

Masteroppgave

Glutamat og Merkelcellens funksjon

- med oralbiologiske betraktninger

Av: Cathrine Gudding, H-10

Veiledere: Cecilie Morland, Bano Singh, Jon Storm-Mathisen, Tor Haugstad

Det odontologiske fakultet, Universitetet i Oslo, 2015

FORORD

Min instruktør ved Det odontologiske fakultet, dr. Bano Singh, gav meg muligheten til å delta i et spennende forskningsprosjekt om Merkelceller, sammen med høyt ansette forskere ved Institutt for medisinske basalfag, Seksjon for anatomi, Universitetet i Oslo (UiO). Det var virkelig en mulighet jeg ikke kunne la gå fra meg. Dr. Singh introduserte meg for hun som etter hvert ble min hovedveileder og nære samarbeidspartner, dr. Cecilie Morland. Jeg er svært takknemlig for at dere viste meg tillit til å delta i dette prosjektet. Jeg vil rette en spesiell takk til Cecilie som virkelig har tatt meg under sin vinge og gitt meg grundig innføring i alle prosedyrer, veiledet ved skriveprosessen og vært min ledestjerne gjennom dette. At du har vært tilgjengelig til alle døgnets tider og gitt så mye av deg selv, er jeg fantastisk takknemlig for.

Jeg vil også rette en stor takk til mine medveiledere prof. emeritus Jon Storm-Mathisen og prof. Tor Haugstad, for deres engasjement og motivasjon. En takk også til lederne i forskningsgruppen SN-Lab, prof. Linda Hildegard Bergersen og prof. Vidar Gundersen. Men ikke minst, bak ett hvert forskningsarbeid finnes kunnskapsrike mennesker som i det «skjulte» bidrar med viktige elementer i vårt arbeid: Jeg vil takke Dr. Ellen Lumpkin ved Columbia University for vevsprøver, Grazyna Babinska for snitting, Bashir Hakim for opplæring på elektronmikroskop, ansatte ved forsøksdyravdelingen, UiO for tilgang til lokaler og utsyr, Det odontologiske fakultet for tildeling av et sommerstipend og to halvårsstipender, og sist men ikke minst, alle gode kolleger ved SN-lab (Liv Kleppa, Johanne Rinholm, Kaja Nordengen, Maja Puchades, Lauritz Kennedy, Krister Andersson, Alena Hadzic, Carl Johan Sogn, Laura Moretti) som har hjulpet til med å holde humøret mitt oppe, og som hver dag viser et brennende engasjement i sin forskning. Jeg er full av beundring. Læringskurven har vært bratt og humpete, men endelig er jeg i mål; og det mye takket være dere.

Dette har vært en lang reise, men endelig kan jeg heise denne blekka i været og rope "hurra!". Tusen, tusen takk alle sammen – det har vært en ære å få være en del av gjengen!

Cathrine Gudding

SAMMENDRAG

Merkelceller er kjent som mekanosensitive celler som finnes i taktile hudområder, samt i oralt vev. Her har man sett at de øker i antall ved bl.a. tannløshet, inflammasjon og munnhulekreft. Men hva er egentlig Merkelcellens funksjon i oralbiologien, og gjennom hvilke mekanismer utøver den sin funksjon? Det har blitt framlagt flere hypoteser omkring dette, men fremdeles vet vi lite om Merkelcellens rolle, og hvordan den samspiller med andre celler. Som et ledd i å forstå Merkelcellens funksjon har vi sett på hvordan disse cellene kommuniserer med vevet omkring seg. Ved hjelp av immuncytokjemiske metoder og elektronmikroskopi har vi undersøkt om Merkelcellen har maskineriet som skal til for å frisette signalstoffet glutamat. Vi har påvist vesikulære glutamattransportører i membranen til vesikler som ligger i Merkelcellens cytoplasma, noe som sannsynliggjør at Merkelcellene kommuniserer ved hjelp av glutamat. Merkelcellens betydning i klinisk odontologisk sammenheng er fortsatt uviss. For å kunne finne ut av dette, gir forskning på basale mekanismer, slik som i denne studien, uunnværlige brikker i det store puslespillet. Det at Merkelcellen gjennom evolusjonen, har beholdt sin naturlige tilstedeværelse i det orale cellulære miljøet, og i tillegg øker i antall som respons på forskjellige tilstander i munnhulen, tyder på at denne celletypen innehar en eller flere viktige roller. Selv om mange puslespillbrikker fortsatt ikke har funnet sin plass, har resultatene fra vår studie ført oss ett steg nærmere forståelsen av denne merkelige cellen og dens samspill med omkringliggende celler.

