

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/126



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J3-4146
Naslov projekta	Mobilnost sekrecijskih mešičkov in homeostaza kalcija v astrocitih
Vodja projekta	15666 Marko Kreft
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	7560
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	07.2011 - 06.2014
Nosilna raziskovalna organizacija	381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	106 Institut "Jožef Stefan" 2451 Zavod Biomedicinski Raziskovalni Inštitut
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	3 MEDICINA 3.03 Nevrobiologija
Družbeno-ekonomski cilj	13.03 Medicinske vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	3 Medicinske vede 3.01 Temeljna medicina

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Veda o možganih je vstopila v novo obdobje, v katerem razumemo celice glije kot aktivne udeležence pri uravnavanju delovanja možganskih omrežij in vedenju, tako v zdravju kot boleznih. Astrociti, najštevilnejši tip celic glije v možganih človeka, so mnogonamenske celice, ki modulirajo sinaptično plastičnost, učenje, spomin in spanje. Astrociti lahko signalizirajo sosednjim celicam na različne načine - preko ionskih kanalčkov, prenašalcev, membranskih receptorjev in z eksocitozo. Ključni mehanizem kemičnega signaliziranja je uravnavana

eksocitoza, ki je še vedno predmet razprav. Navkljub razumevanju nekaterih bistvenih dejavnikov, ki so vključeni v eksocitotno zlivanje mešičkov, je presenetljivo malo znanega o pato-/fiziološkem uravnavanju prometa mešičkov ter izločanju prenašalcev glije. Uravnavanje prometa mešičkov s pato-/fiziološkimi dejavniki lahko proučujemo le s tehnikami, ki omogočajo meritve časovno-prostorskih vzorcev citosolne aktivnosti kalcija, sledenje premikov posameznih mešičkov in eksocitotno izločanje njihove vsebine. Z uporabo dveh različnih optofizioloških tehnik je bil namen tega projekta izmeriti spremembe i) homeostaze kalcija, ii) mobilnosti mešičkov in iii) eksocitotno izločanje vskladiščenih snovi, izzvine s fiziološkima regulatorjema aktivnosti astrocitov (L-glutamat, ATP), ki vplivata na metabotropne in ionotropne glutamatne receptorje ter na purinske receptorje, in deloma uravnava sproščanje kalcija iz znotrajceličnih zalog. Astrocite smo izpostavili permeabilnemu fluorescentnemu indikatorju kalcija, Fluo-4-AM (Kd ~345 nM), in v realnem času izmerili povečanje kalcijeve aktivnosti kot porast fluorescence Fluo-4. Kvantificirali smo največjo amplitudo fluorescence kalcijevega indikatorja, časovni integral povečane kalcijeve aktivnosti in čas trajanja kalcijevega odziva v posamezni celici. Vpliv dražljajev na mobilnost smo ugotavljali v peptidergičnih mešičkih, ki smo jih napolnili s sekrecijskim peptidom označenim z mutirano zeleno fluorescentno beljakovino (ANP.emd), v glutamatergičnih mešičkih označenih z zeleno fluorescentno beljakovino (VGLUT1-EGFP) in v kislih mešičkih - endosomih in lizosomih, ki smo jih obarvani z barvilom Lysotracker. Izmerili smo spremembo hitrosti mešičkov, prepotovano pot in največji odmik med gibanjem mešičkov. Namen projekta je bil tudi izmeriti učinkovitost izzvine eksocitoze na ravni cele celice s pomočjo relativnega zmanjšanja števila fluorescentnih mešičkov(ANP.emd), ki kaže na izločanje njihove vsebine, in raziskati povezavo med mobilnostjo mešičkov in verjetnostjo za zlivanje ter izločanje njihove vsebine. Dodaten namen je bil raziskati vpliv lipidnih spojin, ki interferirajo s tvorbo kompleksov SNARE in uravnava eksocitotno v nevronih in neuroendokrinih celicah, toda še nikoli niso bile raziskane v astrocitih. V sodelovanju z Dr. Bazbekom Davletovom (Cambridge, VB) smo, zato, identificirali biološko aktivne lipide, ki aktivirajo Sinaptobrevin-2 v *in vitro* liposomskem sistemu.

ANG

Brain science has entered a new era in which glial cells are considered as active participants in the control of brain circuit function and behaviour in health and disease. Astrocytes, the most abundant glial cell type in the human brain, are regarded as multifunctional cells modulating synaptic plasticity, learning, memory and sleep. Astrocytes signal to neighbouring cells via distinct gateways, like channels, transporters, membrane receptors, however the key mechanism of chemical signalling is likely mediated by regulated exocytosis, which is still debated. Despite our understanding of critical factors involved in vesicles fusion, we know surprisingly little about patho-/physiological regulation of astroglial vesicle trafficking affecting release of gliotransmitters. To verify the hypothesis of patho-/physiological regulation of vesicle trafficking, one has to be able to measure spatio-temporal patterns of calcium activity, translocations of individual vesicles and exocytotic release from astrocytes. By deploying two optophysiological techniques the aim was to investigate alterations in i) calcium homeostasis, ii) vesicles mobility and iii) cargo exocytosis triggered by physiological regulators of astrocytic activity (L-glutamate, ATP), which act via metabotropic and ionotropic glutamate receptors, and via purinergic receptors to, at least in part, regulate the release of calcium from intracellular stores. Astrocytes were preloaded with permeable fluorescent calcium indicator Fluo-4-AM (Kd ~345 nM) and elevations in calcium activity were measured in real time as increases in Fluo-4 fluorescence. The aim was to quantify the peak indicator fluorescence, the time integrated calcium activity and duration of elevated calcium activity. The impact to mobility was examined in peptidergic vesicles preloaded by secretory peptide tagged with mutant green fluorescent protein (ANP.emd), glutamatergic vesicles tagged with green fluorescent protein (VGLUT1-EGFP) and in lysotracker-loaded acidic vesicles comprising endosomes and lysosomes. We measured changes in the vesicle speed, the total pathway vesicles travelled, and the maximal displacement. The aim was to determine the efficacy of exocytosis in whole cells as relative diminishment in the number of fluorescing vesicles (ANP.emd) indicating cargo discharge from individual vesicles. Then, we explored the causal relationship between the vesicle mobility and the probability for release-productive vesicle fusion. Additional aim was to examine the impact of lipid compounds that were reported to interfere with SNARE complex assembly and regulate vesicle exocytosis in neurons and neuroendocrine cells, but were not examined whether they act in astrocytes. For this, we collaborate with Dr. Bazbek Davletov (Cambridge, UK) and screen for lipids – in particular for biologically active lipids that activates Synaptobrevin-2 in *in vitro* liposome system.

3.Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

V sodelovanju z Dr. Bazbekom Davletovom (Cambridge, VB) smo v širšem naboru testnih spojin identificirali lipofilne spojine (sfingozin, fingolimod (FTY720)), ki pospešujejo nastajanje astrocitno specifičnih SNARE kompleksov v *in vitro* liposomskem sistemu in ugotovili časovno-koncentracijski okvir, ki omogoča neškodljivo aplikacijo spojin na astrocite v kulturi. Potrdili hipotezo po kateri lipofilni

