dojke pri moških) ali galaktoreje pri obeh spolih (Jerrell in sod., 2009), lahko pa se odraža v spremembah imunskega sistema (Poyraz in sod. 2008). V mladosti je hiperprolaktinemija lahko povezana z debelostjo, neplodnostjo ali osteoporozo (Jerrell in sod., 2009). Hiperprolaktinemija je tudi posledica prolaktinomov, ki so najbolj pogost tip hipofiznega adenoma (Shenenberger in sod., 2007; Serri in sod., 2003). Umrljivost zaradi hiperprolaktinemije je redka, problem predstavlja večji tumorji, ki s svojo maso pritiskajo na okoliško tkivo (Shenenberger in sod., 2007). Agonisti D2 dopaminskih receptorjev so pogosto uporabljeni pri zdravljenju prolaktinomov, da zmanjšajo raven serumskega prolaktina in hipofizne adenome (Kelly in sod., 1997). Največ pacientov s prolaktinomi so ženske (Shenenberger in sod., 2007).

Cilj zdravljenja hiperprolaktinemije je omiliti posledice zvišane ravni prolaktina. Po zdravljenju z dopaminskimi agonisti se kmalu pokaže izboljšanje na biokemični in klinični ravni. V zdravljenje je običajno vključenih več dopaminskih agonistov za fiziološko zaviranje prolaktina (bromokriptin, kabergolin, pergolid) (Serri in sod., 2003). Čeprav so sprva mislili, da bolniki potrebujejo zdravljenje z agonistom dopamina celo življenje, je sedanja uporaba teh agentov odvisna od bolnikovih potreb in okoliščin (Serri in sod., 2003).

Zdravljenje z antagonistimi dopaminskih receptorjev spodbuja hiperprolaktinemijo preko zmanjšanja zaviranja izločanja PRL. Kot antagonisti dopaminskih receptorjev delujejo antipsihotiki (Jerrell in sod., 2009). Z antipsihotiki spodbujena hiperprolaktinemija je najbolj pogost endokrini stranski učinek zdravljenja z antipsihotiki. To stanje je najpogosteje opaženo pri pacientih s shizofrenijo (Poyraz in sod., 2008).

2.3.2.2 Hipoprolaktinemija

Hipoprolaktinemija je stanje znižane koncentracije serumskega prolaktina in je običajno posledica disfunkcije anteriornega režnja hipofize. Najpogosteje je povezana z nekrozo hipofize po porodu (Sheehanov sindrom). Pomanjkanje prolaktina je lahko tudi posledica oslabitve prednjega režnja hipofize, zdravljenja tumorjev, poškodbe glave ali okužbe. Pomanjkanje prolaktina je posledica nezmožnosti laktotrofov za izločanje prolaktina, kar se odraža v nezadostni laktogenezi, menstrualnih nepravilnostih, pozni puberteti, sterilnost ali zmanjšani plodnosti (Benson in sod., 2008). Pomanjkanje prolaktina je redko, popolna odsotnost prolaktina pa še redkejša in ima morda genetske vzroke. Klinični znaki se pojavljajo zgolj pri ženskah (Benson in sod., 2008).

Ženske s porodno hipoprolaktinemijo in posledično z nezadostno količino mleka hranijo novorojenca po steklenički. Trenutno ni zdravila, ki bi zdravilo pomanjkanje PRL, rekombinantni človeški PRL pa kaže učinkovitost pri zdravljenju zmanjšane laktacije pri podghanah, tretiranih z bromokriptinom (Benson in sod., 2008). Okvara genov za prolaktin ali za njegove receptorje se odraži kot kompleksen fenotip s pomanjkljivim razvojem mlečne žlez. V homozigotni miši z izbitim genom za prolaktin se razvoj mlečne žlez ustavi v stanju »pubertete« (Horseman, 2001: 236).

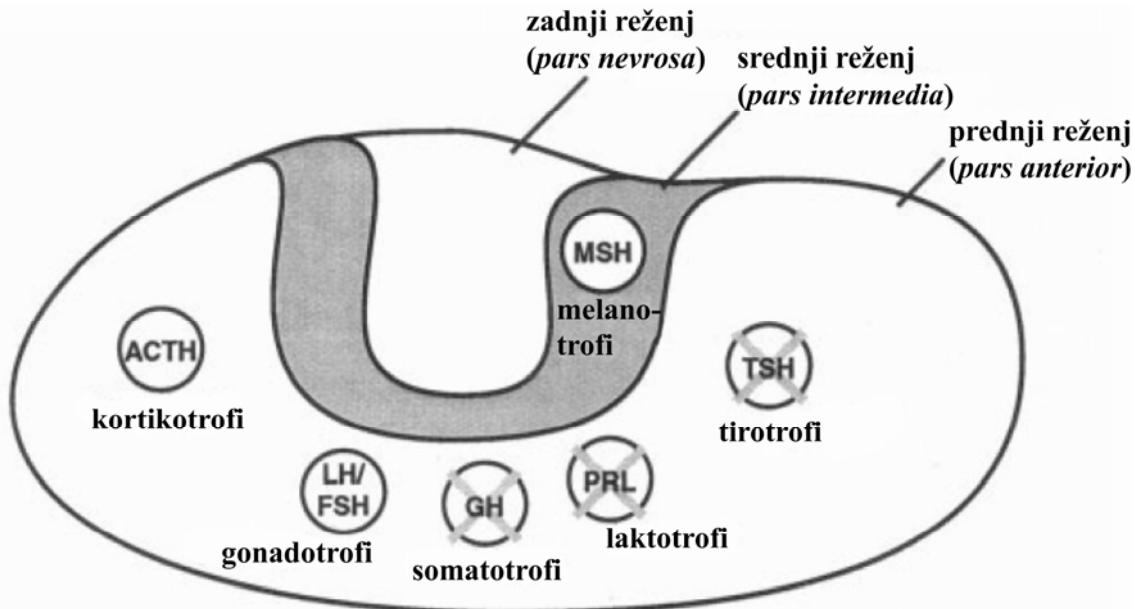
2.3.2.3 Makroprolaktinemija

Makroprolaktinemija je stanje s polimerno obliko prolaktina, kjer je več molekul prolaktina sestavljeno v polimer. Polimer ne aktivira prolaktinskih receptorjev, kar pomeni, da je polimerni PRL neaktivien (Serri in sod., 2003).

2.4 LAKTOTROFI

2.4.1 Hipofiza

Hipofizna žleza je heterogeno tkivo, ki je pri podghanah sestavljeno iz treh različnih anatomskeh in funkcionalnih delov: prednjega (*pars anterior*), srednjega (*pars intermedia*) in zadnjega (*pars nervosa*) režnja. Najdemo jo na turškem sedlu (*sella turcica*), kjer je povezana z *dura mater*, čvrsto plastjo vezivnega tkiva (Asa in sod., 2002:18). Prednji reženj vključuje podporne folikulo-stelatne celice (Mitchner in sod., 1998) in pet celičnih tipov, ki izločajo hormone (Mitchner in sod., 1998; Andersen in Rosenfeld, 2001). Kortikotrofi izločajo adrenokortikotropni hormon (ACTH), tirotrofi tiroideo stimulirajoči hormon (TSH), gonadotrofi luteinizirajoči hormon (LH) in folikel stimulirajoči hormon (FSH), somatotrofi rastni hormon (GH) in laktotrofi prolaktin (PRL) (Cohen in Radovick, 2002). Razvoj hipotalamus in hipofize je močno koordiniran z nevronskimi projekcijami iz *mediane eminence* in posterorne hipofizne žleze. Približno ob istem času, ko nevroni začnejo izločati neuropeptide, se izrazijo receptorji zanje v prednjem delu hipofize (Andersen in Rosenfeld, 2001). Med nosečnostjo in laktacijo se lahko masa hipofizne žlez poveča za več kot 1 g in skoraj 50 % celotne celične populacije predstavlja laktotrofi (Asa in sod., 2002: 24).



Slika 3: Shematski prikaz odrasle hipofizne žlezde. Trije režnji hipofizne žlezde, prednji (*pars anterior*), srednji (*pars intermedia*) in zadnji (*pars nervosa*) nakazujejo glavne celične tipe, ki izločajo hormone. Oznaka X preko somatotrofov, laktotrofov in tirotrofov nakazuje, da se ti celični tipi ne razvijejo pri ljudeh z mutacijo Pit-1. Melanotrofi, ki se nahajajo v srednjem režnju, izločajo melanocitni stimulirajoči hormon (MSH) (Andersen in Rosenfeld, 2001: 15).

Kortikotrofi so prve celice, ki se razvijejo v človeški zarodni hipofizi (Asa in sod., 2002: 20; Cohen in Radovick, 2002) v 6. tednu nosečnosti. 8. tenen nosečnosti se razvijejo somatotrofi, 12. tenen pa tirotrofi in gonadotrofi. Ob tem času se začne izločati tudi PRL, ki je lokaliziran v mamosomatotrofih, bihormonskih celicah, ki so edini vir PRL do 24. tedna nosečnosti. Diferencirani laktotrofi se razvijejo kasneje (Asa in sod., 2002: 20) in so tako zadnje celice, ki se diferencirajo v človeški zarodni hipofizi (Asa in sod., 2002: 20; Horseman, 2001: 232).

2.4.2 Morfologija laktotrofov

Laktotrofi so celični tip, ki izločajo hormon PRL (Horseman, 2001: 232) in predstavljajo približno 10–30 % celic prednjega režnja hipofize (Asa in sod., 2002: 23), odvisno od starosti, spola, reprodukcije in fiziološkega stanja (Freeman in sod., 2000; Asa in sod., 2002: 23).

Laktotrofi so naključno porazdeljeni po prednjem režnju in so acidofilni (Asa in sod., 2002: 23). Nedvoumno so jih identificirali z imunohistokemijskimi metodami v prednjem režnju hipofize miši, podgan in človeka z uporabo vrstno-specifičnih prolaktinskih protiteles (Freeman in sod., 2000). So zelo heterogeni glede na njihovo obliko (Freeman in sod., 2000), ultrastrukturo, porazdelitev znotraj anterioorne hipofize, odzivnosti od sproščajočih faktorjev in količine sproščanja (Corrette in sod., 1995: 117). Dokazano je bilo, da se laktotrofi razlikujejo glede na njihovo velikost in vsebino izločevalnih granul, kakor tudi glede na količino prolaktina in prolaktinske mRNA (Freeman in sod., 2000).

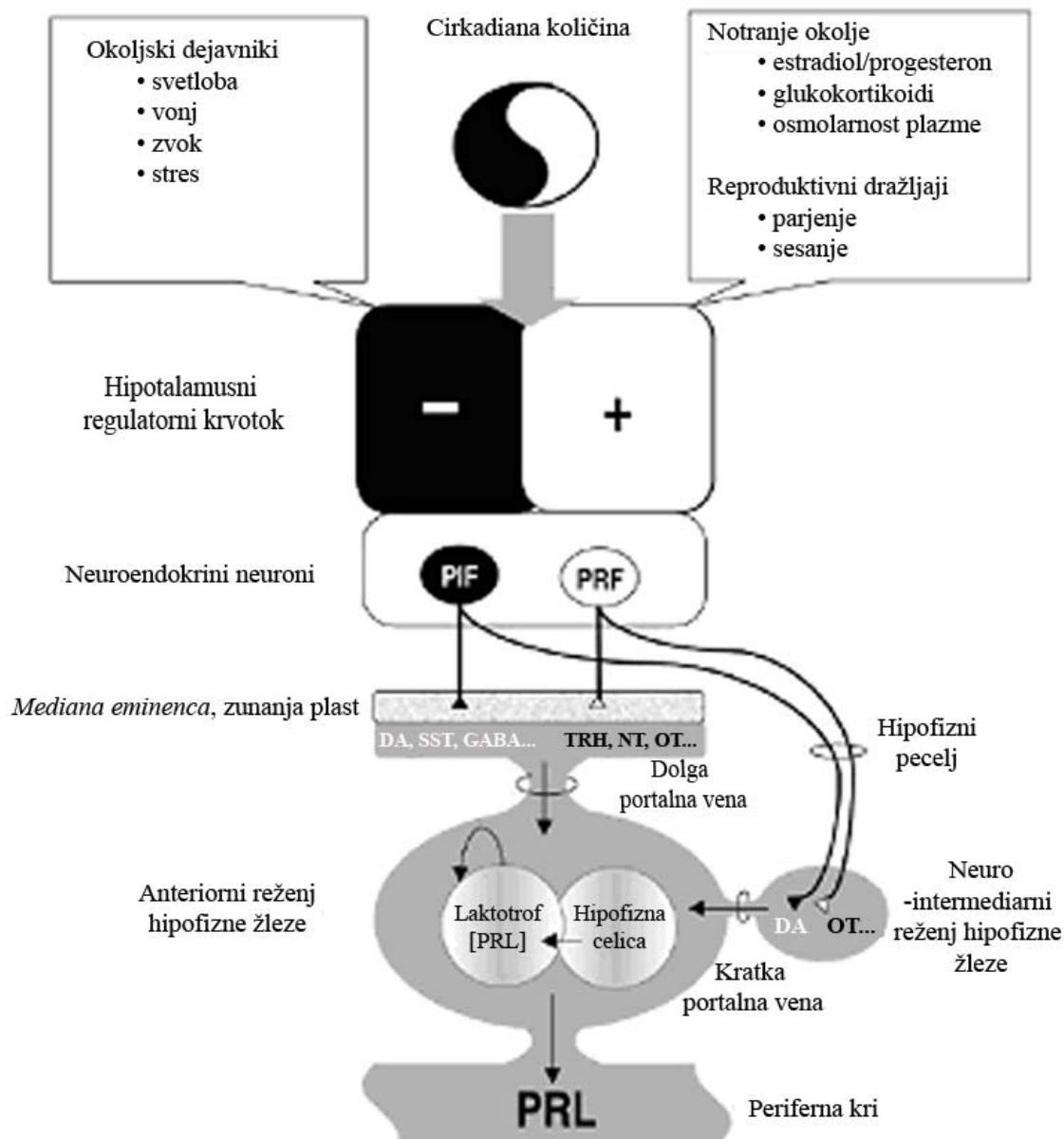
Membranski potencial in električna aktivnost laktotrofov v primarnih kulturah je variabilna. Z znotrajceličnimi meritvami so določili njihove električne lastnosti. Mirovni membranski potencial laktotrofov je podoben tistim pri drugih hipofiznih celicah in nevronih: med - 60 in - 50 mV (Corrette in sod., 1995: 117).