INNHOLDSFORTEGNELSE

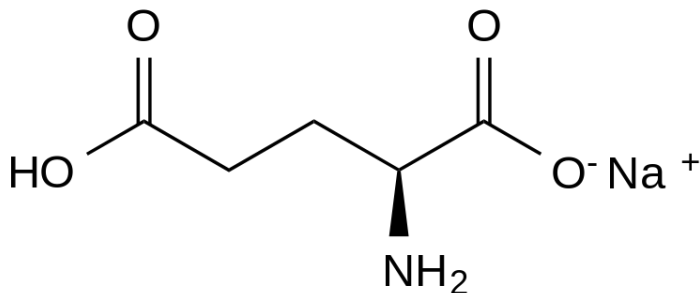
FORORD	II
SAMMENDRAG	III
INNHOLDSFORTEGNELSE.....	IV
1. INTRODUKSJON	1
1.1. GLUTAMAT	1
1.2. MERKELCELLEN	1
1.2.1. Merkelcellens morfologi.....	2
1.2.2. «Dense core»-vesikler	3
1.2.3. Merkelcellens funksjon.....	4
1.2.4. Merkelcellens opphav	5
1.2.5. Merkelceller i værhår-follikler	5
1.2.6. Merkelceller i oralt vev.....	5
1.3. KJEMISKE SYNAPSER.....	6
1.3.1. Karakteristika ved en synapse	7
1.3.2. Glutamat som neurotransmitter	7
1.3.3. Vesikkeltransport og fusjon til membranen (frisetting av neurotransmittere). 8	
2. HYPOTESE	10
3. METODE.....	11
3.1. KJEMIKALIER OG BUFFERE TIL WESTERN BLOTTING	11
3.2. WESTERN BLOTTING.....	11
3.2.1. Prøveopparbeidelse.....	12
3.2.2. Gelelektroforese	14
3.2.3. Immunoblotting.....	14
3.2.4. Kjemoluminescensdeteksjon.....	16
3.3. KJEMIKALIER OG LØSNINGER BRUKT TIL IMMUNGULLMERKING	16
3.4. POSTEMBEDDING IMMUNGULLMERKING FOR VGLUT1 OG VGLUT2.....	16
3.4.1. Prøveopparbeidelse.....	17
3.4.2. Immungullmerking	19
3.4.3. Kontrastering	20
3.4.4. Elektronmikroskopi.....	20
3.4.5. Kvantitative analyser	22
3.4.6. «Test-sandwich».....	25

3.5. STATISTIKK	26
4. RESULTATER.....	27
4.1. TESTING AV VGLUT1- OG VGLUT2-ANTISTOFF MED WESTERN BLOTTING.....	27
4.2. ASSOSIASJON MELLOM VGLUT1-MERKING OG «DENSE CORE»-VESIKLER I MERKELCELLER	27
4.3. ASSOSIASJON MELLOM VGLUT2- MERKING OG «DENSE CORE»-VESIKLER I MERKELCELLER	28
4.4. GLUTAMATMERKING AV «SANDWICH»-SNITT	29
4.5. GLUTAMATEMERKING AV MERKELCELLER.....	30
5. DISKUSJON.....	31
5.1. METODISKE BETRAKTNINGER	31
5.1.1. Antistoffenes spesifisitet	31
5.1.2. Fiksativ og fikseringsmetode	32
5.1.3. Forholdet mellom epitoptetthet og antall gullpartikler	33
5.1.4. Kvantitering og kvantitativ analyse	34
5.1.5. Kriterier for å gjenkjenne Merkelceller ved elektronmikroskopi	35
5.2. TOLKNING AV RESULTATER	36
6. FREMTIDIGE ASPEKTER.....	38
7. KONKLUSJON	39
8. REFERANSER	40

1. INTRODUKSJON

1.1. GLUTAMAT

Glutamat er en ikke-essensiell aminosyre, med molekylstruktur bestående av et karbonskjelett, to karboksylgrupper og en aminogruppe (figur 1). Denne aminosyren finnes i rikelige mengder, og innehar flere viktige roller i menneskekroppen: I tillegg til å være en sentral komponent i den cellulære metabolismen, er den dessuten den kvantitativt viktigste eksitatoriske neurotransmitteren i hjernen. Også i munnhulen har glutamat en viktig signalfunksjon, blant annet ved å stimulere smaksreseptorer. Glutamatsmaken er kategorisert som den femte smaks kvaliteten, og ble i 1907 gitt navnet «umami» (Kikunae Ikeda, se oversikt (1)). Med tanke på at glutamat er et viktig signalmolekyl både i nervesystemet, hvor den er regnet som den viktigste neurotransmitteren, og i smakssansen, er det mulig at den også kan spille en sentral rolle i signaloverføringen mellom andre celler, blant annet i munnhulen.