spojini FTY720, strukturni analog sfingozina in sfingozin, ključna sestavina membranskih sfingolipidov, zmanjšata mobilnost astrocitnih mešičkov (peptidergičnih, ANP.emd, glutamatergičnih, VGLUT1-EGFP in kislih endosomov/lizosomov, Ly). Še več, FTY720 in sfingozin sta dozno-odvisno (1-20 μM) zavrla mobilnost astrocitnih mešičkov in zmanjšala učinkovitost izzvanega eksocitotskega sproščanja vsebine mešičkov – sekrecijskih peptidov in glutamata - iz astrocitov, kot smo potrdili s preštevanjem fluorescentnih ANP mešičkov pred in 1 minuto po fiziološkem draženju astrocitov z raztopino 1 mM L-glutamata in 1 mM ATP ter z meritvijo največjih amplitud fluorescence NADH po draženju netretiranih ali tretiranih (FTY720, sfingozin) celic z raztopino 1 mM ATP. V nasprotju z omenjenima lipidoma, fosforilirani FTY720 (FTY720-P) in tonzonij – nepermeabilna, pozitivno nabita lipida, ki ne prehajata preko plazmaleme nista vplivala niti na mobilnost ANP mešičkov, niti na izzvano sekrecijsko aktivnost. S tem smo potrdili hipotezo, po kateri je atenuacijski učinek biološko aktivnih lipidov povezan z njihovo lipofilno naravo; leta jima omogoča prost prehod preko plazmaleme v notranjost celice. Ovrgli smo hipotezo, po kateri je zavrtje mobilnosti mešičkov posledica povečanega sidranja mešičkov zaradi pospešene tvorbe SNARE kompleksov na plazmalemi astrocitov, saj smo z mikroskopsko tehniko popolnega notranjega odboja fluorescence (TIRF) dokazali močan atenuacijski učinek na mobilnost mešičkov v dveh, temeljno različnih predelih celice – v tankem sloju ob bazalni plazmalemi in v notranjosti celice.

V nadaljevanju smo raziskali več alternativnih hipotez za zmanjšanje mobilnosti mešičkov zaradi delovanja biološko aktivnih lipidov. Testirali smo hipoteze po katerih i) nefosforilirani biološko aktivni lipidi povzročijo spremembo znotrajcelične koncentracije prostih kalcijev ionov oz. spremenijo homeostazo kalcija ii) povečana aktivnost citosolnega kalcija je korelirana s spremembo mobilnosti mešičkov in iii) biološko aktivni lipidi vplivajo na strukturno integriteto citoskeleta. Z neraciometričnim kalcijevim indikatorjem (5 μM Fluo-4) smo izmerili povečanje koncentracije prostih kalcijevih ionov ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) v astrocitih tretiranih z izbranimi lipidi. FTY720 in sfingozin sta izzvala dolgotrajno povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v astrocitih – tako v prisotnosti, kot tudi v odsotnosti zunajceličnih Ca^{2+} ; izzvani kalcijevi odzivi so bili manjši v zunajcelični raztopini brez Ca^{2+} . Tudi fosforilirani FTY720 (FTY720P), ki deluje z vezavo na sfingozin-1-fosfatne receptorje v plazmalemi astrocitov je izzval kalcijeve odzive, čeprav je bila njihova kinetika drugačna od kinetike kalcijevih odzivov izzvanih z FTY720 ali sfingozinom. Naši rezultati so razkrili razlike v mehanizmih delovanja fosforiliranih in nefosforiliranih biološko aktivnih lipidov. Druga dva nefosforilirana lipida, dihidroceramid (inaktivna oblika C2 ceramida) in tonzonij nista izzvala povečanja $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v astrocitih. S temi meritvami smo potrdili hipotezo, po kateri nefosforilirani, permeabilni, biološko aktivni lipidi povečajo aktivnost citosolnih kalcijevih ionov v astrocitih. V nadaljevanju smo raziskali časovno sovpadanje oz. korelacijo med z lipidi (FTY720, sfingozin, dihidroceramid in tonzonij) izzvanim povečanjem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in atenuacijo mobilnosti astrocitnih mešičkov. Rezultati kažejo, da lahko lipide razvrstimo v dve večji skupini; v učinkovite, ki izzovejo povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in zavrejo mobilnost mešičkov ter v neučinkovite, ki ne izzovejo nobenega od omenjenih učinkov. Povezavo med obema fiziološkima parametroma smo kvantitativno opisali z linearno funkcijo: $TL = TL_0 + ax$; TL pomeni zmanjšanje prepotovane poti mešičkov, a pomeni naklon funkcije, x pomeni izbrani parameter povečane $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (največjo relativno amplitudo ali časovni integral kalcijevega odziva). Navidezni Pearsonov koeficient korelacije (R) je bil 0.987 ($p=0.013$) in 0.963 ($p=0.037$). Visoko in pozitivno korelacijo med povečanjem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in zmanjšanjem mobilnosti mešičkov smo neodvisno potrdili tudi v celicah, ki so bile podvržene izzvanemu in prehodnemu povečanju $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zaradi draženja glutamatnih in purinskih receptorjev v plazmalemi. Zvezo med relativnim povečanjem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in zmanjšano mobilnostjo mešičkov (TL) smo najbolje opisali s funkcijo, ki opredeljuje vezavo liganda v receptor: $f = B_{\text{max}} \times \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x))$, kjer x ustreza največji relativni amplitudi z lipidi izzvanega kalcijevega odziva. Funkcija je razkrila navidezno K_d 1.57 $\Delta F/F_0$ in B_{max} 0.49 v procesu od kalcija odvisnega zmanjšanja mobilnosti mešičkov. Pearsonov koeficient korelacije (R) 0.996 je razkril ekstremno pozitivno korelacijo

med povečanjem $[Ca^{2+}]_i$ in zaviranjem mobilnosti mešičkov, ki implicira, da bo vsako, izrazitejše povečanje $[Ca^{2+}]_i$ v astrocitov zavrlo mobilnost peptidergičnih mešičkov. S tem smo potrdili hipotezo, po kateri je povečana aktivnost citosolnega kalcija korelirana z zmanjšanjem mobilnosti astrocitnih mešičkov.

V nadaljevanju smo mikrofluorimetrično raziskali še vpliv biološko aktivnih sfingolipidov na integriteto fluorescentno označenega citoskeleta – mikrotubulov in aktinskih filamentov, vzdolž katerih se premikajo fluorescentno označeni sekretijski mešički. V transduciranih astrocitih, ki so izražali fluorescentno označene mikrotubule in aktinske filamente (tubulin in aktin označena z rdečo fluorescentno beljakovino) smo vizualizirali promet peptidergičnih mešičkov. Tretiranje celic s permeabilnim, biološko aktivnim lipidom FTY720 je izzvalo strukturno modifikacijo mikrotubulov z nakazano depolimerizacijo, medtem, ko je bila struktura aktinskih filamentov večinoma neprižadeta. Te meritve so razkrile obstoj dodatnega mehanizma za zmanjšanje mobilnosti mešičkov zaradi tretiranja astrocitov z FTY720. S tem smo potrdili hipotezo po kateri je zmanjšanje mobilnosti mešičkov lahko posledica delne depolimerizacije citoskeleta.