Morfologija in razporeditev laktotrofov je najbolje opisana pri podganah, kjer so prolaktin vsebujoče celice redko razporejene v lateroventralnem delu in so prisotne kot pas poleg srednjega režnja (Freeman in sod., 2000).

2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na izločanje PRL

Na izločanje prolaktina vplivajo najrazličnejši dražljaji iz zunanjega in notranjega okolja (Slika 4) (Freeman in sod., 2000). V odsotnosti normalnih hipotalamusnih in hipofiziotrofičnih dejavnikov laktotrofi izločajo PRL na visoki bazalni ravni (Corrette in sod., 1995: 119; Freeman in sod., 2000). Sesalčji laktotrofi so edinstveni, ker zahtevajo tonično zavirajočo kontrolo z dopaminom (prolaktin-zavirajoči faktor), ki se sintetizira v nevronih v *arkvatnem jedru* in se izloča iz konččev v *mediani eminenci* hipotalamus (Horseman, 2001: 231). Sinteza dopamina (DA) poteka s pretvorbo tirozina v dopamin preko katalitske reakcije tirozin hidroksilaze (TH). Raven TH se zviša, verjetno zaradi transkripcijskih ali posttranslacijskih mehanizmov, ko se zviša tudi raven prolaktina (Horseman, 2001: 232). Dopamin tonično zavira izločanje PRL *in vitro* ter velja za glavnega zaviralca *in vivo* (Corrette in sod., 1995: 119). Dopamin preko dopaminskih D2 receptorjev (D2R) tonično zavira sintezo PRL in izločanje iz laktotrofov (Andersen in Rosenfeld, 2001; Schluff in sod., 2002; Molitch, 1995; Ben-Jonathan in sod., 1996) ter njihovo proliferacijo (Schluff in sod., 2002). Najbolj verjeten mehanizem za povečanje sproščanja prolaktina iz laktotrofov je zmanjšanje njihovega zaviranja (Freeman in sod., 2000).

Poleg zavirajočega efekta dopamina na izločanje prolaktina vplivajo tudi številni dejavniki, ki jih sproščajo laktotrofi sami (avtokrino uravnavanje) ali druge celice v hipofizni žlezi (parakrino uravnavanje) (Slika 4) (Freeman in sod., 2000). Prolaktin lahko zavira lastno izločanje z aktiviranjem nevroendokrinskih dopaminergičnih nevronov v hipotalamu (Freeman in sod., 2000) preko PRL receptorjev (PRLR) v povratni zvezi (Schluff in sod., 2002). Dopolnilno vlogo pri uravnavanju sproščanja PRL pri sesalcih imajo različni peptidno-sproščajoči dejavniki, kot so tirotropin sproščajoč hormon (TRH) (Horseman, 2001: 232; Serri in sod., 2003), vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) (Molitch, 1995; Ben-Jonathan in sod., 1996), galanin, oksitocin (Horseman, 2001: 232), serotonin in noradrenalin, ki stimulirajo sproščanje prolaktina iz laktotrofov (Jerrell in sod., 2009). Ravnovesje med signali določa količino prolaktina sproščenega iz anteriornega dela hipofize (Serri in sod., 2003).



Slika 4: Pregled uravnanega izločanja prolaktina. Na izločanje prolaktina vpliva količina svetlobe v cirkadianem ritmu. Notranje okolje in reproduktivni dražljaji vplivajo na zavirajoče ali stimulacijske elemente hipotalamusnega uravnavanja. Glavni vpliv na stimulacijsko in zavirajoče uravnavanje izločanja PRL imajo nevroendokrini nevroni, ki proizvajajo prolaktin zavirajoče faktorje (PIF), kot so DA, somatostatin (SST) in γ -aminomaslena kislina (GABA), ali prolaktin sproščajoči faktor (PRF), kot je TRH, oksitocin (OT) in nevrotenzin (NT). PIF in PRF iz nevroendokrinskih nevronov se sprostijo iz *mediane eminence* v dolge portalne vene ali iz nevrohipofiznega režnja, ki je povezan z anteriornim reženjem hipofizne žleze s kratkimi portalnimi žilami. Laktotrofi so tudi uravnani s PRF in PIF sproščenimi iz sosednjih celic (parakrino uravnavanje) ali iz laktotrofov samih (autokrino uravnavanje) (Freeman in sod., 2000: 1543).

Najpomembnejši fiziološki dražljaji, ki zvečajo izločanje prolaktina je mehanična stimulacija prsnih bradavic med sesanjem, stres in povišana raven ovarijskih steroidov,

predvsem estrogena. Te dražlja nadzoruje hipotalamus, ki izdeluje prolaktin sproščajoči faktor (PRF) in prolaktin zavirajoči faktor (PIF) (Slika 2) (Freeman in sod., 2000).

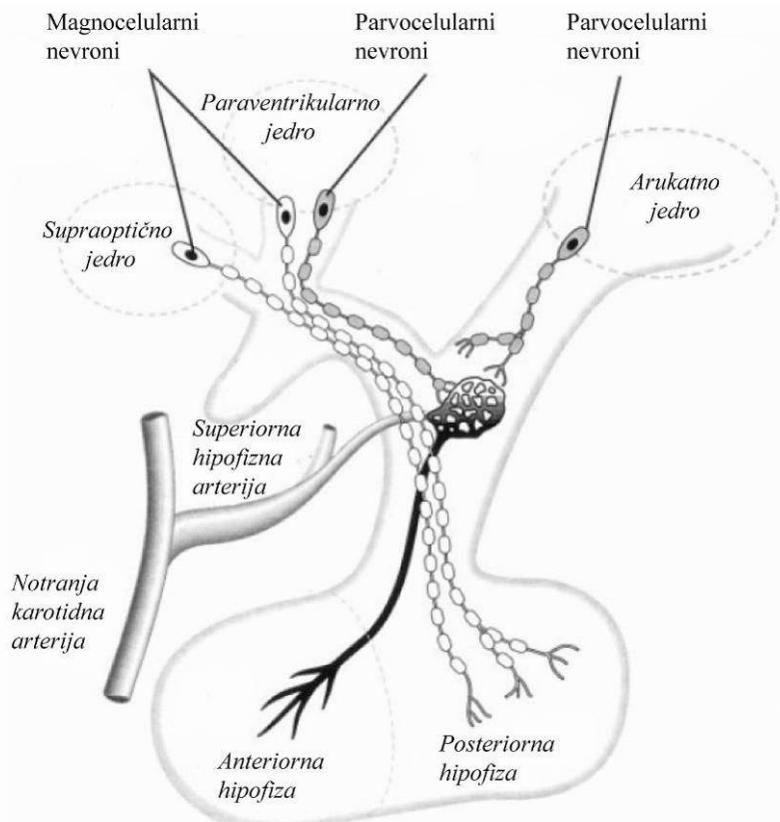
Več kot polovica laktotrofov samic podgan izloča prolaktin kontinuirano, medtem ko ga laktotrofi samcev izločajo diskontinuirano (Freeman in sod., 2000). Na izločanje PRL vplivajo cirkadiani ritem (plazemske koncentracije prolaktina pri ljudeh so najvišje med spanjem in najnižje med aktivnostjo), reproduktivna stanja (laktacija), svetloba (v fotoperiodičnih sesalcih, kot so podgane, je svetloba pomemben uravnalec izločanja prolaktina) in olfaktorni signali (feromoni). Izločanje prolaktina je močno povezano s stresom. Stres lahko glede na okoliščine stimulira ali zavira izločanje prolaktina (Freeman in sod., 2000).

2.4.4 Hipotalamo-hipofizni dopaminski sistem

Hipotalamus zavira izločanje prolaktina iz hipofize. Odstranitev hipotalamusnega vpliva na adenohipofizo in se odrazi kot povišana izločanje prolaktina (Freeman in sod., 2008: 342).

V hipotalamu sta dva ločena nevroizločevalna sistema, ki vplivata na hipofizno žlezo (Slika 5). En sistem je sestavljen iz magnocelularnih nevronov, katerih aksoni segajo neposredno v posteriorni reženj hipofize. Magnocelularni nevronski sistem vključuje nevrone paraventrikularnega jedra (PVH) in supraoptičnega jedra (SON), ki sintetizirajo oksitocin (OT) in vazopresin (VP) ter sproščajo te peptide iz posteriornega režnja hipofize (Andersen in Rosenfeld, 2001).

Drugi sistem je sestavljen iz parvocelularnih nevronov, ki so v različnih jedrih, (paraventrikularno in arkuatno), katerih aksoni segajo do *mediane eminence*. Ti nevrone vplivajo na anteriorno hipofizo s sproščanjem nevropeptidov v hipofizno portalno cirkulacijo (Slika 5). V anteriornem paraventrikularnem in arkuatnem jedru parvocelularni nevrone zagotovijo dopaminergično kontrolo laktotrofov (Andersen in Rosenfeld, 2001).



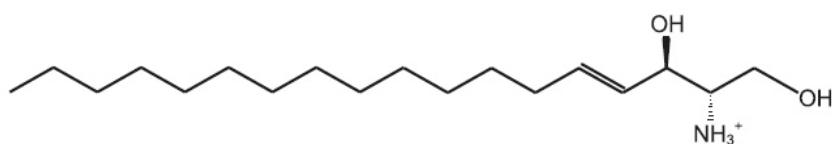
Slika 5: Shematski prikaz povezave med hipotalamusom in hipofizo. Dva tipa nevronov prenašata signale iz hipotalamusa v hipofizno žlezo. Magnocelularni nevrni so locirani v SON in PVH, njihovi aksoni pa segajo neposredno v posteriorni reženj hipofizne žleze in tam sproščajo VP in OT. Parvocelularni nevrni so v različnih jedrih (paraventrikularno in arkutno jedro) in sproščajo dejavnike uravnavanja preko hipofizne portalne cirkulacije v anteriorni reženj hipofize. Aksoni parvocelularnih nevronov segajo v *mediano eminenco* (Andersen in Rosenfeld, 2001: 15).

2.5 SFINGOZIN

Sfingolipidi so razred kompleksnih lipidov, kjer je maščobna kislina amidno vezana na sfingozin. Sfingolipidi so pomembna struktturna komponenta plazmaleme (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004). Sfingolipidni metaboliti, kot so ceramid, sfingozin (SP), sfingozin-1-fosfat (S1P) so neproteinske signalne molekule sposobne uravnavanja različnih procesov (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004; Thomas in sod., 2005: 297; Qu in sod., 2009), kot je diferenciacija, apoptoza in proliferacija v odgovor na rastne faktorje, stresne stimulatorje (Thomas in sod., 2005: 297), rast, migracija, senescenca, vzdražnost in sproščanje transmitterjev v živčnem sistemu (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004), angiogeneza in nevrogeneza (Qu in sod., 2009). Sposobni so spremeniti aktivnost različnih proteinov (npr. receptorjev), ionskih kanalčkov, encimov, kakor tudi znotrajcelične ravni kalcija. Vlogo sfingolipidov so raziskovali zlasti na nevronske tkivu (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004).

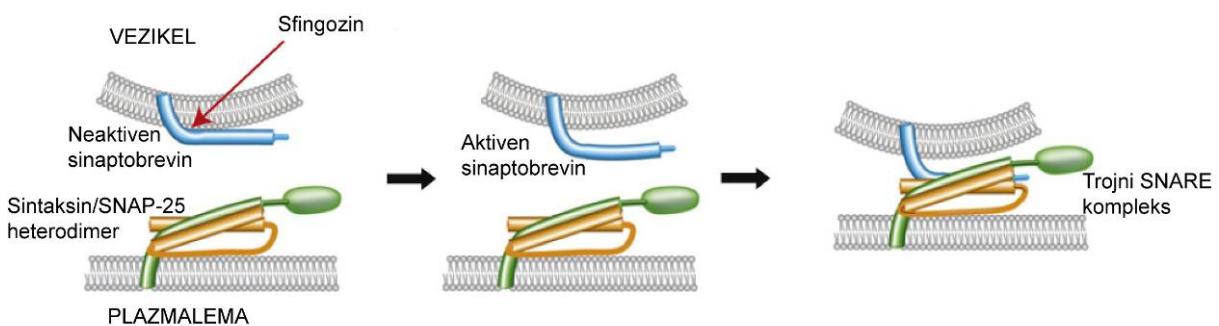
Sfingolipidni metabolit sfingozin (Slika 6) je pomembna komponenta celične membrane in je lahko encimsko sproščena v citosol. SP je sekundarni obveščevalec (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004; Florent-Béchard in sod., 2009) in pomemben lipidni uravnalec (Darios in

sod., 2009), ohranjen tako pri kvasovkah kot pri človeku (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004). V fiziološkem pH-ju je sfingozin pozitivno nabit zaradi proste amino skupine in alifatske stranske verige (Sohal in Cornell 1990) (pK_a 8,5; Bottega in sod., 1989, cit. po Darios in sod., 2009). Njegove koncentracije znotraj celice so natančno uravnavane (Darios in sod., 2009). Koncentracija prostega sfingozina v mišjih možganih je bila ocenjena na $0,5 \mu M$, v podganjih hipofiznih celicah pa na $\sim 5 \mu M$. Njegova raven se bistveno spremeni s staranjem v možganski patologiji (Darios in sod., 2009). Sfingozin je metabolit ceramida (Liu in sod., 2002: 497; Thomas in sod., 2005: 297; Colombaioni in Garcia-Gil, 2004) in nastane s pomočjo encima ceramidaze (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004). V nevronih je lahko metaboliziran v S1P ali nazaj v ceramid (Darios in sod., 2009).



Slika 6: Kemijska struktura sfingozina (Darios in sod., 2009: 686).