Figur 1: Strukturformel for natriumglutamat (2).

1.2. MERKELCELLEN

Huden og slimhinnene utgjør kroppens første barriere mot omverdenen, og en viktig oppgave for disse organene er derfor å skille mellom farlige og ufarlige ytre stimuli. Dette krever tilstedeværelse av en rekke mekanosensoriske celler, som er spesialiserte til å respondere på ulike typer av stimuli, slik som berøring, smerte, kløe, varme og kulde. I hud og slimhinner kjenner man til tre typer mekanosensoriske celler: Ruffinilegemer, Meissners legemer og Merkelceller. Disse cellene er med på å omgjøre mekanisk stimulus til et

nervesignal, som sendes til hjernen for sentral integrering og prosessering. Transduksjonen av selve nervesignalet er relativt godt beskrevet, men lite er kjent når det gjelder samspillet mellom mekanosensoriske celler i hud eller slimhinne, og afferente nerver. Den ene av de tre mekanosensoriske cellene, nærmere bestemt Merkelcellen, ble kjent i 1875. Den tyske anatomen Friedrich Sigmund Merkel (figur 2) oppdaget da en celletype i hud, som basert på sin morfologi, skilte seg ut i forhold til sine omkringliggende celler. Han ga dem navnet "Tastzellen" på grunnlag av hans oppfatning om at disse celler var berøringsreseptorer (3). I dag kjenner vi cellene ved navnet Merkelceller.

Merkelceller finnes i flere vev hos pattedyr, men hovedsakelig i områder med stor taktil følsomhet, som på hårløs og behåret hud, samt i oralt vev. Merkelceller i munnhulen er lite undersøkt, men nyere forskning viser at cellene her kan ha en funksjon ved flere sykdommer og tilstander i oralt vev (4-6).