Naši rezultati kažejo, da FTY720 in sfingozin izzoveta povečanje $[Ca^{2+}]_i$ zaradi delovanja na skupni molekularni mehanizem(-e). Z namenom, da bi testirali hipotezo, po kateri je endoplazemski retikulum ključni znotrajcelični izvor Ca^{2+} , ki se mobilizirajo v citosol astrocitov po tretiranju celic z omenjenima lipidoma, smo opravili meritve povečanja $[Ca^{2+}]_i$ v zunajcelični raztopini brez Ca^{2+} . Tudi v teh razmerah sta oba lipida izzvala kalcijeve odzive s podobno največjo amplitudo in rekrutirala podobno količino prostih Ca^{2+} v citosol astrocitov. Ti rezultati kažejo, da FTY720 in sfingozin podobno vplivata na homeostazo kalcija in mobilizirata Ca^{2+} iz istih znotrajceličnih organelov. Izvor znotrajceličnih Ca^{2+} smo raziskali s pomočjo farmakoloških blokatorjev znotrajceličnih Ca^{2+} kanalčkov in inhibitorjev fosfolipaze C. V celicah ($n=237$) tretiranih z $100 \mu M$ rianodinom (Ry, blokator rianodinskih kanalčkov) in $100 \mu M$ 2-APB (permeabilen antagonist IP_3 receptorjev, ki blokira tudi TRP kanalčke), smo popolnoma blokirali kalcijeve odzive izzvane s FTY720, enako kot tudi v celicah ($n=300$) tretiranih z $100 \mu M$ 2-APB. V celicah ($n=325$) tretiranih s $100 \mu M$ Ry se kalcijevi odzivi niso razlikovali od odzivov v netretiranih celicah. Rezultati kažejo, da FTY720 (in sfingozin) mobilizirata znotrajcelične Ca^{2+} skozi IP_3 in ne Ry receptorje v membrani endoplazemskega retikuluma. Z namenom, da bi identificirali znotrajcelično signalno pot, ki se aktivirana v kalcijevih odzivih izzvanih z FTY720, smo celice tretirali z inhibitorjem fosfolipaze C (PLC), $5 \mu M$ U73122. U73122 je močno, toda ne popolnoma, inhibiral kalcijeve odzive izzvane z FTY720 ($n=316$), kar kaže, da FTY720 aktivira PLC, ki katalizira nastanek IP_3 iz fosfatidil 4,5-bifosfata (PIP_2). Poleg tega so naše meritve razkrile še dodatno pot za vnos kalcija v citosol astrocitov, ki poteka vzdolž strmega elektrokemijskega gradienta in omogoča prehajanje zunajceličnih Ca^{2+} v znotrajcelični prostor. V zunajcelični raztopini z ali brez Ca^{2+} je U73122 močno, čeprav ne popolnoma, inhibiral kalcijeve odzive, kar nakazuje na delno in nepopolno inhibicijo PLC, ki lahko omogoči manjše sproščanje Ca^{2+} iz znotrajceličnih zalog; slednje je dopolnjeno s sočasnim vdorom Ca^{2+} skozi kanalčke, ki so povezani s t.i. vstopom kalcija, ki je uravnavan z zalogami (SOCE). S temi meritvami smo potrdili hipotezo, po kateri biološko aktivni sfingolipidi mobilizirajo Ca^{2+} iz endoplazemskega retikuluma astrocitov. Še več pokazali smo tudi, da je aktivacija fosfolipaze C in inozitol 1,4,5-trifosfatnih (IP_3) receptorjev potrebna in zadostna za povečanje $[Ca^{2+}]_i$ v astrocitih, ki so podvrženi delovanju biološko aktivnih lipidov. Del raziskav smo opravili v sodelovanju z Inštitutom Jožef Stefan in Zavodom Biomedicinski Raziskovalni Inštitut.

4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Fingolimod (FTY720), novo terapevtsko sredstvo za zdravljenje multiple skleroze in sfingozin, naravna sestavina membranskih sfingolipidov, izzoveta dolgotrajno povečanje $[Ca^{2+}]_i$ v astrocitih – tako v prisotnosti kot tudi v odsotnosti zunajceličnih Ca^{2+} ; izzvani kalcijevi odzivi so

manjši v odsotnosti zunajceličnih Ca^{2+} . Tudi fosforilirani FTY720 (FTY720P), ki deluje po vezavi na sfingozin-1-fosfatne receptorje v plazmalemii astrocitov izzove kalcijeve odzive; njihova kinetika je drugačna od kinetike odzivov izzvanih z FTY720 in sfingozinom. Mehanizmi delovanja fosforiliranih in nefosforiliranih sfingolipidov so temeljno različni. Potrdili smo hipotezo, po kateri nefosforilirani, biološko aktivni lipidi neposredno vplivajo na homeostazo kalcija v možganskih celicah. Z lipidi izzvano povečanje $[Ca^{2+}]_i$ je sovpadalo z zmanjšano mobilnostjo peptidrgičnih mešičkov v astrociti. Visoko in pozitivno korelacijo med povečanjem $[Ca^{2+}]_i$ in zmanjšanjem mobilnosti mešičkov smo neodvisno potrdili v celicah, ki so bile podvržene izzvanemu in prehodnemu povečanju $[Ca^{2+}]_i$ zaradi draženja glutamatnih in purinskih receptorjev v plazmalemii. S tem smo potrdili hipotezo po kateri je povečanje aktivnosti znotrajceličnega kalcija korelirano z zmanjšanjem mobilnosti astrocitnih mešičkov. Dodatno smo raziskali vpliv biološko aktivnih sfingolipidov na integriteto fluorescentno označenih filamentov citoskeleta – mikrotubulov in aktinskih filamentov, vzdolž katerih se premikajo mešički. Tretiranje astrocitov z FTY720 je izzvalo delno depolimerizacijo mikrotubulov, medtem, ko je bila večinoma neprizadeta struktura aktinskih filamentov. S tem smo priskrbeli kvalitativni dokaz v podporo dodatnemu mehanizmu, ki zavira mobilnost mešičkov v astrociti in potrdili hipotezo po kateri je zmanjšanje mobilnosti mešičkov lahko posledica delne depolimerizacije citoskeleta. Aktivacija fosfolipaze C in inozitol 1,4,5-trifosfatnih (IP_3) receptorjev je bila potrebna in zadostna za povečanje $[Ca^{2+}]_i$ v astrociti tretiranih z biološko aktivnimi lipidi, kot smo potrdili z uporabo farmakoloških blokatorjev rianodinskih in IP_3 kanalčkov (rianodin, 2-aminoetoksifenilboran) ter inhibitorjem fosfolipaze C (U73122). S tem smo potrdili hipotezo, po kateri biološko aktivni lipidi mobilizirajo Ca^{2+} iz endoplazemskega retikuluma astrocitov in dodatno ugotovili, da vnos zunajceličnih Ca^{2+} do nekajkrat poveča velikost kalcijevih odzivov izzvanih z biološko aktivnimi lipidi. Zaključujemo, da eksogeni, sfingozinu podobni lipidi izzovejo kompleksne, od Ca^{2+} -odvisne učinke, ki vplivajo na strukturo citoskeleta, mobilnost astrocitnih mešičkov in sekrecijo prenašalcev glike ter posledično tudi na izvajanje njihove homeostatske funkcije oz. podporo živčnim celicam *in vivo*. Ocenjujemo, da smo v celoti realizirali vse zastavljene raziskovalne cilje v projektu.

5.Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

Ni bilo sprememb programa raziskovalnega projekta. Zaradi sprememb v zaposlitvah treh članov projektne skupine smo namesto dr. Mateje Prebil, dr. Slavice Terzijeve in dr. Jelene Velebit Marković v programsko skupino uvedli dr. Boštjana Rituperja in dr. Heleno H. Chowdhury.

6.Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	31434713	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Bioaktivni sfingolipidi povzročijo spremembe kalcijeve homeostaze v kulturi podganjih astrocitov
		ANG	Alterations of calcium homeostasis in cultured rat astrocytes evoked by bioactive sphingolipids
	Opis	SLO	Namen raziskave: Spremembe v presnovi sfingolipidov so lahko vpletene v več nevroloških motenj, vendar je njihov učinek na astrociti neznan. Raziskali smo vpliv bioaktivnih sfingolipidov na znotrajcelično koncentracijo kalcija ($[Ca^{2+}]_i$), mobilnost sekrejskih mešičkov, signalne poti, vključene v spremembe homeostaze kalcija. Metode: konfokalni mikroskop za zajemanje časovnih posnetkov za raziskovanje $[Ca^{2+}]_i$, za mobilnost fluorescenčno označenih peptidnih mešičkov in strukturo celovitost mikrotubulov in aktinskih filamentov pred in po dodajanju eksogenih sfingolipidov. Rezultati: fngolimod (FTY720), je registrirano zdravilo za multiplo sklerozo, in vpliva na spremembe $[Ca^{2+}]_i$. Aktivacija receptorjev, povezanih s fosfolipazo C in inozitol 1,4,5-trifosfatom povzroči povišanja $[Ca^{2+}]_i$, kar smo pokazali s farmakološkimi orodji. Te spremembe $[Ca^{2+}]_i$ so sovpadale z zmanjšanjem mobilnosti mešičkov. Zaključek: eksogeno dodani sfingozin in membransko prepustni analogi povzročijo kompleksen od kalcija odvisen celični odziv, kar verjetno vpliva na homeostazo celic <i>in vivo</i> .