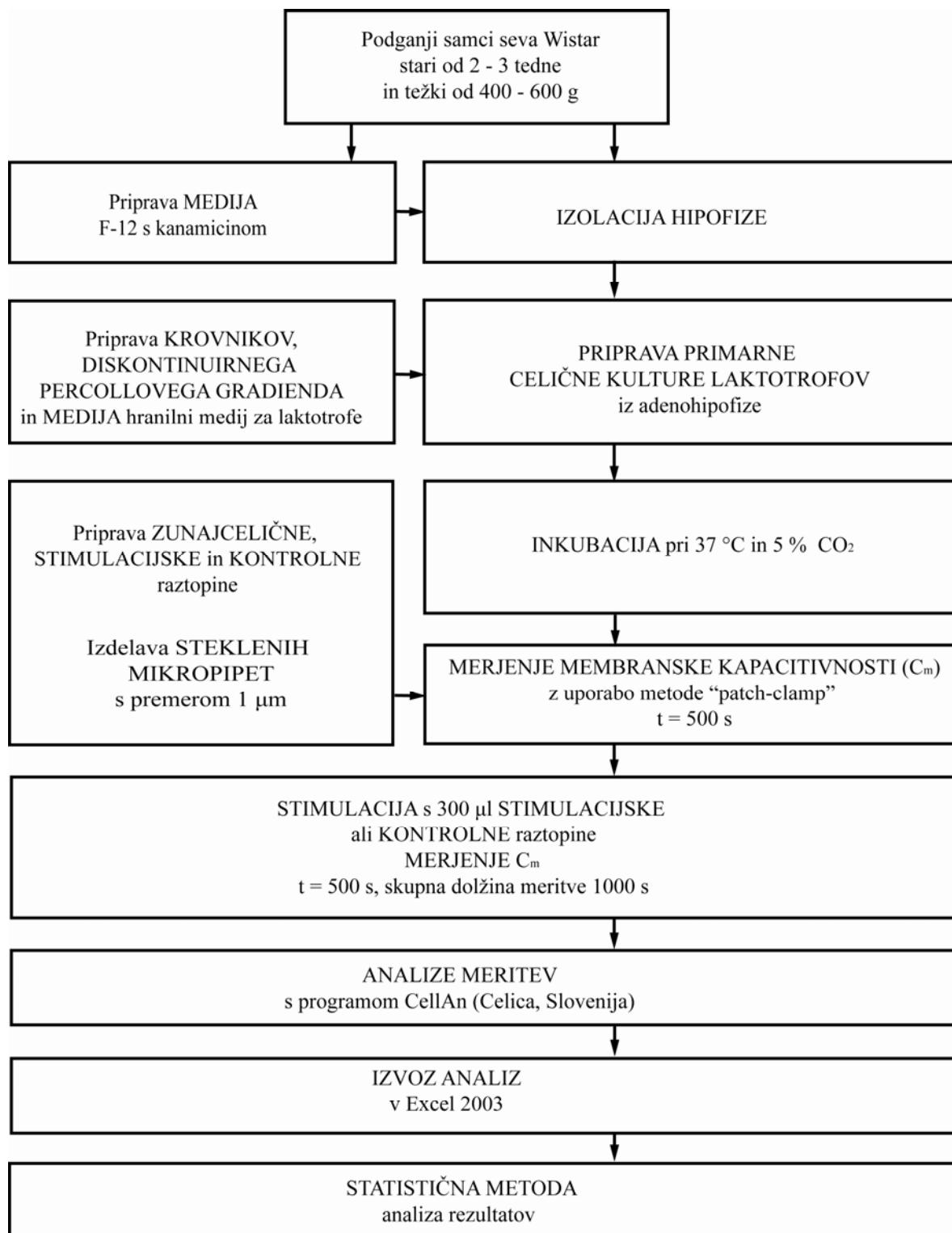
Sfingozin modulira sproščanje prenašalcev v živčnem sistemu, neposredno zavre napetostno-odvisne kalcijeve kanale v hipofiznih celicah in je povezan z ustavitevijo celične rasti ter s celično smrto v več celičnih tipih (Colombaioni in Garcia-Gil 2004), uravnava pa tudi celično rast in diferenciacijo (Florent-Béchard in sod., 2009). V nenevralnih celicah fosforiliran sfingozin vpliva na mobilizacijo Ca^{2+} (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004). V sinaptičnih mešičkih aktivira sinaptobrevin in tvori kompleks SNARE, ki je vključen v fuzijo membran (Slika 7) (Darios in sod., 2009). S pomočjo sinaptobrevina sfingozin zviša eksocitozo v izoliranem živčnem končiču, motorični ploščici, nevroendokrinih celicah in nevronih hipokampa. SP tudi zavira aktivnost proteinske kinaze C (PKC) (Hannun in sod., 1986; Sohal in Cornell 1990; Colombaioni in Garcia-Gil, 2004), stimulira s stresom aktivirane proteinske kinaze in aktivira kaspaze v nenevralnih celicah (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004). Nedavna odkritja kažejo, da ima sfingozin ključno vlogo tudi pri živčnem signaliziranju, čeprav je njegovo celotno delovanje še nepoznano (Colombaioni in Garcia-Gil, 2004).



Slika 7: Shematski prikaz sfingozin-posrednega sproščanja v citoplazemski del sinaptobrevina. Zaviranje membrane mešička je nujen korak za nadaljnjo interakcijo sintaksin/SNAP-25 heterodimera. Sestava tertiarnega kompleksa SNARE vodi v fuzijo mešička s plazmalemo (Darios in sod., 2009: 691).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 8: Hodogram poskusa.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Primarna celična kultura

Uporabili smo podganje samce seva Wistar, stare od štiri do šest tednov in težke med 200 in 300 g.

3.2.2 Gojišče in raztopine

3.2.2.1 Priprava medija F-12 s kanamicinom

125 mg Kanamicina monosulfata (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija) smo raztopili v 10 ml medija Nutrient mixture F-12 ham (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in vse skupaj sterilno prefiltrirali s filtrom (Sarstedt, Nemčija), s premerom por 0,2 µm in do nadaljnje uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2.2 Sestava hranilnega medija za laktotrofe (za pripravo 100 ml raztopine):

- 100 mg HEPES (Sigma, ZDA);
- 100 mg Tricine (N-tri[hydroxymethyl]methylglycine) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);
- 300 mg D-(t)-glukoza (Sigma);
- 10 mg BSA Albumin, bovine (Goveji serumski albumin) (Sigma);
- 1 ml 200mM L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);
- 10 ml serum novorojenih telet;
- 100 ml Dulbeco's modified eagles's medium (DMEM) s 100 g glukoze/L pyridoxine, HCl in NaHCO₃, brez L-glutamina (D5546, Sigma).

Hranilni medij za laktotrofe smo pred hrambo sterilno prefiltrirali skozi membranski filter (Sarstedt, Nemčija) s premerom por 0,2 µm in do nadaljnje uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2.3 Zunajcelična raztopina (za pripravo 200 ml raztopine):

- 130 mM NaCl (1,519 g) (Sigma);
- 5 mM KCl (0,075 g) (Sigma);
- 1 mM MgCl₂ (24 µl nasičene raztopine);
- 8 mM CaCl₂ (239 µl nasičene raztopine) (Honeywell Riedel-de Haën, Nemčija);
- 10 mM D-glukoza (0,360g) (Sigma);
- 10 mM HEPES (0,477 g) (Sigma);
- dodana mili QH₂O do 200 ml.

Vrednost pH (MP 220, Mettler Toledo GmbH, Švica) smo naravnali z dodajanjem NaOH (Merck, Nemčija) do pH 7,2. Osmolarnost je bila med 290–310 mOsM, zmerjena z osmometrom (Osmomat030, Gonotech GmbH, Nemčija).

3.2.2.4 Stimulacijska raztopina

Zunajcelični raztopini smo dodali Sfingozin (D(+)-eritro-1,3-dihidroksi-2-amino-4-trans-aktadecen) (Biomol, Velika Britanija), 50 mM (raztopljenega v DMSO (Sigma)), da je bila končna koncentracija 100 µM. Ob stimulaciji smo zunajcelični raztopini dodali stimulacijsko raztopino v razmerju (v/v) 1 : 1, tako smo merili pri končni koncentraciji 50 µM.

3.2.2.5 Kontrolna raztopina

Zunajcelični raztopini smo dodali enako količino DMSO, ki je bila prisotna v stimulacijski raztopini, v kateri je bil raztopljen sfingozin.

3.2.3 Oprema in aparature

3.2.3.1 Droben laboratorijski material:

- nepredušno zaprta posoda z odprtino za nastavek dovoda CO₂;
- pladenj za seciranje podgan;
- pincete;
- škarje za dekapitacijo in seciranje podgan;
- skalpel;
- krovniki (Chance Glass, Velika Britanija, premer 22 mm);
- igle premerov (1,1 mm, 0,8 mm in 0,6 mm) za enkratno uporabo (Icogamma, Italija; Tik, Slovenija);
- mikropruvete 1,5 ml;
- serološke pipete (Sarstedt);
- centrifugirke 15 ml;
- serološke pipete za enkratno uporabo 2, 5 in 10 ml (Sarstedt);
- petrijevke (35 mm premer x 10 mm višina in 100 mm premer x 20 višina), (Sarstedt);
- borosilikatne steklene kapilare (zunanjega premora 1,5 mm) (Harvard Apparatus, ZDA);
- nosilec pipete z merilno elektrodo (Ag/AgCl);
- referenčna elektroda (Ag/AgCl);
- kamrica za fiksacijo krovnika;
- plastelin za fiksacijo krovnika v kamrico;
- plastična cevka za dovanjanje podtlaka;
- stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirke;
- nastavki za pipete; 10, 100 in 1000 µl ;
- prozorna folija;
- injekcijske brizge 2, 5 in 10 ml (Icogamma);

- čaše 100 ml;
- merilni valji 50 in 100 ml;
- kovinske spatule;
- parafilm (Parafilm, ZDA);
- sterilni membranski filtri s premerom por 0,2 µm (Starstedt);
- plastične posodice za tehtanje;
- papirnate brisače.

3.2.3.2 Aparature:

- avtomatske pipete 2 µl do 1000 ml (Eppendorf Research, Nemčija; Biohit-Proline, Nemčija; Pipetman, Gilson, Francija);
- pipetor za pipete (Accu-jet, Choice Scientific, ZDA);
- jeklenka s CO₂;
- digestorij (Köttermann, Nemčija);
- magnetno mešalo (Magnetic Stirrer 34521, Snijders, Holland);
- magnetki;
- CO₂ inkubator 37 °C s 5 % CO₂, (New Brunswick Scientific, ZDA);
- centrifuga tipa Centric 322A in Centric 150 (Tehnica, Slovenija);
- tehnicka (AB54-S, Mettler Toledo);
- vrtinčnik/vorteks (Vibratomix 10, Tehnica);
- lupa;
- svetlobni mikroskop (Olympus, Japonska);
- hladilnik (Gorenje, Slovenija);
- pH meter (MP 220, Mettler Toledo GmbH);
- osmometer (Osmomat030, Gonotech GmbH);
- aparatura Flaming brown micropipette puller (Model P-97, Shutter Instrument, ZDA);
- grelna žica;
- invertni svetlobni mikroskop Zeiss Axioobserver A1 (Nemčija) pri 400-kratni povečavi (vodni objektiv 40-kratna, okular 10-kratna);
- konfokalni mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta);
- faradayeva kletka;
- antivibracijska miza;
- mikromanipulator (Eppendorf Injectman, Nemčija);
- zaščitna mikrobiološka komora (C-[MaxPro]³-130 (Iskra pio, Slovenija);
- Till Photonics CCD kamera;
- mikrovalovna pečica (Gorenje);
- sistem za patch clamp:
 - o fazno občutljiv »lock-in, patch-clamp« ojačevalnik (SWAM IIC, Celica, Slovenija);
 - o nizkopropustni filter (100 Hz, -3dB, Celica);
 - o dva osciloskopa;
 - o 6-kanalni predajačevalnik s filtri;
 - o kartica BNC-2110 (National Instruments, ZDA), ki vsebuje tudi A/D pretvornik (pretvornik pretvarja analogni signal v digitalnega);
 - o računalnik.

3.2.3.3 Programska oprema:

- program CELL (CELL – Electrophysiology software, verzija 2.3, Celica);
- program CellAn (Celica);
- program Microsoft Excel 2003;
- program Sigma Plot (ZDA).

3.3 METODE

3.3.1 Izolacija laktotrofov iz podganje hipofize

Priprava celic je potekala v skladu z Zakonom o zaščiti živali (ZZZiv-UPB2, Ur. I. RS, št 43/07) in Dovoljenjem za izvajanje poskusov na živalih (št. 3440-29/2006 veljavnim do 31.12.2009). Podgane smo evtanazirali s čistim CO₂, jih dekapitirali, odstranili kožo iz glave in odprli dorzalno stran lobanje. Nato smo odstranili možgane in s sterilno pinceto pretrgali možganske ovojnice ter odstranili hipofizo iz turškega sedla (*sella turcica*), ki smo jo prenesli v petrijevko z 2 ml medija F-12 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) z antibiotikom kanamicinom (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Pod lupo smo s sterilno iglo in pinceto ločili nevrohipofizo od adenohipofize in slednjo prenesli v 2 ml medija F-12 s kanamicinom, kjer smo predhodno raztopili 8 mg kolagenaze (Gibco, Velika Britanija) in 2 mg dispaze (Gibco). S sterilnim skalpelom smo adenohipofizo razrezali na delce približnega premera 1 mm, dodali 50 µl DNaze tipa DN-25 in inkubirali 90 min v inkubatorju (New Brunswick Scientific) pri 37 °C in 5 % CO₂. Po inkubaciji smo 1 ml raztopine prenesli v dve 1,5 ml mikropruvete in trikrat centrifugirali po 5 minut pri 900 min⁻¹ z vmesnim spiranjem z medijem F-12 s kanamicinom. Po vsakem centrifugiranju smo odstranili supernatant in peletu dodali 1 ml medija F-12 s kanamicinom. Po zadnjem centrifugiranju smo oba peleta prenesli v skupno mikropruveto ter dodali 1 ml medija F-12 s kanamicinom. Z 2 ml brizgo in različnimi premeri igel (1,1 mm, 0,8 mm in 0,6 mm) smo z vsako iglo posebej, po padajočem vrstnem redu premera, 3–5-krat posrkali celice, da smo dobili ločene celice. Med centrifugiranjem smo v 15-ml centrifugirki pripravili diskontinuiran Percollov gradient, kjer smo s serološko pipeto počasi nanašali po 2 ml 65, 45 in 35 % (najprej 65 in nazadnje 35 %) sloj Percolla (Sigma). Vso suspenzijo celic smo nato počasi s serološko pipeto prenesli na vrh Percoll gradiента in centrifugirali 25 min pri 2100 min⁻¹, brez zavore. Med centrifugiranjem so se tipi celic ločili in se ob koncu nahajali v dveh različnih slojih. Zgornji, laktotrofni sloj se je nahajal med 35 % in 45 % plastjo Percolla, spodnji, somatotrofni pa med 45 % in 65 % slojem. Plast laktotrofov smo previdno prenesli v svežo 15 ml centrifugirko in dodali medij F-12 s kanamicinom do 5 ml. Sledilo je 2-kratno 5-minutno centrifugiranje pri 1200 min⁻¹ brez zavore. Po prvem centrifugiranju smo v centrifugirki pustili 500 µl in po drugem 100 µl tekočine. Nato smo za vsak krovnik dodali 50 µl medija F-12 s kanamicinom z upoštevanimi prvočnimi 100 µl. Na posamezen krovnik (Chance Glass, premera 22mm), ki smo ga predhodno prekrili s poly-L-lys (PLL) (Sigma), smo nato dodali 50 µl dobro resuspenirane tekočine s celicami in jih inkubirali v inkubatorju 30–40 minut pri 37 °C in 5 % CO₂. Na vsak krovnik smo nato dodali 1,5–2 ml hranilnega medija za laktotrofe. Pripravljeni celice smo uporabljali

štiri dni, prvi in tretji dan po izolaciji pa smo jim zamenjali medij. Izrabljen hranilni medij smo odstranili s serološko pipeto iz petrijevk in nato dodali 1,5–2 ml hranilnega medija za laktotrofe, ogretega na 37 °C.

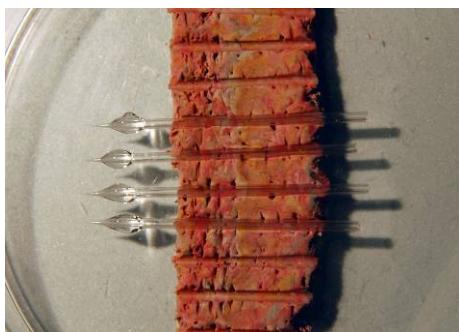
Čistost primarne kulture oz. delež prolaktin vsebujočih celic po izolaciji je bil ~90 %, določen z opazovanjem primarne kulture s konfokalnim mikroskopom (Zeiss LSM 510 Meta) in z označenimi prolaktinskimi protitelesi (Jernej Jorgačevski, osebna komunikacija 2009). Prolaktin se v mešičkih nahaja na periferiji celice in je pripravljen na eksocitozo. Izboljšave v ločitvenih tehnikah so omogočile pripravo ločenih celic, ki večinoma vsebujejo le en tip celic, ki izločajo hormon. Ti preparati omogočajo izboljšanje verjetnosti izbire celic zanimanja v eksperimentih posamezne celice (Zorec in sod., 1991). 80–90 % čistost določenega celičnega tipa dovoljuje, da jih opredeljujemo kot praktično homogene (Shin in Milligan, 1998: 51).

3.3.2 Priprave krovnih stekelc

Krovna stekelca smo najprej sterilizirali v mikrovalovni pečici in jih nato prelili s 70 % etanolom. Sledilo je dvakratno spiranje v redestilirani vodi ($\text{pH} = 5,0\text{--}7,0$, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Lekarna, Slovenija) in 15-minutna inkubacija v 10 % (v/v) PLL (Sigma, ZDA). Nato smo jih ponovno dvakrat sprali v destilirani vodi, posušili in shranili v petrijevke (35 mm premer x 10 mm višina), (Sarstaedt, Nemčija). Krovna stekelca smo večinoma pripravljali sprosti. Če smo jih pripravili prej, smo jih do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.3.3 Izdelava steklenih mikropipet

Mikropipete smo naredili iz borosilikatnih steklenih kapilar zunanjega premera 1,5 mm (Harvard Apparatus) s pomočjo vlačilca pipet (Model P-97, Shutter Instrument), in sicer tako, da je premer konice pipet znašal 1 μm . Ker so po obdelavi imele oster rob, smo ga s topotno obdelavo (grelno žico) zgladili. Na koncu smo konice mikropipet prevlekli še s hidrofobno smolo (Sylgard, Dow Corning, ZDA) ter s tem zmanjšali šumnost meritev (Vardjan in sod., 2009). Pipete smo vsak dan sproti pripravili, saj smo tako izboljšali pečat membrane (Neher, 1992). Uporabljali smo pipete, napolnjene z zunajcelično raztopino, katerih upornost je znašala med 2 in 6 $\text{M}\Omega$. Tako napolnjene pipete smo vstavili v nosilec pipet, v katerem je bila merilna elektroda (Ag/AgCl). Potencial pipete smo vedno vpeli na 0 mV.



Slika 9: Steklene mikropipete - merilne elektrode za merjenje membranske kapacitivnosti z elektrofiziološko metodo vpete napetosti krpice membrane (ang. patch-clamp). Zunanji premer steklene mikropipete je 1,5 mm.

3.3.4 Mikroskopiranje

Celice smo opazovali na sobni temperaturi z invertnim svetlobnim mikroskopom Zeiss Axioobserver A1 pri 400-kratni povečavi (vodni objektiv 40-kratna, okular 10-kratna). Krovno stekelce smo vstavili v posebno kamrico in ga fiksirali, kamrico pa položili na objektno mizico mikroskopa. Na krovno stekelce smo dodali 300 µl zunajcelične raztopine. Objektiv se je nahajal pod objektnikom, osvetlitev pa nad njim, kar je omogočalo uporabo mikromanipulatorja (Eppendorf Injectman) ter dostop do celic s stekleno mikropipeto. Mikroskop se je nahajal v ozemljeni Faradayevi kletki, na protivibracijski mizi, saj lahko zunanje elektromagnetno valovanje ter mehanski tresljaji motijo meritve.

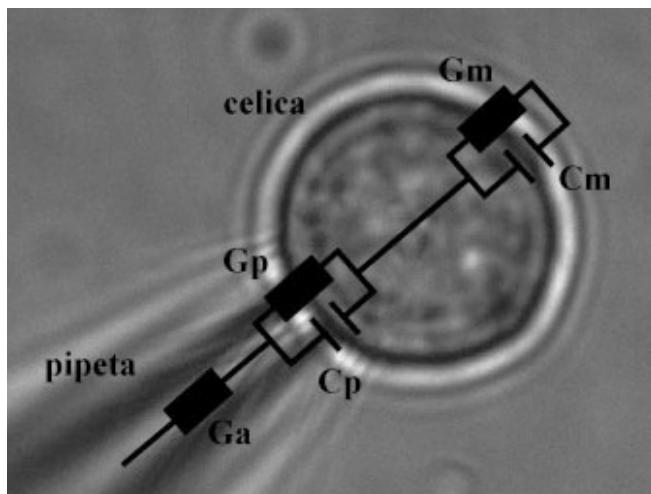


Slika 10: Mikroskop in mikromanipulator v ozemljeni faradayevi kletki in na antivibracijski mizi.

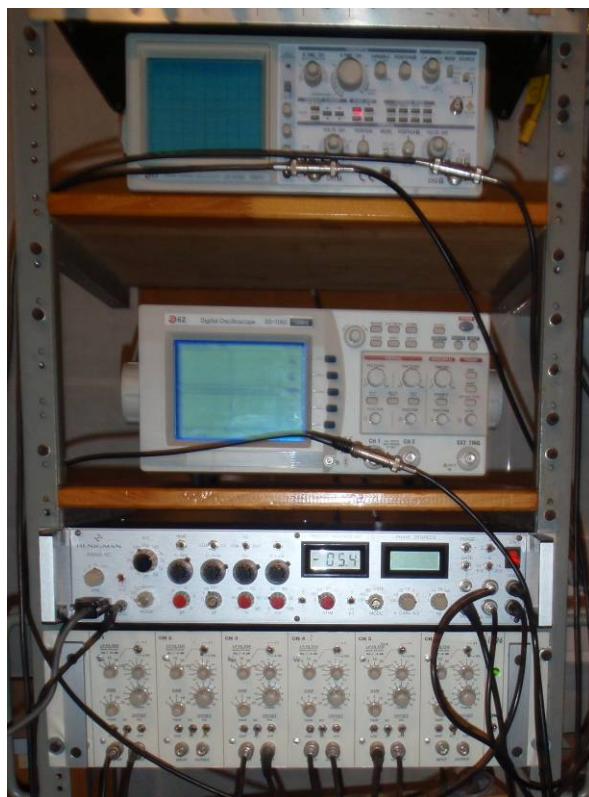
3.3.5 Meritve skokovith sprememb membranske kapacitivnosti z elektrofiziološko metodo »patch-clamp« (metoda vpete napetosti krpice membrane)

Vse meritve smo izvedli pri sobni temperaturi s topotno obdelanimi mikropipetami, prevlečenimi s hidrofobno smolo. Mikropipeto in nosilec pipet smo napolnili z zunajcelično raztopino ter pipeto pritrdirili vanj in vse skupaj vstavili v kontakt predajačevalnika (merilno sondu). Referenčno Ag/AgCl elektrodo smo potopili v raztopino na krovnem stekelcu in jo povezali z referenčnim kontaktom. Nato smo v raztopino potopili še pipeto (merilno elektrodo) ter na fazno občutljivem ojačevalniku SWAM IIB

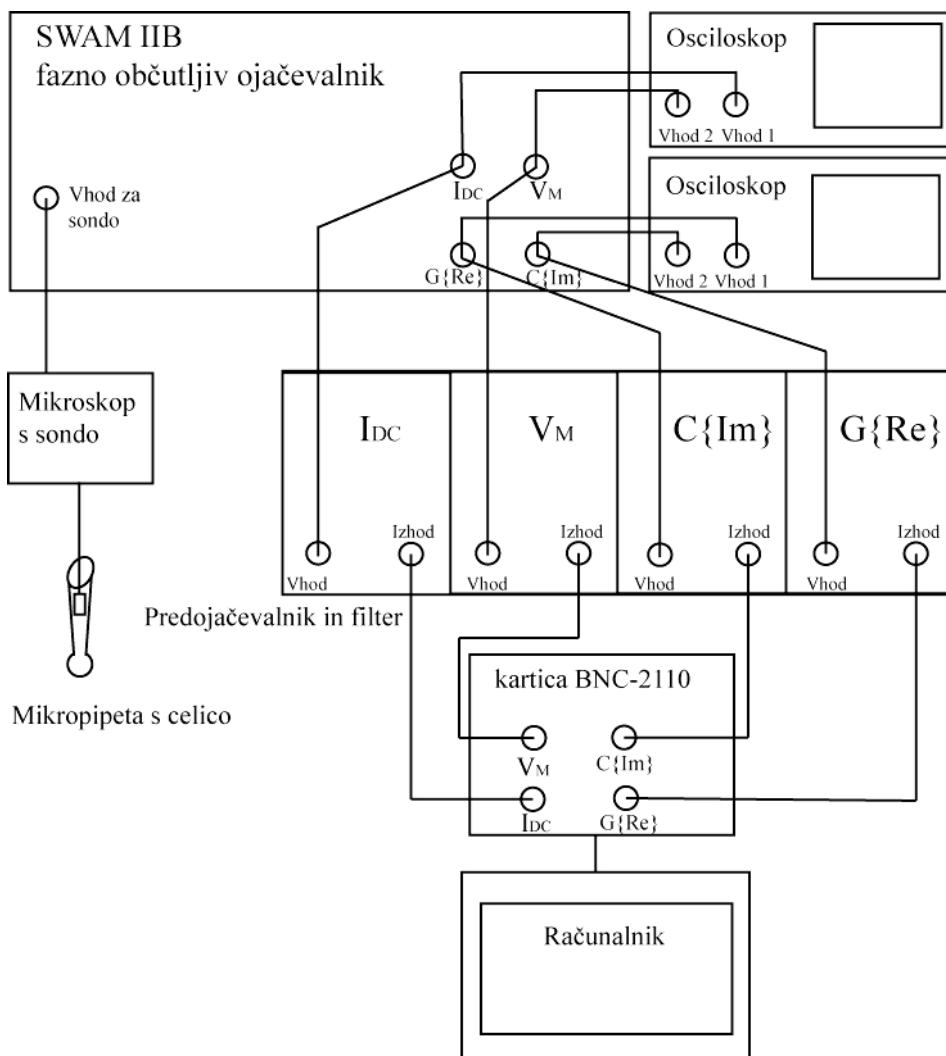
izbrali »GATE« ali »OFF« način ter vpeli potencial pipete na 0 mV (Zorec in sod., 1991a). Potencial pipete je bil vpet na 0 mV še pred izvedbo samega t.i. gigaomskega pečata oz. pred vpetjem membranske krpice (Zorec in sod., 1991a). Nato smo z mikromanipulatorjem (Eppendorf Injectman) približali mikropipeto do kontakta s celico in ustvarili gigaomski pečat z nežnim podtlakom. Z uporabo majhnega podtlaka se na pipeti potem, ko se z njo dotaknemo celice, v nastalem pečatu pojavi gigaoomska upornost (v območju gigaohmov), tako imenovani »gigapečat«. Izkazalo se je, da je »gigapečat« lahko uspešno dosežen takrat, kadar je nežen podtlak združen z nekaj preprostimi ukrepi za čisto površino, kot je uporaba sveže pipete ter filtriranih raztopin. Tako izboljšan pečat se odraža v bistveno zmanjšanem šumu meritve (Neher, 1992). »Gigapečat« poleg električne stabilnosti omogoča še tesno mehansko povezavo med stekleno merilno pipeto in membrano (Neher, 1992). Izbirali smo velike celice kroglaste oblike, saj lahko njihovo električno geometrijo enostavno predstavimo s preprostim električnim vezjem (Zorec in sod., 1991). Ko je bila celica dobro zapečatena, je bila upornost najmanj 1 GΩ. Sledila je kompenzacija stresne kapacitivnosti na pipeti s C_{fast} na fazno občutljivem »lock-in, patch-clamp« ojačevalniku, tako da na celici ni bilo nobenega neto toka. Sledila je ustrezena nastavitev faznega kota z uporabo ojačevalca, ki smo ga nastavili pri vsaki meritvi posebej. Naravnali smo ga tako, da je ločil spremembe v realni komponenti sinusnega toka (R_e) od sprememb v imaginarni komponenti toka (I_m), ki je bila za $\pi/2$ zamaknjena. Eden od lock-in signalov je tako predstavljal spremembe v membranski kapacitivnosti (C_m) (signal kapacitivnosti), medtem so na drugega vplivale spremembe upornosti, kakor tudi membranske prevodnosti (signal prevodnosti) (Zorec in sod., 1991a). Pravilnost faznega kota smo preverili tako, da so imeli kalibracijski pulzi negativni odklon samo na I_m , brez projekcij na R_e . Med meritvami smo ročno dodajali 10fF kalibracijske vrednosti na I_m del signalova. Po teh nastavitevah smo na celico aplicirali vzbujajočo sinusno napetost (izmenično napetost): $U = U_0 \cdot \sin \omega \cdot t$ (ω predstavlja kotno hitrost ($2\pi\nu$), v frekvenco sinusne napetosti, t pa čas) (Zorec in sod., 1991). Pri naših poskusih smo uporabljali frekvenco 1591 Hz. Signale, dobljene s fazno občutljivim ojačevalcem, smo dvakrat ojačali in nizkoprepustno filtrirali (100 Hz, -3dB, Celica, Slovenija) (da smo lahko ločili diskretne C_m korake (Zorec in sod., 1991a)) ter digitalizirali z A/D pretvornikom in s pomočjo programa CELL (CELL – Electrophysiology software, verzija 2.3, Celica) zajeli ter shranili na računalnik. Zajemali in beležili smo signal enosmernega toka (I_m , [pA]), signal toka, ki je v fazi z napetostjo, ter signal toka, ki je fazno zamaknjen za $\pi/2$. Signal smo beležili 500 s, nato smo dodali 300 µl stimulacijske ali kontrolne raztopine in zajemali signale še dodatnih 500 s. Skupna dolžina meritev je torej znašala 1000 s. Računanje C_m amplitud je bilo večinoma narejeno iz imaginarno komponente toka (I_m) (C_m signalov) (Vardjan in sod., 2009). Koncentracije Ca^{2+} v zunajcelični raztopini nismo spremenjali, zato smo spremembe na kapacitivnem signalu (I_m), v katerem se zrcalijo spremembe površine plazmaleme zaradi fuzije mešičkov, lahko pripisali vplivu sfingozina.