		<p>Aim: In the brain, alterations in sphingolipid metabolism contribute to several neurological disorders; however, their effect on astrocytes is largely unknown. Here, we identified bioactive sphingolipids that affect intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), mobility of peptidergic secretory vesicles, signalling pathways involved in alterations of calcium homeostasis and explored the relationship between the stimulus-evoked increase in $[Ca^{2+}]_i$ and attenuation of vesicle mobility. Methods: Confocal time-lapse images were acquired to explore $[Ca^{2+}]_i$ signals, the mobility of fluorescently tagged peptidergic vesicles and the structural integrity of the microtubules and actin filaments before and after the addition of exogenous sphingolipids to astrocytes. Results: Fingolimod (FTY720), a recently introduced therapeutic for multiple sclerosis, and sphingosine, a releasable constituent of membrane sphingolipids, evoked long-lasting increases in $[Ca^{2+}]_i$ in the presence and absence of extracellular Ca^{2+}; the evoked responses were diminished in the absence of extracellular Ca^{2+}. Activation of phospholipase C and inositol-1,4,5-triphosphate receptors was necessary and sufficient to evoke increases in $[Ca^{2+}]_i$ as revealed by the pharmacologic inhibitors; Ca^{2+} flux from the extracellular space intensified these responses several fold. The lipid-evoked increases in $[Ca^{2+}]_i$ coincided with the attenuated vesicle mobility. High and positive correlation between increase in $[Ca^{2+}]_i$ and decrease in peptidergic vesicle mobility was confirmed independently in astrocytes exposed to evoked, transient Ca^{2+} signalling triggered by purinergic and glutamatergic stimulation. Conclusion: Exogenously added cell-permeable sphingosine-like lipids exert complex, Ca^{2+}-dependent effects on astrocytes and likely alter their homeostatic function in vivo.</p>
	Objavljeno v	Blackwell Publishing; Acta physiologica; 2014; Vol. 212, iss. 1; str. 49-61; Impact Factor: 4.251; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.903; A': 1; WoS: UM; Avtorji / Authors: Stenovec Matjaž, Trkov Saša, Kreft Marko, Zorec Robert
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	30605017 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p><i>SLO</i> Uravnavanje površinskega izražanja AQP4 astrocitov z mobilnostjo mešičkov</p> <p><i>ANG</i> Regulation of AQP4 surface expression via vesicle mobility in astrocytes</p>
	Opis	<p><i>SLO</i> Akvaporin 4 (AQP4) je najpogostejši vodni kanalček v možganih; izražajo ga predvsem astrociti, ki so vključeni v transport vode v fizioloških in v patoloških razmerah. Poleg izooblik M1 (a) in M23 (c), so na plazmalemi tudi druge izooblike - AQP4b, d, e, in f. Uravnavanje prepustnosti vode z AQP4 vključuje različne procese, kot so sprememba konformacije kanalčkov, spremembe števila in ureditve kanalčkov v plazmalemi ter dinamiko dostave kanalčkov na/od plazmaleme. Ugotavljali smo vpliv prometa mešičkov na gostoto AQP4 kanalčkov na plazmalemi in raziskali subcelično lokalizacijo AQP4 v povezavi z mobilnostjo AQP4e mešičkov. Rekombinantni AQP4e v kulturi astrocitov se je lokaliziral na plazmalemi podobno kot endogeni AQP4, ki je bil označen s protitelesi. V razmerah, v katerih smo poustvarili reaktivacijo astrocitov (s povečanjem koncentracije citosolnega cAMP) in možganski edem, smo ugotovili povečano lokalizacijo AQP4 na plazmalemi. Z izjemo reorganizacije aktinskih filamentov v modelu reaktiviranih astrocitov in depolimerizacije vimentinskega omrežja v hipoozmotskih razmerah, je ostala struktura citoskeleta neprizadeta. Spremembe mobilnosti AQP4e mešičkov so sovpadale z lokalizacijo AQP4 na plazmalemi v vseh poustvarjenih patoloških razmerah. Hipoozmotsko draženje celic je sprožilo prehodno zmanjšanje mobilnosti AQP4e mešičkov, ki se je odražala v prehodni spremembi lokalizacije AQP4 na plazmalemi. V patoloških razmerah je uravnavanje izražanja AQP4 na površini celice</p>

		sklopljeno s spremenjeno mobilnostjo mešičkov, ki prenašajo AQP4.
	ANG	Aquaporin 4 (AQP4) is the predominant water channel in the brain, expressed mainly in astrocytes and involved in water transport in physiologic and pathologic conditions. Besides the classical isoforms M1 (a) and M23 (c), additional ones may be present at the plasma membrane, such as the recently described AQP4b, d, e, and f. Water permeability regulation by AQP4 isoforms may involve several processes, such as channel conformational changes, the extent and arrangement of channels at the plasma membrane, and the dynamics of channel trafficking to/from the plasma membrane. To test whether vesicular trafficking affects the abundance of AQP4 channel at the plasma membrane, we studied the subcellular localization of AQP4 in correlation with vesicle mobility of AQP4e, one of the newly discovered AQP4 isoforms. In cultured rat astrocytes, recombinant AQP4e acquired plasma membrane localization, which resembled that of the antibody labeled endogenous AQP4 localization. Under conditions mimicking reactivation of astrocytes (increase in cytosolic cAMP) and brain edema, an increase in the AQP4 plasma membrane localization was observed. The cytoskeleton remained unaffected with the exception of rearranged actin filaments in the model of reactive astrocytes and vimentin meshwork depolymerization in hypoosmotic conditions. AQP4e vesicle mobility correlated with changes in the plasma membrane localization of AQP4 in all stimulated conditions. Hypoosmotic stimulation triggered a transient reduction in AQP4e vesicle mobility mirrored by the transient changes in AQP4 plasma membrane localization. We suggest that regulation of AQP4 surface expression in pathologic conditions is associated with the mobility of AQP4-carrying vesicles.
	Objavljeno v	A.R. Liss; <i>Glia</i> ; 2013; Vol. 61, iss. 6; str. 917-928; Impact Factor: 5.466; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.675; A': 1; WoS: RU; Avtorji / Authors: Potokar Maja, Stenovec Matjaž, Jorgačevski Jernej, Holen Torgeir, Kreft Marko, Ottersen Ole Petter, Zorec Robert
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	30039513 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Fingolimod-sfingozinu podobna molekula zavira mobilnost in izločanje vsebine astrocitnih mešičkov ANG Fingolimod-A sphingosine-like molecule inhibits vesicle mobility and secretion in astrocytes
	Opis	SLO Astroцитi z uravnavano eksocitozo izločajo prenašalce glije in signalizirajo sosednjim celicam. Raziskali smo vpliv sfingozina in strukturnega analoga fingolimoda/FTY720, domnevnih lipidnih modulatorjev uravnavane eksocitoze, na: (i) mobilnost mešičkov in (ii) izločanje vsebine astrocitnih mešičkov. Peptidrgične in glutamatergične mešičke ter endo-/lizosome smo fluorescentno označili in opazovali njihovo mobilnost v notranjosti celice in v sloju citoplazme ob bazalni plazmalemi; uporabili smo konfokalni mikroskop in mikroskopsko tehniko popolnega notranjega odboja fluorescence. Sfingozin in FTY720 sta dozno-odvisno zmanjšala mobilnost mešičkov v preizkovanih subceličnih predelih in zavrla izzvano sproščanje sekrecijskih peptidov in glutamata. Zaključujemo, da permeabilni, sfingozinu podobni lipidi zmanjšajo uravnavano eksocitozo tako, da atenuirajo mobilnost mešičkov in preprečijo njihov dostop/interakcijo z mesti sidranja/zlitja na plazmalemi. In the brain, astrocytes signal to the neighboring cells by the release of chemical messengers (gliotransmitters) via regulated exocytosis. Recent studies uncovered a potential role of signaling lipids in modulation of exocytosis. Hence, we investigated whether sphingosine and the structural