Slika 11: Laktotrof in steklena merilna pipeta, posneta z invertnim svetlobnim mikroskopom (Zeiss Axioobserver A1). Na sliki je narisano analogno električno vezje, ki predstavlja merilno konfiguracijo v osamljeni krpici membrane (ang. patch clamp), v konfiguraciji pritrjene celice (ang. cell-attached). G_a predstavlja prevodnost pipete, C_p kapacitivnost osamljene membrane, G_p prevodnost osamljene membrane, C_m mirovno kapaciteto celotne celične membrane, G_m pa celokupno prevodnost celične membrane. Premer celice je 15 μm .



Slika 12: Fotografija dela merilnega sistema. Zgoraj dva osciloskopa, v sredini fazno občutljivi ojačevalnik SWAM IIB, spodaj pa dodaten predojačevalnik s filteri.



Slika 13: Shema merilnega sistema, ki smo ga uporabili pri zajemanju podatkov in ga sestavljajo: sonda na mikroskopu, fazno občutljiv »lock-in, patch-clamp« ojačevalnik SWAM IIB, dva osciloskopa, 6-kanalni predajačevalnik s filtri, kartica BNC-2110 in računalnik.

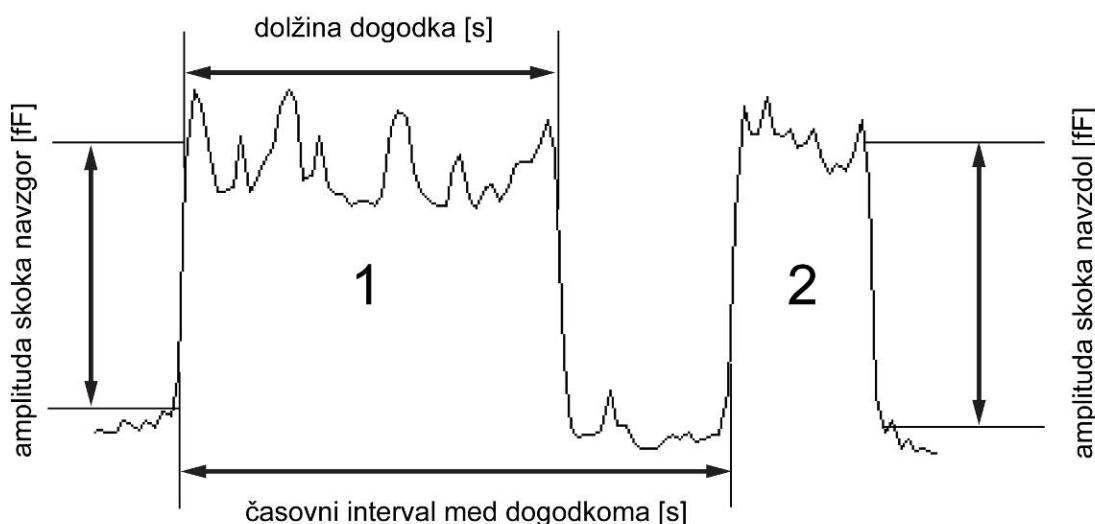
3.3.6 Analiza meritov

Analize meritov dobljenih signalov smo opravili s programom CellAn (Celica), posebej razvitim za tovrstne meritve. Uporabljen program temelji na programskem jeziku MATLAB (Math Works, Natick MA, ZDA) in omogoča podrobno pregledovanje signalov, digitalno nizkopasovno filtriranje in označevanje posameznih dogodkov. Pri označevanju dogodkov smo si pomagali tudi z opazovanjem signala v programu CELL. Dogodkov na komponenti toka (I_m) nismo upoštevali, saj gre za drugo vrsto dogodkov, ionske kanalčke, ki niso odvisni od naše stimulatorne molekule. S programom smo določili vsak primeren dogodek posebej in tako dobili njegove koordinate, ki smo jih izvozili v program Microsoft Excel 2003, kjer smo jih natančneje analizirali. Izračunali smo štiri različne parametre: dolžino dogodka, amplitudo dogodka navzgor in navzdol ter frekvenco dogodkov (ang. interevent interval) in statistično ovrednotili parametre fuzijskih dogodkov.

Dolžina dogodka [s] oz. dolžina odprtja fuzijske pore prikazuje, kako dolgo je dogodek trajal oz. kako dolgo je bila odprta fuzijska pora. Dolžino odprtosti fuzijske pore smo izmerili tako, da smo izmerili čas med skokovitim povečanjem membranske kapacitete in časom, ko se pojavi enaka amplituda skokovitega zmanjšanja membranske kapacitete. Dolžino smo lahko določili le pri reverzibilnih dogodkih (ang. kiss and run), saj pri irreverzibilnem zlitju membrane (ang. full fusion) zvečanju kapacitivnosti ne sledi zmanjšanje.

Amplituda skoka navzgor in navzdol [fF] poda razpon med začetno in končno vrednostjo skoka kapacitivnosti. Amplituda dogodka navzgor poda spremembo diskretnega povečanja membranske kapacitivnosti, ki nastane na začetku dogodka zaradi zlivanja mešička s plazmalemo, amplituda dogodka navzdol pa spremembo diskretnega zmanjšanja membranske kapacitete na koncu dogodka zaradi odcepljanja predvidoma istega mešička od plazmaleme.

Časovni interval med dogodkoma [s] je časovni interval med začetki dogodkov (med začetkom prvega in med začetkom drugega dogodka).



Slika 14: Parametri, ki smo jih izračunali iz koordinat časovne osi in amplitud. Dolžina dogodka, amplituda skoka navzgor in navzdol ter časovni interval med dogodkoma. (1) prikazuje dogodek številka 1, (2) pa dogodek številka 2, ki se je pojavil za prvim.

3.3.7 Statistične metode, uporabljeni pri analizi rezultatov

Rezultate meritve smo analizirali s programom Microsoft Office Excel 2003, statistično primerjavo smo opravili s Studentovim T-testom.

4 REZULTATI

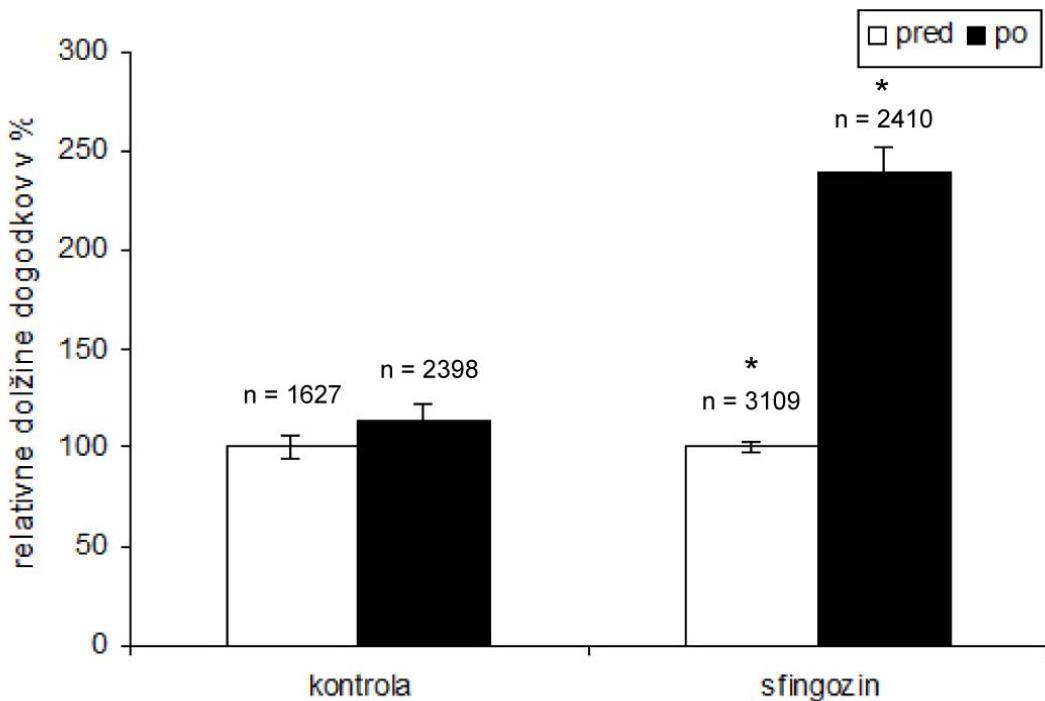
4.1 STIMULACIJA S SFINGOZINOM PODALJŠA DOLŽINE DOGODKOV IN ČASOVNE INTERVALE MED DOGODKI

Opravili smo 34 uspešnih poskusov, od tega 27 s stimulacijsko raztopino in 7 s kontrolno. Poleg tega smo na vsakem posnetku pred dodatkom učinkovine snemali kontrolni del. Z meritvami, kjer smo namesto stimulacije uporabili kontrolno raztopino, ki je vsebovala enako količino DMSO kot v stimulacijski raztopini, v kateri je bil raztopljen sfingozin, smo želeli preveriti dvoje. Prvič, da DMSO, kot sestavina raztopine, v kateri je raztopljen sfingozin, ne vpliva na merjene parametre. Drugič, da do sprememb parametrov ne prihaja zaradi dolžine meritve.

Analize izračunanih parametrov smo izvedli na vseh 34-ih poskusih. Ločeno smo obravnavali meritve, stimulirane s stimulacijsko in kontrolno raztopino. Meritve in izračunane parametre vseh meritev smo ločili na čas pred in po stimulaciji. Vseh dogodkov pri 27-ih meritvah, stimuliranih s stimulacijsko raztopino, je bilo pred stimulacijo 3109, po stimulaciji pa 2410. Pri kontrolni raztopini sedmih meritev je bilo vseh dogodkov pred stimulacijo 1627, po stimulaciji pa 2398. Pri meritvah s stimulacijsko raztopino smo opazili spremembe v času trajanja dogodkov, amplitudah dogodkov navzgor in navzdol ter frekvenci dogodkov.

Povprečen čas odprtosti fuzijske pore se je po dodatku stimulacijske raztopine povečal za $239,36 \pm 12,91\%$ (povprečje \pm standardni odklon). Izvedli smo Studentov T-test ki je pokazal, da je povprečen čas odprtosti fuzijske pore statistično značilno večji po dodatku sfingozina ($P < 0,00001$). Povprečen čas odprtosti fuzijske pore pri meritvah s stimulacijsko raztopino pred stimulacijo je bil $0,21 \pm 0,01$ s, po stimulaciji pa statistično značilno daljši $0,50 \pm 0,03$ s ($P < 0,00001$).

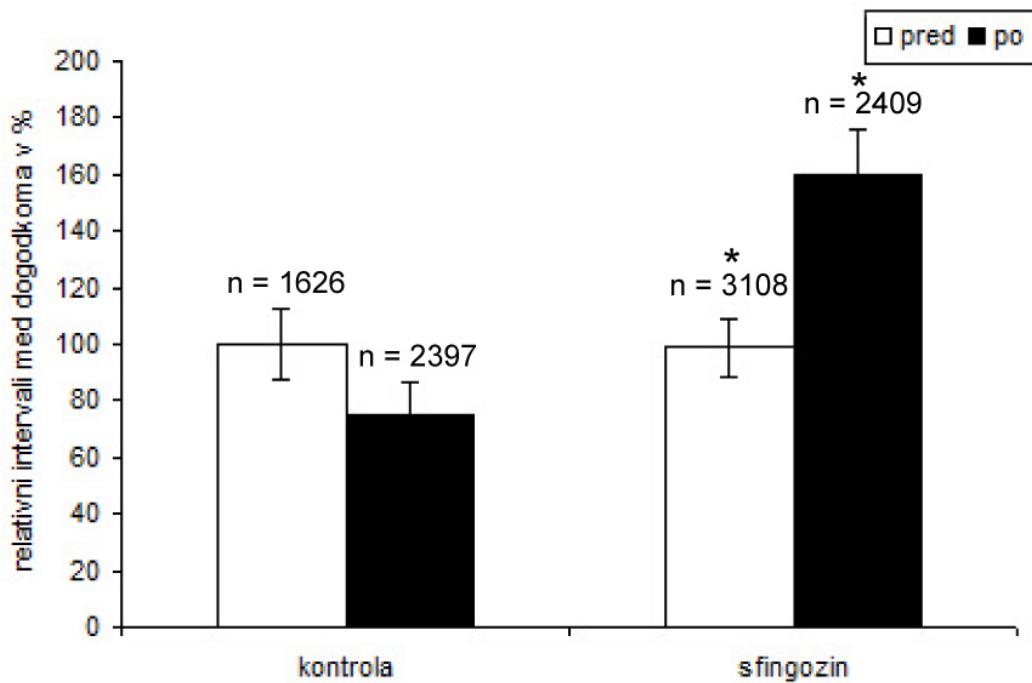
Pri meritvah, stimuliranih s kontrolno raztopino, se relativna dolžina s standardnim odklonom ni značilno zvečala ($114,07 \pm 7,84\%$), zato smo zaključili, da se dolžina odprtja fuzijske pore po stimulaciji s kontrolno raztopino ne spremeni.



Slika 15: Relativne dolžine dogodkov (dolžine odprtosti fuzijske pore) pred in po stimulaciji s kontrolno ali stimulacijsko raztopino. (*) predstavlja statistično značilnost analize ($P < 0,05$). (n) predstavlja število vseh dogodkov, daljice pa standardni odklon.

Po stimulaciji s stimulacijsko raztopino smo opazili tudi spremembe v relativnem intervalu med dogodkoma, ki se je povečal (Slika 16). Relativni intervali med dogodkoma s standardnim odklonom so se po stimulaciji s stimulacijsko raztopino statistično značilno povečali na $158,77 \pm 16,07\%$ ($P < 0,001$). Povprečni intervali dogodkov, stimuliranih s stimulacijsko raztopino pred stimulacijo, so bili $2,58 \pm 0,27$ s, po stimulaciji pa statistično značilno daljši $4,19 \pm 0,42$ s (povprečje standardni odklon; $P < 0,001$).

Pri meritvah s kontrolno raztopino se interвали dogodkov po stimulaciji niso spremenili ($74,83 \pm 11,58\%$; Studentov T-test ni pokazal statističnega zmanjšanja relativnih intervalov med dogodkoma).

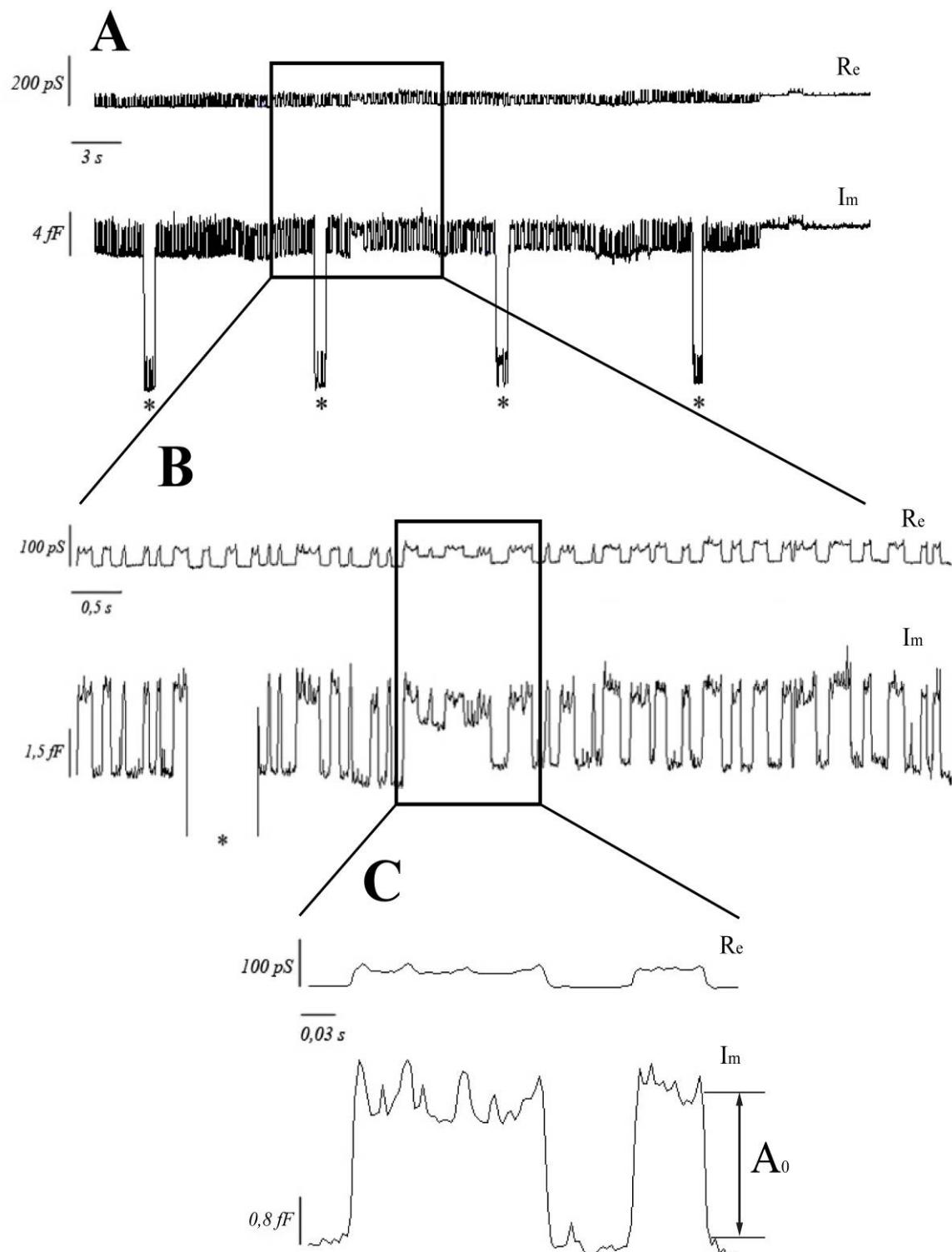


Slika 16: Relativni intervali med dogodkoma pred in po stimulaciji s kontrolno ali stimulacijsko raztopino. (*) predstavlja statistično značilnost analize ($P < 0,001$). (n) predstavlja število vseh dogodkov, daljice pa standardni odklon.

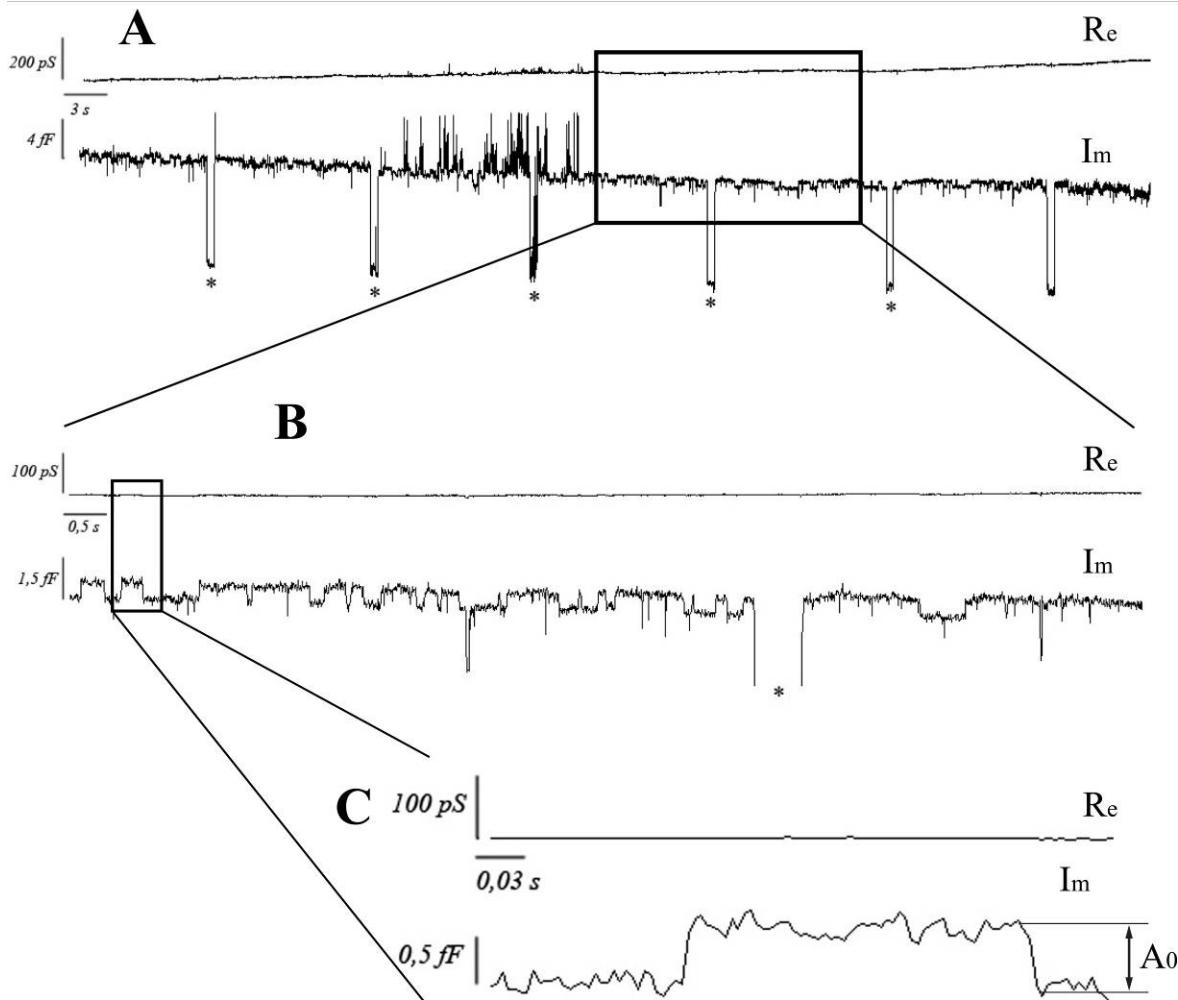
4.2 SFINGOZIN POVZROČI ZMANJŠANJE AMPLITUDE DOGODKOV

Meritve amplitude diskretnih skokov membranske kapacitivnosti so pokazale, da se relativna amplituda diskretnega fuzijskega dogodka po dodatku stimulacijske raztopine s sfingozinom zmanjša, pri kontroli pa ostaja nespremenjena (Slika 17, 18, 19 in 20).

Slika 17 prikazuje tipičen poskus meritve pred stimulacijo, kjer smo na izoliranem koščku membrane snemali signal realne komponente (R_e) (slika A, B in C zgoraj), ki odraža spremembe membranske prevodnosti, in signal imaginarno komponente (I_m) (slika A, B in C spodaj), ki kaže membransko kapaciteto izoliranega dela membrane. Povečava (B) prikazuje številne reverzibilne dogodke, na povečavi (C) pa je njihova amplituda in dolžina bolj natančno vidna. Dogodki na posnetku imajo amplitudo med 2,0 in 2,3 fF in so posledica odpiranja ter zapiranja fuzijske pore mešičkov, ki vsebujejo prolaktin (Stenovec in sod., 2004). Z zvezdico (*) so prikazani kalibracijski pulzi (10 fF), ki so služili za nastavitev faznega kota na fazno občutljivem ojačevalniku. Pri pravilno nastavljenem faznem kotu so kalibracijski pulzi imeli negativni odklon samo na I_m , brez projekcij na R_e .



Slika 17: Primer diskretnih skokov v membranski kapaciteti pred stimulacijo s stimulacijsko raztopino (A). Na povečanih izsekih (B) in (C) je amplituda diskretnih skokov lepo razvidna. Zvezda (*) predstavlja kalibracijski pulz, (A_0) amplitudo diskretnih skokov merjeno v fF. (R_e) predstavlja signal realne komponente (A, B in C zgoraj), (Im) pa signal imaginarni komponente (A, B in C spodaj).



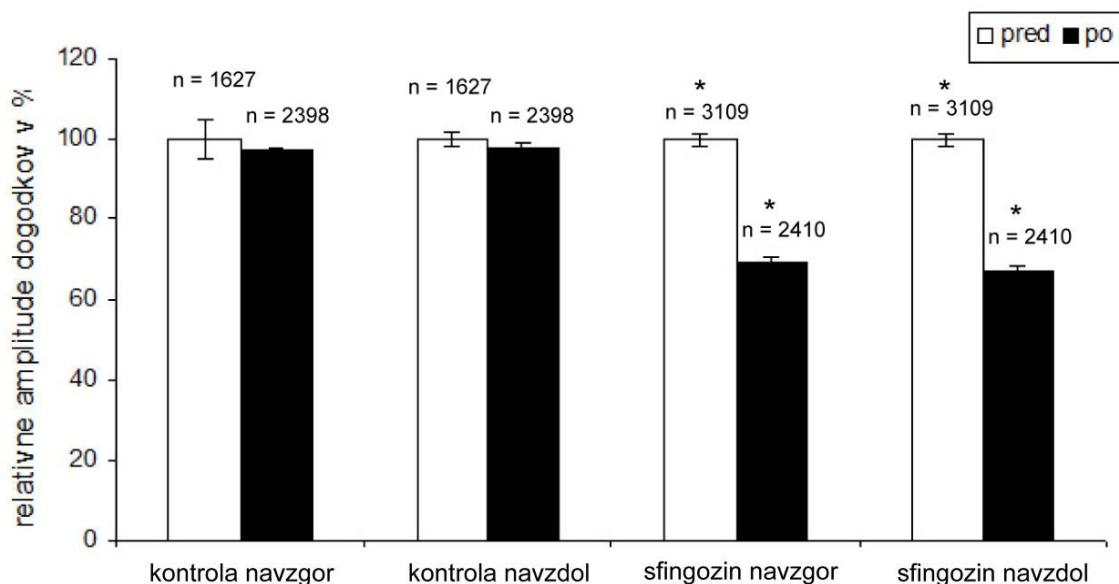
Slika 18: Primer diskretnih skokov v membranski kapaciteti po stimulaciji s sfingozinom (stimulacijskim medijem) (A). Na povečanih izsekih (B) in (C) je amplituda diskretnih skokov dobro vidna. Zvezda (*) predstavlja kalibracijski pulz, (A_0) amplitudo diskretnih skokov, merjeno v fF. (R_e) predstavlja signal realne komponente (A, B in C zgoraj), (I_m) pa signal imaginarno komponente (A, B in C spodaj).