		<p>analog fingolimod/FTY720, a recently introduced therapeutic for multiple sclerosis, affect (i) intracellular vesicle mobility and (ii) vesicle cargo discharge from cultured rat astrocytes. Distinct types of vesicles, peptidergic, glutamatergic, and endosomes/lysosomes, were fluorescently prelabeled by cell transfection with plasmids encoding atrial natriuretic peptide tagged with mutant green fluorescent protein and vesicular glutamate transporter tagged with enhanced green fluorescent protein or by LysoTracker staining, respectively. The confocal and total internal reflection fluorescence microscopies were used to monitor vesicle mobility in the cytoplasm and near the basal plasma membrane, respectively. Sphingosine and FTY720, but not the membrane impermeable lipid analogs, dose-dependently attenuated vesicle mobility in the subcellular regions studied, and significantly inhibited stimulated exocytotic peptide and glutamate release. We conclude that in astrocytes, cell permeable sphingosine-like lipids affect regulated exocytosis by attenuating vesicle mobility, thereby preventing effective vesicle access/interaction with the plasma membrane docking/release sites.</p>	
	ANG		
	Objavljeno v	A.R. Liss; <i>Glia</i> ; 2012; Vol. 60, no. 9; str. 1406-1416; Impact Factor: 5.066; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.574; A': 1; WoS: RU; Avtorji / Authors: Trkov Saša, Stenovec Matjaž, Kreft Marko, Potokar Maja, Parpura Vladimir, Davletov Bazbek, Zorec Robert	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	29371609	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Z aluminijem izzvane spremembe lastnosti fuzijske pore zavirajo izločanje prolaktina iz laktotrofov podgane	
		ANG Aluminium-induced changes of fusion pore properties attenuate prolactin secretion in rat pituitary lactotrophs	
	Opis	SLO Izločanje hormonov poteka z uravnavano eksocitozo pri kateri sta ključnega pomena zlitje membrane mešička s plazmalemo in nastanek ozke fuzijske pore skozi katero se izločijo molekule v zunajcelični prostor. Z encimskim imunskim testom in z elektrofiziološkimi meritvami interakcij posameznih mešičkov s plazmalemo smo raziskali vpliv subletalnih koncentracij aluminija na izločanje prolaktina iz laktotrofov podgane. Po tretiranju celic z aluminijem smo ugotovili zmanjšanje spontanega in izzvanega izločanja prolaktina zaradi zmanjšanja prevodnosti fuzijske pore, slednja odraža premer pore. Zaključujemo, da aluminij zavira izločanje prolaktina tako, da zmanjša frekvenco elementarnih dogodkov eksocitoze in tako, da stabilizira fuzijske pore z ozkim premerom, ki onemogočajo izločanje relativno velikih molekul prolaktina.	
		ANG Hormone secretion is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis. The key step of this process consists of the merger of the vesicle and the plasma membranes, leading to the formation of a fusion pore. This is an aqueous channel through which molecules stored in the vesicle lumen exit into the extracellular space on stimulation. Here we studied the effect of sub-lethal dose of aluminium on prolactin secretion in isolated rat pituitary lactotrophs with an enzyme immunoassay and by monitoring electrophysiologically the interaction of a single vesicle with the plasma membrane in real time, by monitoring membrane capacitance. After 24-h exposure to sub-lethal AlCl ₃ (30 microM), the secretion of prolactin was reduced by 14+/-8% and 46+/-11% under spontaneous and K(+)-stimulated conditions, respectively. The frequency of unitary exocytotic events, recorded by the high-resolution patch-clamp monitoring of membrane capacitance, a parameter linearly related to the membrane area, under spontaneous and stimulated conditions, was decreased in aluminium-treated cells. Moreover, while the fusion pore dwell-time was increased in the presence of aluminium, the fusion pore conductance, a measure of fusion pore	

		diameter, was reduced, both under spontaneous and stimulated conditions. These results suggest that sub-lethal aluminium concentrations reduce prolactin secretion downstream of the stimulus secretion coupling by decreasing the frequency of unitary exocytotic events and by stabilizing the fusion pore diameter to a value smaller than prolactin molecule, thus preventing its discharge into the extracellular space.
	Objavljeno v	Pergamon Press.; Neuroscience; 2012; Vol. 201; str. 57-66; Impact Factor: 3.122; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.574; WoS: RU; Avtorji / Authors: Costa Calejo Ana-Isabel, Jorgačevski Jernej, Silva V.S., Stenovec Matjaž, Kreft Marko, Gonçalves Paula P., Zorec Robert
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	36617477 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Difuzija D-glukoze v citosolu posameznega astrocita
		<i>ANG</i> Diffusion of D-glucose measured in the cytosol of a single astrocyte
	Opis	<p><i>SLO</i> Astrociti interagirajo z živčnimi in endotelijskimi celicami ter lahko omogočajo izmenjavo metabolitov med kapilarami in živčnimi končiči. Raziskali smo znotrajcelično difuzijo glukoze v astrocitih po lokaliziranem privzetju glukoze. Uporabili smo nanosenzor za resonančen prenos energije fluorescence (FRET) s katerim smo opazovali časovno odvisnost znotrajcelične koncentracije glukoze v različnih legah v celici. V predelih, ki so bili oddaljeni od mesta privzetja glukoze smo izmerili časovno zakasnitev in zakasnitev v kinetiki, v primerjavi z mestom astrocita, ki smo ga lokalno oskrbeli z obogateno raztopino D-glukoze. Po postopnem privzetju glukoze v celico, se je lokalno povečana koncentracija glukoze hitro razširila skozi citosol z navideznim koeficientom difuzije ($D_{app} = (2.38 \pm 0.41) \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (22–24°C)). Upoštevajoč difuzijski koeficient D-glukoze v vodi ($D = 6.7 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (24 °C)), D_{app} v astrocitih tako predvsem odraža zavojevitost citosola, ki difuzijsko ovira molekule glukoze, in je približno 3-krat večji kot v vodni raztopini. Zaključujemo, da je izmerjeni D_{app} za glukozo v astrocitih podgane skladen s pogledom po katerem citosolna difuzija lahko omogoča glukozo in njenim metabolitom, da prestopajo od endotelijskih celic v krvno-možganski barieri do živčnih celic in sosednjih astrocitov.</p> <p><i>ANG</i> Astrocytes interact with neurons and endothelial cells and may mediate exchange of metabolites between capillaries and nerve terminals. In the present study, we investigated intracellular glucose diffusion in purified astrocytes after local glucose uptake. We used a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based nano sensor to monitor the time dependence of the intracellular glucose concentration at specific positions within the cell. We observed a delay in onset and kinetics in regions away from the glucose uptake compared with the region where we locally super-fused astrocytes with the D-glucose-rich solution. We propose a mathematical model of glucose diffusion in astrocytes. The analysis showed that after gradual uptake of glucose, the locally increased intracellular glucose concentration is rapidly spread throughout the cytosol with an apparent diffusion coefficient (D_{app}) of $(2.38 \pm 0.41) \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (at 22–24°C). Considering that the diffusion coefficient of d-glucose in water is $D = 6.7 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (at 24 °C), D_{app} determined in astrocytes indicates that the cytosolic tortuosity, which hinders glucose molecules, is approximately three times higher than in aqueous solution. We conclude that the value of D_{app} for glucose measured in purified rat astrocytes is consistent with the view that cytosolic diffusion may allow glucose and glucose metabolites to traverse from the endothelial cells at the blood-brain barrier to neurons and neighboring astrocytes.</p>
		Birkhäuser; Cellular and molecular life sciences; 2013; Vol. 70, no. 8; str. 1483-1492; Impact Factor: 5.856; Srednja vrednost revije / Medium

Objavljeno v	Category Impact Factor: 3.814; A': 1; WoS: CQ, DR; Avtorji / Authors: Kreft Marko, Lukšič Miha, Zorec Tomaž M., Prebil Mateja, Zorec Robert
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	Presejalne metode na temelju mobilnosti mešičkov
	<i>SLO</i>	Presejalne metode na temelju mobilnosti mešičkov
	<i>ANG</i>	Screening methods based on vesicle mobility
	Opis	Izum se nanaša na metodo za presejanje učinkovin primernih za zdravljenje bolezni, kot so neurodegenerativne bolezni in vnetne bolezni živčevja. Navedena metoda vključuje izbor testne celice, barvanje vsaj enega organela v testni celici, stik testne celice s preizkivano učinkovino in snemanje poti premikanja navedenega obarvanega organela v testni celici. Primerne učinkovine lahko identificiramo po primerjavi prepotovane poti organela glede na primerno referenčno snov.
	<i>SLO</i>	Izum se nanaša na metodo za presejanje učinkovin primernih za zdravljenje bolezni, kot so neurodegenerativne bolezni in vnetne bolezni živčevja. Navedena metoda vključuje izbor testne celice, barvanje vsaj enega organela v testni celici, stik testne celice s preizkivano učinkovino in snemanje poti premikanja navedenega obarvanega organela v testni celici. Primerne učinkovine lahko identificiramo po primerjavi prepotovane poti organela glede na primerno referenčno snov.
	<i>ANG</i>	The invention relates to a method of screening for a compound useful in the treatment of a disease selected from neurodegenerative diseases and neuro-inflammatory diseases, said method comprising providing a test cell; staining at least one organelle of said test cell; contacting said test cell with a test compound; and recording the path of said stained organelle in said test cell. Suitable compounds are identified from a comparison of the recorded path with a suitable reference.
	Šifra	F.21 Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov
	Objavljeno v	na spletni strani Svetovne organizacije za intelektualno lastnino (World Intellectual Property Organization - WIPO) http://patentscope.wipo.int
	Tipologija	2.24 Patent

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

Razvoj novega programskega orodja »Kalcij« v okolju MATLAB s katerim v izvoženih časovnih sekvencah mikrografij (tiff datoteke) celic, ki so označene s fluorescentnimi kalcijevimi indikatorji (Fura-2, Fluo-4, ipd.) kvantitativno izmerimo relevantne parametre povečane aktivnosti citosolnih kalcijev ionov – največjo amplitudo spremembe fluorescence (relativno glede na bazalno raven fluorescence ($\Delta F/F_0$), absolutni čas največje amplitude fluorescence (t), časovni integral oz. površino pod krivuljo spremembe fluorescence ($\Delta F/F_0 * t$) in trajanje povečane intenzitete fluorescence kalcijevega indikatorja (t) zaradi posrednega ali neposrednega delovanja nepermeabilnih ali permeabilnih farmakoloških učinkovin na tarčne strukture (receptorje) v plazmalemi celic in/ali membranske strukture v membrani znotrajceličnih organelov, ki skladiščijo kalcijeve ione. Nadgradnja programskega orodja »track2« v okolju MATLAB s katerim sledimo premikom posameznih fluorescentnih mešičkov v celici s segmentom, ki omogoča vzorčenje povprečne intenzitete fluorescence (v arbitrarnih enotah (A.U.)) v prilagodljivem kvadratnem območju na lokaliteti (x,y) posameznega mešička v izbrani časovni točki. S pomočjo novega orodja lahko izmerimo intenziteto fluorescence premikajočega mešička in ocenimo njegovo velikost (kot število nadpražnih pikselov na lokaliteti mešička) ter tako ugotovljamo korelacijo med velikostjo in mobilnostjo izbranih mešičkov med potovanjem po celici.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Sfingozin, naravni znotrajcelični metabolit, in njegov mimetik fingolimod (FTY720) zavirata mobilnost astrocitnih mešičkov in sekrecijo prenašalcev glije s povečanjem $[Ca^{2+}]_i$. Astroцити, najštevilčnejši tip celic glije v možganih sesalcev zagotavljajo metabolno podporo nevronom, soupravljajo sinaptično aktivnost in mikropretok krvi v možganovini. Poškodbe nevronov zaradi okužb, mehanske travme, avtoimunskih odzivov in nevrodegenerativnih bolezni praviloma aktivirajo astroците, ki vstopijo v proces astroglioze. Proliferirajoči astroцити lahko omejujejo širjenje vnetnih celic, popravijo poškodovano krvno-možgansko bariero, zamejijo poškodbe tkiva in njihovo velikost ter zmanjšajo izgube nevronov in obseg demielinizacije. Motnje v astrocitnih funkcijah praviloma vodijo v disfunkcijo nevronov in nastanek različnih bolezenskih stanj vključno z multiplo sklerozo. Ključni proces kemične signalizacije med astroцити in sosednjimi možganskimi celicami je uravnavana eksocitoza, med katero se zlijeta membrana sekrečijskega mešička in plazmalema; vsebina vskladiščena v lumnu mešička se difuzijsko izloči v zunajcelični prostor. Astroцити izločajo različne kemične prenašalce kot so L-glutamat, D-serin, ATP, sekrečijski peptidi, tumorski nekrotični dejavnik α , interlevkini in prostaglandini, ki lahko igrajo ključno vlogo tudi v napredovanju bolezenskih stanj živčnega sistema. Pokazali smo, da sfingozin in FTY720 (v nefosforilirani obliki), zavreta uravnavano eksocitozo prenašalcev glije tako, da zavreta mobilnost astrocitnih mešičkov (peptidergičnih, glutamatergičnih in endosomov/lizosomov) in preprečujeta njihovo učinkovito interakcijo z mesti sidranja/zlivanja na plazmalemii. V raziskavi smo nadalje raziskali znotrajcelične signalne poti, ki so udeležene v zaviranju sekrecije prenašalcev glije. Razkrili smo vzročno povezavo med spremenjeno homeostazo citosolnega kalcija in mobilnostjo astrocitnih mešičkov zaradi delovanja nefosforiliranih, biološko aktivnih sfingolipidov. Z lipidi izzvano povečanje $[Ca^{2+}]_i$ je sovpadalo z zmanjšano mobilnostjo peptidergičnih mešičkov, kar smo neodvisno potrdili v astroцитih, v katerih smo izzvali prehodno povečanje $[Ca^{2+}]_i$ z draženjem glutamatnih in purinskih receptorjev v plazmalemii. FTY720 in sfingozin sta izzvala dolgotrajno povečanje $[Ca^{2+}]_i$ v prisotnosti in odsotnosti zunajceličnih Ca^{2+} . Z uporabo farmakoloških blokatorjev smo razkrili, da sta aktivacija fosfolipaze C in IP3 receptorjev potrebna in zadostna za povečanje $[Ca^{2+}]_i$, ki jo izzovejo lipidi. Eksogeni, sfingozinu podobni lipidi tako izzovejo kompleksne, od Ca^{2+} -odvisne učinke, ki vplivajo na strukturo citoskeleta in zmanjšajo mobilnost mešičkov, ki je sklopljena z mikrotubulskim citoskeletom. Selektivno zaviranje eksocitoze v astroцитih lahko vodi v zmanjšanje z astroцити posredovanih toksičnih učinkov na nevrone in posledično upočasnitev poteka bolezni. Eno od ključnih vprašanj, ki ostaja neodgovorjeno, je ali lahko FTY720 izzove podobne učinke tudi v bolnikih, ki dolgotrajno uživajo FTY720. Pričakovana terapevtska doza FTY720 v krvni plazmi je v rangu nanomolov, čeprav postaja jasno, da lahko FTY720 v možganovini doseže mikromolarno koncentracijo, še posebej na žilno-astroцитni meji, zaradi lipofilne narave zdravilne učinkovine. Lokalna koncentracija FTY720 je tako lahko zelo povečana in doseže koncentracijo, ki izzove zmanjšanje mobilnosti astrocitnih mešičkov in zavre njihovo sekrečijsko aktivnost. Izboljšanje simptomatike multiple skleroze po dolgotrajnem uživanju FTY720 je tako lahko delno posledica spremenjene fiziologije astroцитov.