Slika 18 prikazuje tipičen poskus meritve po stimulaciji s stimulacijsko raztopino. Slika A zgoraj prikazuje signal realne komponente (R_e), (slika A spodaj) pa signal imaginarno komponente (I_m). Povečava (B) prikazuje številne reverzibilne dogodke, na povečavi (C) pa sta njihova amplituda in dolžina bolj natančno vidni. Dogodki na posnetku imajo amplitudo med 0,5 in 0,9 fF.

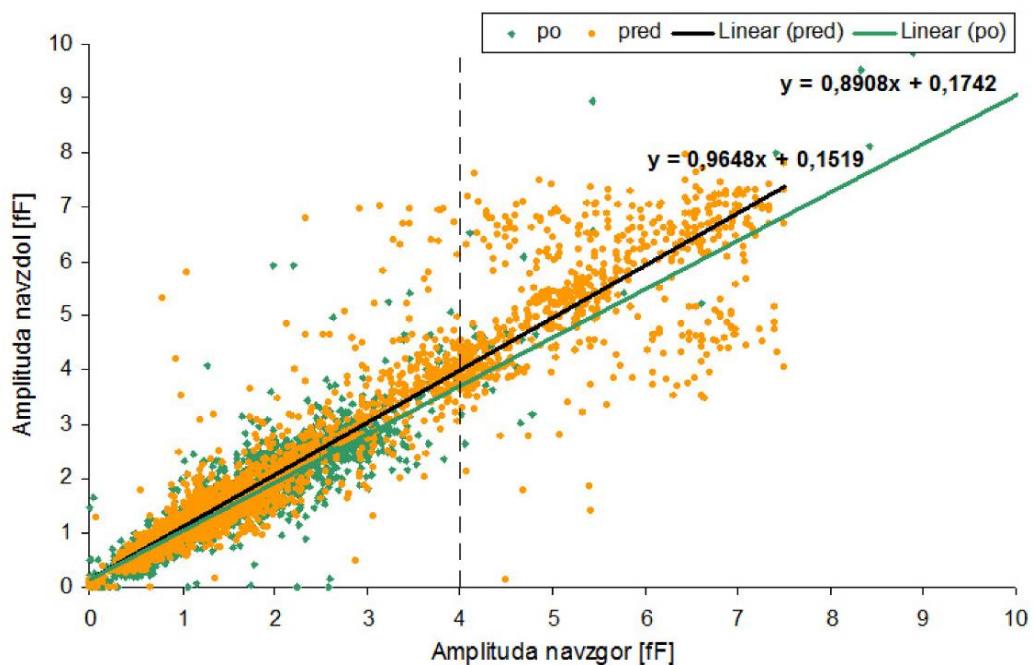
Relativna amplituda se je pri meritvah stimuliranih s sfingozinom zmanjšala na $69,33 \pm 1,14\%$ pri amplitudah skokov navzgor, pri amplitudah skokov navzdol pa na $67,31 \pm 1,08\%$. Vzorce smo testirali s Studentovim T-testom ($P < 0,00001$ in $P < 0,00001$), ki je pokazal, da je zmanjšanje amplitud statistično značilno. Povprečna amplituda s standardnim odklonom pred stimulacijo je bila $2,30 \pm 0,03$ fF, po stimulaciji pa je bila statistično značilno manjša $1,57 \pm 0,03$ fF ($P < 0,00001$). Pri povezavi med amplitudami dogodkov navzgor in navzdol pred ter po stimulaciji pri meritvah, stimuliranimi s sfingozinom, opazimo 615 od 3109 dogodkov z amplitudo, večjo od 4fF. Pri amplitudah

dogodkov po stimulaciji pa opazimo oblak meritev, katerih amplitude so večinoma manjše od 4 fF, le 44 od 2410 dogodkov ima amplitudo večje od 4fF. Test Hi-kvadrat ($P < 0,001$) je pokazal, da je zmanjšanje amplitud statistično značilno (Slika 19).

Pri kontroli se relativna amplituda po stimulaciji skokov navzgor ($97,30 \pm 0,75\%$) niti skokov navzdol ($98,09 \pm 0,75\%$) ni statistično značilno spremenila.



Slika 19: Relativne amplitude fuzijskih dogodkov pred in po stimulaciji s kontrolno ali stimulacijsko raztopino. (*) predstavlja statistično značilnost analize ($P < 0,00001$), (n) število vseh dogodkov, daljice pa standardni odklon.



Slika 20: Povezava med amplitudami dogodkov navzgor in navzdol pred ter po stimulaciji pri meritvah, stimuliranimi s sfingozinom. Pri amplitudah pred stimulacijo opazimo veliko dogodkov z amplitudo, večjo od 4fF (615 od 3109 dogodkov), pri amplitudah dogodkov po stimulaciji pa opazimo oblak meritev, katerih amplitude so večinoma manjše od 4 ff (44 od 2410 dogodkov), kar je statistično značilno ($P < 0,001$). Premici se prilegata s podatki po linearni odvisnosti. Enačba ($y = 0,9648x + 0,1519$) predstavlja enačbo premice amplitud dogodkov pred stimulacijo ($n = 3109$), enačba ($y = 0,8908x + 0,1742$) pa premico amplitud dogodkov po stimulaciji ($n = 2410$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen našega dela je bil preveriti, ali ima molekula sfingozina vpliv na dinamiko posameznih eksocitoznih dogodkov in na dinamiko fuzijske pore pri podganjih laktotrofih. Mehanizmi nastanka in razširjanja fuzijske pore med plazmalemo in mešičkom so še neznani (Vardjan in sod., 2007), zato bi poznavanje mehanizmov eksocitoze prispevalo k uravnavanju izločanja hormonov in razumevanju bolezni izločanja hormona prolaktina, kot je hiperprolaktinemija in hipoprolaktinemija. Hormon prolaktin je namreč vključen v veliko fizioloških procesov v različnih organih (Corrette in sod., 1995: 116), ima pomemben vpliv na mlečne žleze, reproduksijski sistem sesalcev (Serri in sod., 2003; Freeman in sod., 2000) ter na vedenje, povezano z razmnoževanjem (Freeman in sod., 2000).

Za ugotavljanje vpliva sfingozina na uravnavano eksocitozo smo uporabili primarno kulturo podganjih laktotrofov, ker v njih poteka izločanje hormona prolaktina z eksocitozo v bazalnih in stimuliranih razmerah (Vardjan in sod., 2009). Njihovo izločevalno aktivnost smo merili z elektrofiziološko metodo vpete napetosti krpice membrane s konfiguracijo pritrjene celice (ang. cell-attached patch-clamp). Merili smo membransko kapacitivnost (C_m), ki je premo sorazmerna s površino (Zorec in sod., 1991; Neher in Marty, 1982) in se pri eksocitozi zaradi dodajanja membrane mešička poveča (Heinemann in sod., 1994; Neher 1992), pri procesu endocitoze pa zmanjša (Betz in Angelson, 1998; Neher in Marty, 1982). Diskretni koraki v C_m , predstavljajo interakcije med posameznimi mešički in plazmalemo (Kreft in Zorec, 1997; Gillis in sod., 1995: 156; Zorec in sod., 1991a). Uporabljeni metoda visoke ločljivosti omogoča spremeljanje sprememb membranske kapacitivnosti v velikosti nekaj femtofaradov (Almers in Neher, 1986), kar zadošča za spremeljanje fuzije posameznega mešička (Neher, 1992). Velika prednost meritev kapacitivnosti plazmaleme pred biokemijskimi metodami je ta, da imajo meritve zelo veliko časovno ločljivost in da odražajo dogajanja na eni sami celici. (Kreft, 1999). Krpica membrane, ki jo izoliramo s pipeto pokriva približno 200 fF membrane, kar predstavlja približno 2 % celotne celične površine. Ker je približno 100 mešičkov naključno razporejenih na površini membrane, je potrebno veliko število meritev, da lahko z gotovostjo opišemo lastnosti diskretnih skokov C_m (Stenovec in sod., 2004).

Diskretni skoki membranske kapacitivnosti, ki smo jih izmerili v naših meritvah, so bili tako pred, kakor po stimulaciji s sfingozinom večji od 1 fF, zato verjetno predstavljajo dogodek fuzije in fisije mešičkov, ki v laktotrofih vsebujejo prolaktin (Stenovec in sod., 2004). Na Slikah 17 in 18 je prikazan zapis časovno ponavljajočih se diskretnih skokov membranske kapacitivnosti, ki so verjetno posledica ritmičnega odpiranja in zapiranja mešičkov. Meritve C_m so pokazale, da je večina dogodkov tako v stimuliranih, kakor tudi nestimuliranih razmerah tranzientna (prehodna), podobne rezultate so dobili tudi Vardjan in sod. (Vardjan in sod., 2007). Z našimi meritvami smo podobno kot Jorgačevski in sod. ugotovili, da se reverzibilni in ireverzibilni dogodki v laktotrofih pojavijo spontano. Fuzijska pora v mirujočih in stimuliranih laktotrofih pa se ponavljajoče odpira in zapira (Vardjan in sod., 2009).

Naši poskusi kažejo, da sfingozin podaljša dolžine dogodkov in časovne intervale med njimi, hkrati pa povzroči tudi zmanjšanje amplitude skokov. Spremembo zmanjšanja amplitude skoka po stimulaciji s sfingozinom lahko utemeljimo z razlago, da so pred stimulacijo prisotni na celični periferiji večji mešički prolaktina, sfingozin pa povzroči njihovo irreverzibilno fuzijo (ang. full fusion). V bližino plazmaleme nato pridejo novi mešički, ki so manjši od prejšnjih, zato so amplitude skokov po stimulaciji s sfingozinom manjše. Ugotovili smo, da so si amplitude sosednjih skokov membranske kapacitivnosti in posledično velikosti mešičkov podobne. Zaradi precejšnje variabilnosti velikosti mešičkov v laktotrofih ni verjetno, da bi časovno pojavljanje diskretnih skokov predstavljalo ritmično fuzijo različnih mešičkov z enakim premerom.

Podaljšanje dolžine dogodkov in časovnih intervalov po stimulaciji s sfingozinom je verjetno posledica stabilizacije fuzijske pore. Sfingozin v sinaptičnih mešičkih aktivira sinaptobrevin in pospeši sestavljanje kompleksa SNARE, ki je ključen za fuzijo membran (Darios in sod., 2009). Sfingozin v kombinaciji s sinaptobrevinom zveča eksocitozo v izoliranem živčnem končiču, motorični ploščici, nevroendokrinih celicah in nevronih hipokampa (Darios in sod., 2009). Naši poskusi kažejo, da sfingozin podaljša dolžine dogodkov in hkrati podaljša tudi časovne intervale med dogodki. Darios in sod. so odkrili, da sfingozin v citoplazmi vpliva na zvečano eksocitozo v melanotrofnih celicah. Preprečevanje nekontroliranega sestavljanja terciarnega kompleksa SNARE je lahko pomembno za uravnavanje fuzije mešičkov in za živčni prenos (Darios in sod., 2009).

Glavna ovira pri sproščanju hormona iz posameznega mešička je njegova difuzija skozi fuzijsko poro (Jorgačevski in sod., 2008), ki se je v skladu s predhodnimi raziskavami (Jorgačevski in sod., 2008) tudi pri naših poskusih odpirala tranzientno. Sfingozin je v naših poskusih povzročil podaljšanje časa trajanja dogodkov, kar zveča sproščanje hormona iz posameznega mešička (Jorgačevski in sod., 2008). S podaljšanjem časa trajanja dogodka se namreč podaljša povezava med lumnom mešička in zunajceličnim prostorom (Jorgačevski in sod., 2008). Podaljšan čas dogodkov ima pomembno fiziološko vlogo pri povečanju učinkovitosti sproščanja hormona prolaktina v zunajcelični prostor po stimulaciji (Vardjan in sod., 2009). Za potrditev zvečanega sproščanja hormona PRL v zunajcelični prostor po stimulaciji s sfingozinom bodo potrebne nadaljnje raziskave.

Zaključimo lahko, da sfingozin vpliva na izločevalno aktivnost laktotrofov, ki vodi v zvečano izločanje prolaktina. Sfingozin povzroči podaljšanje odprtosti fuzijske pore (daljši čas trajanja dogodka). Predvidevamo, da je posledica daljše odprtosti fuzijske pore zvečano izločanje prolaktina, kar bi bilo lahko uporabno pri zdravljenju hipoprolakinemije.

5.2 SKLEPI

Rezultati raziskav za diplomsko nalogo kažejo, da se podganji laktotrofi neposredno odzivajo na sfingozin ter so tako potrdili delovno hipotezo.

- Tranzientni skoki membranske kapacitivnosti, ki smo jih izmerili v naših posnetkih na laktotrofih, najverjetneje predstavljajo dogodke fuzije in fisije mešičkov, ki vsebujejo prolaktin.
- Po stimulaciji s sfingozinom so se dolžine odprtosti fuzijske pore in časovni intervali med dogodki statistično značilno zvečali. Sklepamo, da sfingozin povzroči spremembe v konfiguraciji fuzijske pore, ki vplivajo na dolžino odprtosti fuzijske pore ter časovne intervale med dogodki.
- Amplitude diskretnih skokov membranske kapacitivnosti po stimulaciji s sfingozinom so bile statistično značilno manjše od amplitud pred stimulacijo. Pojav smo razložili z ireverzibilno fuzijo večjih mešičkov s plazmalemo in nato z zlivanjem manjših mešičkov.

6 POVZETEK

Hipoprolaktinemija je stanje znižane koncentracije serumskega prolaktina in je običajno posledica disfunkcije anteriornega režnja hipofize. Pomanjkanje prolaktina je posledica nezmožnosti laktotrofov za izločanje prolaktina, kar se odraža v nezadostni laktogenezi, menstrualnih nepravilnostih, pozni puberteti, sterilnosti ali zmanjšani plodnosti. PRL je vključen v veliko raznolikih fizioloških procesov v različnih organih, kot je laktacija, reprodukcija in homeostaza organizma.