ANG

Sphingosine, a natural sphingolipid metabolite, and fingolimod (FTY720), a sphingosine-mimetic drug, attenuate mobility of astrocyte vesicles and inhibit astroglial secretion by increasing intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$). Astrocytes, the most abundant glial cells in the mammalian brain, provide metabolic support to neurons, actively tune synaptic activity of neurons and co-regulate brain microcirculation. Insults to neurons in the central nervous system (CNS) caused by infections, trauma, autoimmune responses and neurodegenerative diseases activate astrocytes, which initiate the process of astrogliosis. Proliferating reactive astrocytes reduce the spread of inflammatory cells, repair the blood-brain barrier, decrease tissue damage and lesion size, and decrease neuronal loss and demyelination. Disturbances of astrocyte homeostatic function thus have the potential to underlie neuronal dysfunction and various disease states including multiple sclerosis. A key process mediating chemical communication between astrocytes and neighboring cells is regulated exocytosis that consists of multistage merger between the membrane of the secretory vesicle and the plasma membrane; cargo stored inside vesicle lumen is subsequently released into extracellular space by diffusion. Astrocytes release various chemicals like L-glutamate, D-serine, ATP, secretory peptides, tumor necrosis factor α , interleukins and prostaglandins, which may play a crucial role in the progression of inflammatory diseases of the CNS. Here we have shown that sphingosine and FTY720 (the non-phosphorylated forms), inhibit regulated exocytosis of gliotransmitters by

attenuating mobility of astrocyte vesicles (peptidergic, glutamatergic and endosomes/lysosomes) and prevent effective vesicle access/interaction with the plasma membrane docking/release sites. We have further addressed the specific intracellular signaling pathways that lead to inhibited astroglial secretion, and revealed positive relationship between the altered calcium homeostasis and attenuated mobility of astrocyte vesicles upon exposure to non-phosphorylated bioactive sphingolipids. Sphingolipids-evoked increases in $[Ca^{2+}]_i$ coincided with diminished mobility of peptidergic vesicles, which was independently confirmed in astrocytes exposed to transient Ca^{2+} signaling triggered by stimulation of plasmalemmal purine and glutamate receptors. FTY720 and sphingosine evoked long-lasting increases in $[Ca^{2+}]_i$ in the presence and absence of extracellular Ca^{2+} . By using pharmacological blockers, we have found that the activation of phospholipase C and inositol-1,4,5-triphosphate receptors was necessary and sufficient to evoke the lipid-mediated increases in $[Ca^{2+}]_i$. Exogenous, sphingosine-like lipids exert complex, Ca^{2+} -dependent effects on astrocyte cytoskeleton and vesicle mobility by disrupting microtubule-dependent movements of secretory vesicles. The selective inhibition of exocytosis in astrocytes may prevent astrocyte-mediated toxicity to neurons and delay disease onset. An important question is whether the FTY720 effects observed in this study occur in patients taking this drug on longer terms. While the therapeutic dose of the drug is expected to be in nanomolar range in the blood plasma, it is becoming apparent that micromolar concentrations of FTY720 can be attained in the brain parenchyma, especially at the astrocyte-vascular interface, due to the lipophilic nature of the drug. Thus, local concentration of FTY720 in the CNS may reach concentration that affect astrocyte vesicle mobility and inhibit their secretory activity, raising the possibility that some beneficial effects of the drug in treatment of multiple sclerosis may be in part due to changes in astrocytes physiology.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Nova metoda (platforma) za iskanje biološko aktivnih molekul, za ocenjevanje kakovosti celic za celične terapije in za nadzor kakovosti pridelave rekombinantnih proteinov na podlagi analize mobilnosti znotrajceličnih organelov v povezavi z bolezenskimi stanji

Metoda za proučevanje bioloških učinkov sestavin serumov in cerebrospinalne tekočine na posameznih evkariontskih celicah s specifično obarvanimi znotrajceličnimi organeli. Evkariontsko celico v kulturi lahko izpostavimo hidrofiličnim ligandom, ki delujejo po vezavi na receptorje v plazmali in aktivirajo znotrajcelične signalne poti, ali lipofilnim molekulam, ki prehajajo preko plazmaleme in posredno ali neposredno vplivajo na mobilnost znotrajceličnih organelov zaradi delovanja na citoskelet in/ali na verjetnost spontanega ali izzvanega zlivanja vsidranih mešičkov ter sprostitev njihove vsebine v zunajcelični prostor. V okviru projekta smo pripravili vlogo za patentno varstvo. Po prijavi nacionalnega patenta na Uradu RS za intelektualno lastnino, dne 11.7.2011, smo v letu 2012 vlogo razširili z mednarodno patentno prijavo. Zahtevo za podelitev mednarodnega patenta smo vložili 24.04.2012 na Svetovno organizacijo za intelektualno lastnino (World Intellectual Property Organization - WIPO) v Ženevi pod številko PCT/EP2012/001759. Patent je bil skupaj s poročilom o poizvedbi objavljen 17.01.2013 pod številko objave: WO/2013/007325. V letu 2013 je bila veljavnost patenta na Svetovni organizaciji za intelektualno lastnino podaljšana. V mesecu februarju 2014 je bila vložena tudi vloga za podelitev patenta v Združenih državah Amerike.

ANG

The new platform for survey of biologically active molecules suitable for assessment of cell quality and control of production of recombinant proteins on the basis of intracellular organelles mobility analysis in relation to disease states.

The new method enables survey of biological effects in serum and cerebrospinal fluid constituents acting to eukaryotic cells with specifically labelled mobile intracellular organelles. Cultured eukaryotic cells are exposed to either hydrophilic ligands that acts on the plasmalemmal receptor(s) and activate intracellular signaling pathway(s), or to lipophilic molecules that permeate through the plasmalemma and (in)directly affect organelle mobility by affecting cytoskeleton structure and/or the probability for spontaneous or stimulated fusion of vesicles and subsequent discharge of luminal cargo into the extracellular space. During the

course of the project, we have prepared this patent proposal. After obtaining the patent rights at the national patent office (The Slovenian Intellectual Property Office) in July 11-th 2011 we have aimed to expand this patent to the international patent in 2012. The later request was submitted to World Intellectual Property Organization - WIPO in Geneva, Switzerland (PCT/EP2012/001759) on April 24-th 2012. The patent was published along with the patent report on January 17-th 2013 (WO/2013/007325). The validity of the patent at WIPO was prolonged in 2013. In February, 2014, we have submitted the patent to the US Patent and Trademark Office (USPTO).

10. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj	
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

--

11.Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!**Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja**

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
	Varovanje okolja in trajnostni					

G.06.	razvoj	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.09.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Komentar

--

12.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹¹

	Sofinancer		
1.	Naziv		
	Naslov		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja	Šifra	
		1.	
		2.	
		3.	
		4.	
		5.	
	Komentar		
	Ocena		

13.Izjemni dosežek v letu 2014¹²**13.1. Izjemni znanstveni dosežek**

Motnje v metabolizmu sfingolipidov lahko vodijo do nastanka nevroloških bolezni; učinek sfingolipidov na astrocite je neraziskan. S konfokalnim mikroskopom smo izmerili kalcijeve odzive, mobilnost mešičkov in strukturno integriteto mikrotubulov ter aktinskih filamentov pred in po dodatku eksogenih sfingolipidov na astrocite. FTY720 in sfingozin sta izzvala dolgotrajno povečanje $[Ca^{2+}]_i$; izzvani odzivi so bili manjši v odsotnosti zunajceličnih Ca^{2+} . Izzvano povečanje $[Ca^{2+}]_i$ je sovpadalo z zmanjšano mobilnostjo mešičkov. FTY720 je izzval delno depolimerizacijo mikrotubulov, ne pa tudi aktinskih filamentov. Aktivacija fosfolipaze C in IP3 receptorjev je bila potrebna in zadostna za povečanje $[Ca^{2+}]_i$ v astrocitih tretiranih z FTY720. Eksogeni, sfingozinu podobni, nefosforilirani lipidi izzovejo kompleksne, od Ca^{2+} -odvisne učinke, ki vplivajo na strukturo citoskeleta, mobilnost mešičkov in sekrecijo prenašalcev gljive ter domnevno na homeostatsko funkcijo astrocitov in vivo.

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

V letu 2014 smo pri založbi Springer objavili poglavje v monografiji: Pathological Potential of Neuroglia, 2014, strani: 33-60. Poglavje 3 ima naslov: "Pathophysiology of Vesicle Dynamics in Astrocytes, Possible New Targets for Medical Intervention", avtorji so: Nina Vardjan, Maja Potokar, Matjaž Stenovec, Jernej Jorgačevski, Saša Trkov, Marko Kreft, Robert Zorec. ISBN 978-1-4939-0974-2, Urednika: V. Parpura, A. Verkhratsky.
http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-0974-2_3.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Medicinska
fakulteta

Marko Kreft

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana

6.3.2015

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/126

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2015 v1.00a

4B-42-B5-3C-36-76-5C-31-F6-E6-0E-32-71-69-2E-D4-A9-6A-02-FC

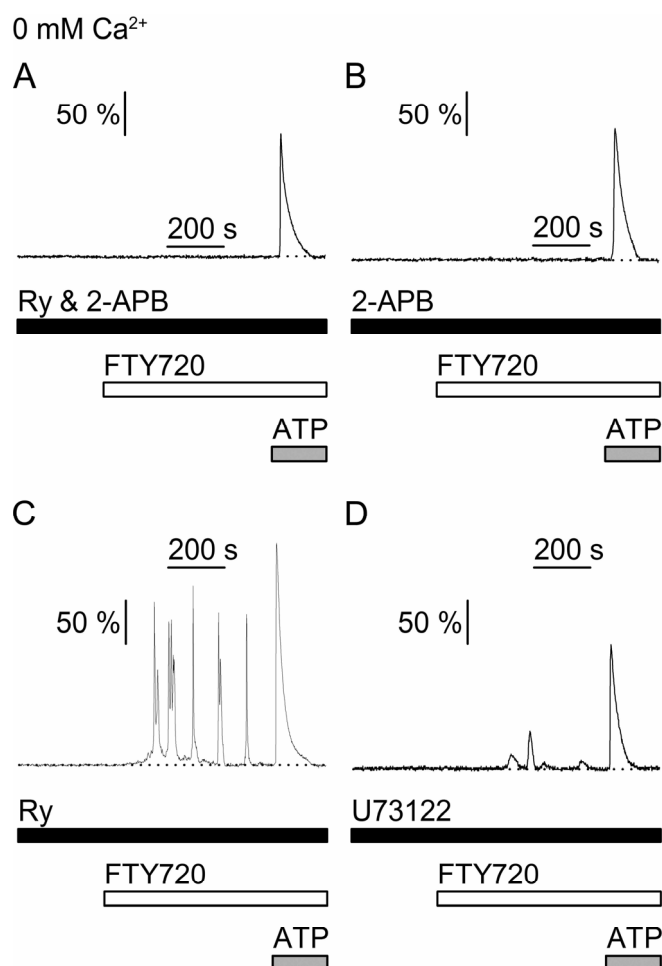
Priloga 1

VEDA: 3. Medicina

Področje: 3.03 Nevrobiologija

Dosežek 1: Bioaktivni sfingolipidi povzročijo spremembe kalcijeve homeostaze v kulturi podganjih astrocitov, Vir: Stenovec et. al. Acta physiol. 212, 2014, str. 49-61.

FTY720 in sfingozin (Sph) mobilizirata Ca^{2+} iz endoplazemskega retikuluma astrocitov preko signalnega mehanizma, ki je odvisen od fosfolipaze C (PLC). (A-D) Časovni posnetki intenzitete fluorescence kalcijevega indikatorja v posameznih astrocitih, ki so bili tretirani z različnimi inhibitorji znotrajceličnih Ca^{2+} kanalčkov, in nato izpostavljeni 10 μM FTY720 ter 1 mM ATP.



Motnje v metabolizmu sfingolipidov lahko vodijo do nastanka nevroloških bolezni; učinek sfingolipidov na astrocite je neraziskan. S konfokalnim mikroskopom smo izmerili kalcijeve odzive, mobilnost mešičkov in strukturno integriteto mikrotubulov ter aktinskih filamentov pred in po dodatku eksogenih sfingolipidov na astrocite. FTY720 in sfingozin sta izzvala dolgotrajno povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$; izzvani odzivi so bili manjši v odsotnosti zunajceličnih Ca^{2+} . Izzvano povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je sovpadalo z zmanjšano mobilnostjo mešičkov. FTY720 je izzval delno depolimerizacijo mikrotubulov, ne pa tudi aktinskih filamentov. Aktivacija fosfolipaze C in IP3 receptorjev je bila potrebna in zadostna za povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v astrocitih tretiranih z FTY720. Eksogeni, sfingozinu podobni, nefosforilirani lipidi izzovejo kompleksne, od Ca^{2+} -odvisne učinke, ki vplivajo na strukturo citoskeleta, mobilnost mešičkov in sekrecijo prenašalcev gljive ter domnevno na homeostatsko funkcijo astrocitov in vivo.

Priloga 2

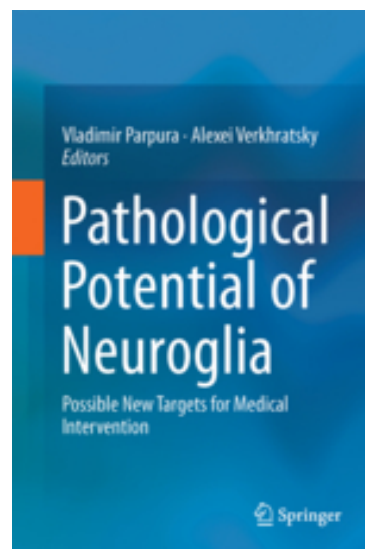
VEDA: 3. Medicina

Področje: 3.03 Nevrobiologija

Dosežek 1: **poglavje v monografiji: Pathological Potential of Neuroglia**

Vir: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-0974-2_3.

Pathological Potential of Neuroglia, 2014, strani: 33-60. Poglavje 3 ima naslov: "Pathophysiology of Vesicle Dynamics in Astrocytes, Possible New Targets for Medical Intervention", avtorji so: Nina Vardjan, Maja Potokar, Matjaž Stenovec, Jernej Jorgačevski, Saša Trkov, Marko Kreft, Robert Zorec. ISBN 978-1-4939-0974-2, Urednika: V. Parpura, A. Verkhratsky.



Povzetek: Kot v večini evkariontskih celic imajo mešički tudi v astrocitih pomembne celične vloge. Pomembna je konstitutivna vloga za obnavljanje membran in za medcelično komuniciranje. Transport mešičkov je povezan z obliko celične površine. Deli celic glije predstavljajo različne mikrodomene. Od tega je odvisen potencial signaliziranja in metaboljna podpora sosednjim celicam. Po drugi strani pa mešički služijo astroцитom za sproščanje kemičnih prenašalcev. Poglavje v monografiji se nanaša na lastnosti membrane mešičkov, ki shranjujejo glijalne transmiterje (glutamat, adenozin 5'-trifosfat, peptidni transmiterji). Transporti in eksocitoza mešičkov so pomembni tudi za razumevanje bolezni, kot so amiotrofična lateralna skleroza, multipla skleroza, avtistične motnje, poškodba, edem in nevroinflamacija. Za zdravljenje multiple skleroze uporabljajo fingolimod, ki vpliva tudi na transport mešičkov in izločanje prenašalcev iz astrocitov.