Z elektrofiziološkimi metodami smo raziskali, ali molekula sfingozina vpliva na dinamiko posameznih eksocitoznih dogodkov in na dinamiko fuzijske pore. Zato smo merili lastnosti elementarnih dogodkov fuzije mešička v plazmalemo celic hipofize pri kontrolnih razmerah in v razmerah s stimulacijo s sfingozinom. Ker sfingozin v sinaptičnih mešičkih aktivira sinaptobrevin in tvori kompleks SNARE, ki je vključen v membransko fuzijo, hkrati pa dvig sfingozina v plazmalemi vpliva na zvečano eksocitozo v melanotrofnih celicah, smo želeli ugotoviti, na katere elemente eksocitoze vpliva sfingozin v laktotrofnih celicah.

Merili smo izločevalno aktivnost posameznih laktotrofov z elektrofiziološko metodo vpete napetosti krpice membrane s konfiguracijo pritrjene celice (ang. cell-attached patch-clamp), pri kateri smo spremljali membransko kapacitivnost (C_m), ki je premo sorazmerna s površino in se pri eksocitozi zaradi dodajanja membrane mešička zveča. Meritve kapacitivnosti vpete krpice membrane so pokazale diskretne skoke v C_m , ki predstavljajo interakcije med posameznimi mešički in plazmalemo. Na vseh 34-ih poskusih smo iz meritve izračunali več elementov eksocitoznih dogodkov. Ločeno smo obravnavali meritve, stimulirane s stimulacijsko in kontrolno raztopino.

Ugotovili smo, da sfingozin vpliva na lastnosti eksocitoze pri podganjih laktotrofih. Stimulacija s sfingozinom je povzročila podaljšanje časa odprtrega stanja fuzijske pore, zvečanje amplitud skokov kapacitivnosti navzgor in navzdol ter zmanjšanje frekvence eksocitoznih dogodkov. Menimo, da sfingozin stabilizira fuzijsko poro in tako podaljša dolžino odprtrega stanja. Dolžina odprtosti fuzijske pore se je po dodatku stimulacijske raztopine statistično značilno zvečala za $239,36 \pm 12,91\%$ (povprečne \pm standardni odklon) ($P < 0,00001$; $n = 3109$). Pri meritvah, stimuliranih s kontrolno raztopino, se dolžina ni značilno zvečala ($114,07 \pm 7,84\%$; $n = 1627$). Intervali med dogodkoma so se po stimulaciji s stimulacijsko raztopino statistično značilno zvečali na $158,77 \pm 16,07\%$ ($P < 0,001$), pri meritvah s kontrolno raztopino pa se intervali dogodkov po stimulaciji niso spremenili. Amplitude diskretnih skokov membranske kapacitivnosti po stimulaciji s sfingozinom so se statistično značilno zmanjšale. Menimo, da so manjši skoki kapacitivnosti posledica ireverzibilne fuzije večjih mešičkov s plazmalemo in nadaljnjo fuzijo manjših mešičkov. Amplituda se je pri meritvah, stimuliranih s sfingozinom, zmanjšala na $69,33 \pm 1,14\%$ pri amplitudah skokov navzgor, pri amplitudah skokov navzdol pa na $67,31 \pm 1,08\%$ (oba $P < 0,00001$). Pri kontroli se amplituda po stimulaciji skokov navzgor ($97,30 \pm 0,75\%$) niti skokov navzdol ($98,09 \pm 0,75\%$) ni statistično značilno spremenila.

Raziskava je potrdila našo hipotezo, da sfingozin vpliva na eksocitozo pri laktotrofih sesalcev. Sfingozin podaljša odprtost fuzijske pore (oz. čas trajanja dogodka), kar verjetno poveča učinkovitost sproščanja hormona prolaktina v zunajcelični prostor.

7 VIRI

- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2004. Intracellular Compartments and Transport. V: Essential cell biology. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (ed.). 2nd edition. New York, Garland Science: 479-532.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 1998. Intracellular Compartments and Transport in Membrane structure. V: Essential cell biology: An introduction to the Molecular Biology of the Cell. Albert B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (ed.). 1st edition. New York, Garland Publishing: 447-480 in 347-370.
- Almers W., Neher E., 1986. Gradual and Stepwise Changes in the Membrane Capacitance of Rat Peritoneal Mast Cells. *The Journal of Physiology*, 386, 1: 205-217.
- Andersen B., Rosenfeld M. G. 2001. POU Domain Factors in the Neuroendocrine System: Lessons from Developmental Biology Provide Insights into Human Disease. *Endocrine Reviews*, 22, 1: 2-35.
- Asa S. L., Kovacs K., Melmed S. 2002. Functional Anatomy of the Hypothalamic Pituitary Axix. V: The pituitary. Melmed S. (ed.). 2nd edition. Cambridge, Blackwell-Science: 3-45.
- Bekkers J. M. 1997. Sucking up to Cells: the patch-clamp technique in neuroscience. V: Neuroscience methods: A quide for Sdvanced Students. Rosemary M. (ed.). Canberra, Harwood Academic: 40-45.
- Benson C. T. Prolactin Deficiency. 2004. E-Medicine (5. avg. 2008).
<http://emedicine.medscape.com> (1. avg. 2009).
- Betz W. J., Angelson J. K. 1998. The Synaptic Vesicle Cycle. *Annual Review of Physiology*, 60: 347-363.
- Boyer R. 2005. Lipidi, biološke membrane in transport. V: Temelji biokemije. Boyer R. (ur.). Ljubljana, Študentska založba: 207-240.
- Burgoyne R. D., Alvarez de Toledo G. 2000. Fusion proteins and fusion pores. *EMBO Reports*, 1, 4: 304-307.
- Chapman E. R. 2002. Synaptotagmin: A Ca^{2+} sensor that triggers exocytosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 7: 498-508.
- Cohen L. E., Radovick S. Molecular Basic of Combined Pituitary Hormone Deficiencies. *Endocrine Reviews*, 23, 4: 431-422.

- Colombaioni L., Garcia-Gil M. 2004. Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Research Reviews*, 46, 3: 328-355.
- Corrette B. J., Bauer C. K., Schwarz J. R. 1995. Electrophysiology of Anterior Pituitary Cells. V: The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells. Scherubl H., Hescheler J. K. J. (ed.). 1st edition. Boca Raton, CRC Press: 101–144.
- Darios F., Wasser C., Shakiryanova, Giniatullin A., Goodman K., Munoz-Bravo J. L., Raingo J., Jorgačevski J., Kreft M., Zorec R., Rosa J. M., Gansia L., Gutiérrez L. M., Binz T., Giniatullin R., Kavalali E. T., Davletov B. 2009. Sphingosine Facilitates SNARE Complex Assembly and Activates Asynaptic Vesicle Exocytosis. *Neuron*, 62, 5: 683-694.
- Florent-Béchard S., Desbène C., Garcia P., Allouche A., Youssef I., Escanyé M. C., Koziel V., Hanse M., Malaplate-Armand C., Stenger C., Kriem B., Yen-Potin F. T., Olivier J. L., Pillot T., Oster T. 2009. The essential role of lipids in Alzheimer's disease. *Biochimie*, 91, 6: 804–809.
- Freeman M. E., Grattan D. R., Houpt T. A. 2008. The Hypothalamus. V: Neuroscience in Medicine. Conn P. M. (ed.). 3rd edition. Beaverton, Humana Press: 301–358.
- Freeman M. E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. 2000. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 80, 4: 1523-1631.
- Gibson F., Overton P. G., Smulders T. V., Schultz S. R., Eglen S. J., Ingram C. D., Panzeri S., Bream P., Whittington M., Sernagor E., Cunningham M., Adams C., Echtermeyer C., Simonotto J., Kaiser M., Swan D. C., Fletcher M., Lord P. 2008. Minimum Information about a Neuroscience Investigation (MINI): Electrophysiology. *Nature Precedings* (25. mar. 2009)
<http://precedings.nature.com/documents/1720/version/1> (5. avg. 2009).
- Gillis K. D. 1995. Techniques for membrane capacitance measurement. V: Single-Channel Recording. Sakmann B., Neher E. (ed.). 2 nd edition. New York, Plenum Press: 155–197.
- Hannun Y. A., Loomis C. R., Merrill ml. A. H., Bell R. M. 1986. Sphingosine Inhibition of Protein Kinase C Activity and of Phorbol Dibutyrate Binding *in Vitro* and in Human Platelets. *The Journal of Biological Chemistry*, 26, 27: 12604-12609.
- Heinemann C., Chow R. H., Neher E., Zucker R. S. 1994. Kinetics of the Secretory Response in Bovine Chromaffin Cells Following Flash Photolysis of Caged Ca^{2+} . *Biophysical Journal*, 67, 7: 2546-2557.
- Horseman N. D. 2001. Prolactin and the Prolactin Receptor. V: Transgenics in Endocrinology. Matzuk M. M., Brown C. W., Kunar T. R. (ed.). 1st edition. Totowa, Humana Press: 231–245.

- Jerrell J. M., Bacon J., Burgis J. T., Menon S. 2009. Hyperprolactinemia-Related Adverse Events Associated with Antipsychotic Treatment in Children and Adolescents. *Journal of Adolescent Health*, 45, 1: 70-76.
- Jorgačevski J. 2009. »Delež prolaktin vsebujočih celič«. Laboratorij za nevroendokrinologijo-molekularno celično fiziologijo, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani (osebni vir, marec 2009).
- Kelly M. A., Rubinstein M., Asa S. L., Zhang G., Saez C., Bunzow J. R., Allen R. G., Hansko R., Ben-Jonathan N., Grandy D. K., Low M. J. 1997. Pituitary Lactotroph Hyperplasia and Chronic Hyperprolactinemia in Dopamine D2 Receptor-Deficient Mice. *Neuron*, 19, 1: 103-113.
- Kreft M., Zorec R., 1997. Cell-attached measurements of attofarad capacitance steps in rat melanotrophs. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 434, 2: 212-214.
- Li L., Chin L.-S. 2003. The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 5: 942-960.
- Liu H., Chakravarty D., Maceyka M., Milstein S., Spiegel S. 2002. Sphingosine Kinases: A Novel Family of Lipid Kinases. V: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Volume 71. Moldave K. (ed.). New York, Academic Press: 493–512.
- Manzon L. A. 2002. The Role of Prolactin in Fish Osmoregulation: A Review. *General and Comparative Endocrinology*, 125, 2: 291-310.
- Mitchner N. A., Garlick C., Ben-Jonathan N. 1998. Cellular Distribution and Gene Regulation of Estrogen Receptors α and β in the Rat Pituitary Gland. *Endocrinology*, 139, 9: 3976-3983.
- Neher E. 1992. Ion channels for communication between and within cells. *The EMBO Journal*, 11, 5 : 673-1679.
- Neher E., Marty A. 1982. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 21: 6712-6716.
- Poyraz B. Ç., Aksoy C., Balcioğlu I. 2008. Increased incidence of autoimmune thyroiditis in patients with antipsychotic-induced hyperprolactinemia. *European Neuropsychopharmacology*, 18, 9: 667-672.
- Qu W., Ploessl K., Truong H., Kung M. P., Kung H. F. 2009. Iodophenyl tagged sphingosine derivatives: Synthesis and preliminary biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 13: 3382-3385.
- Sakmann B. 1992 Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *The EMBO Journal*, 11, 6: 2003-2016.

- Serri O., Chik C. L., Ur E., Ezzat S. 2003. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. Canadian Medical Association Journal, 196, 6: 575-581.
- Shenenberger D., Knee T. Hyperprolactinemia. 2004. E-Medicine (12. okt. 2007). <http://emedicine.medscape.com> (1. avg. 2009).
- Shin S.H., Milligan J. V. 1998. Anterior pituitary cells. V: Endocrine cell culture. Bidey S. P. (ed.). 1st edition. Cambridge, Cambridge University Press, 38–61.
- Sohal P. S., Cornell R. B. 1990. Sphingosine Inhibits the Activity of Rat Liver CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase. The Journal of Biological Chemistry, 265, 20: 11741-11750.
- 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 Journal of the Federation of American Society for Experimental Biology, 18, 11: 1270-1272.
- Thomas D., Guthridge M., Woodcock J., Lopez A. 2005. 14-3-3 Protein Signaling in Development and Growth Factor Responses. V: Current Topics in Developmental Biology, Volume 67. Schatten G. P. (ed.). New York, Academic Press: 286–305.
- Vardjan N., Jorgačevski J., Stenovec M., Kreft M., Zorec R. 2009. Compound Exocytosis in Pituitary Cells. Annals of the New York Academy of Science, 1152, 1: 63-75.
- Vardjan N., Stenovec M., Jorgačevski J., Kreft M., Zorec R. 2007. Subnanometer Fusion Pores in Spontaneous Exocytosis of Peptidic Vesicles, The Journal of Neuroscience, 27, 17: 4737-4746.
- Watson E. L. 1999. GTP-Binding Proteins and Regulated Exocytosis. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 10, 3: 184-306.
- Yang M., Huang L., Liu W., Sheng Z., Xie H., Liao E. 2008. Prolactin may be a promising therapeutic target for myasthenia gravis: Hypothesis and importance. Medical Hypotheses, 70, 5: 1017-1020.
- Zakon o zaščiti živali. (ZZZiv-UPB2) Ur. l. RS, št. 43/07.
- Zorec R., Henigman F., Mason W. T., Kordaš M. 1991. Electrophysiological Study of Hormone Secretion by Single Adenohypophyseal Cells. Methods in Neurosciences, 4: 194-210.
- Zorec R., Sikdar A. K., Mason W. T. 1991a. Increased Cytosolic Calcium Stimulates Exocytosis in Bovine Lactotrophs. The Journal of General Physiology, 97, 3: 473-497.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Robertu Zorcu, ki mi je omogočil izvedbo diplomske naloge in mi pomagal s strokovnimi nasveti.

Posebna zahvala je namenjena mentorju izr. prof. dr. Marku Kreftu za strokovne nasvete, vzpodbudo in kritike pri pisanju diplomskega dela ter čas, ki si ga je vzel zame.

Zahvaljujem se Jerneju Jorgačevskemu za prijazno pomoč in koristne nasvete pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Hvala Ani Isabeli Costa Calejo za uvedbo v laboratorijsko delo in za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Hvala vsem iz Laboratorija za nevroendokrinologijo-molekularno celično fiziologijo na Inštitutu za patološko fiziologijo za pomoč pri delu v laboratoriju.

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem izr. prof. dr Gregorju Majdiču.

Velika zahvala gre tudi mojim najbližnjim, ki so me podpirali pri doseganju zastavljenih ciljev.

Hvala vsem.