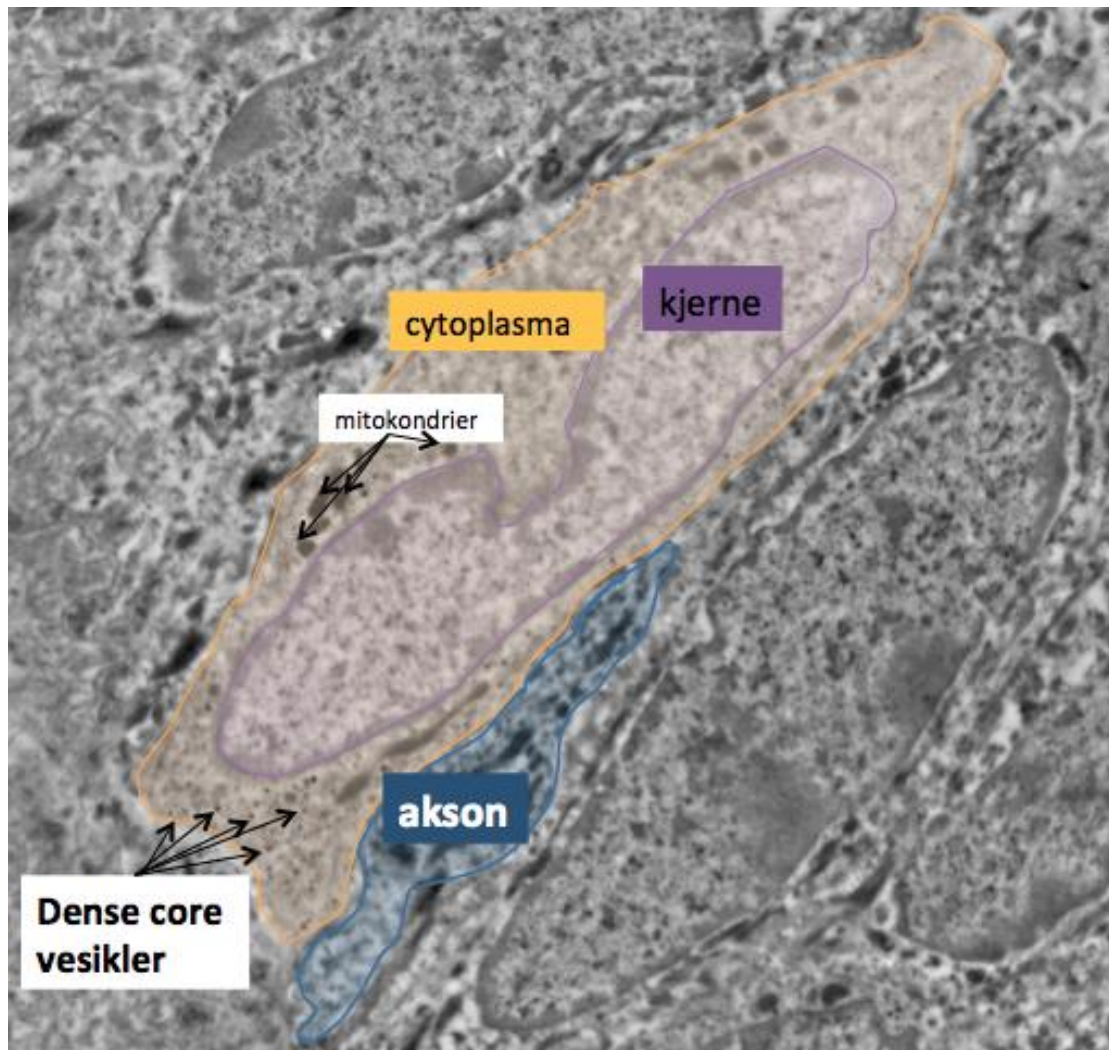


Figur 2: Portrett av Friedrich Sigmund Merkel (7).

1.2.1. Merkelcellens morfologi

Merkelcellen er vanskelig å lokalisere ved bruk av standard eosin- og hematoxylinmerking på lysmikroskopisk nivå. Men ved hjelp av immunhistokjemisk merking av spesifikke markørproteiner, særlig cytokin 20 (CK20) (8), eller ved elektronmikroskopi, som i denne

studien, kan man detektere Merkelcellen (figur 3). Med dens karakteristiske morfologi skiller den seg ut fra andre omkringliggende celler. Lettest gir den ca. 10-15 μm lange Merkelcellen seg til kjenne ved sin elektrontette og lobulære cellekjerne, samt sine karakteristiske granula/vesikler. I tillegg har Merkelceller mange mitokondrier, og er ofte i nær beliggenhet til et akson (for morfologisk beskrivelse av orale Merkelceller fra mennesker, se referanse (9)).

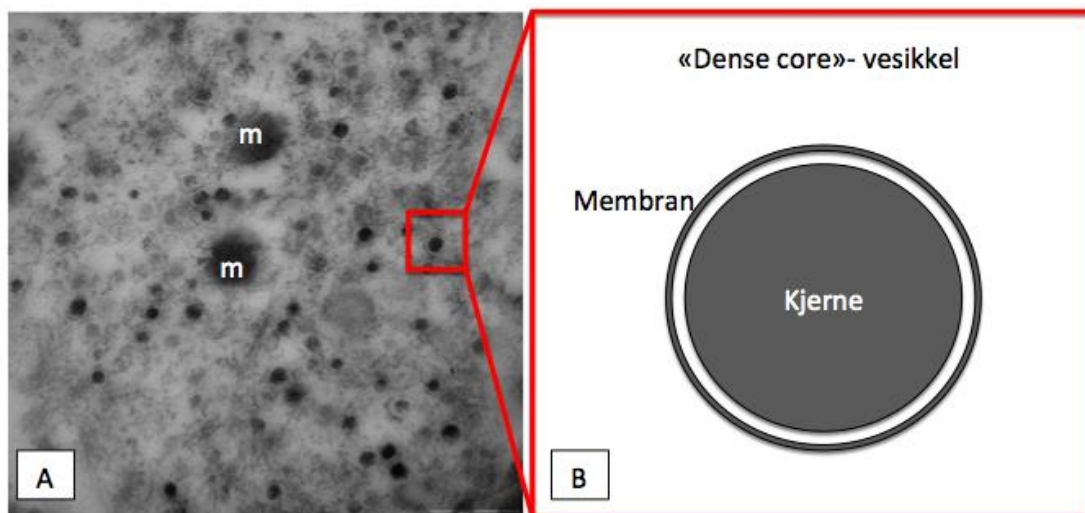


Figur 3: En Merkelcelle med et nærliggende akson (Cathrine Gudding, 2014).

1.2.2. «Dense core»-vesikler

Granulane, kalt «dense core»-vesikler, finner vi i Merkelcellens cytoplasma. Det er observert at de kan variere i antall fra 4 til 300 stykker i en celle (9), og de har en diameter på mellom 80-100nm (10). «Dense core»-vesikler har en relativt stor elektrontett kjerne som

opptar det meste av vesikkelens volum, og er omgitt av en enkel fosfolipidmembran (figur 4) (11). Disse vesiklene antas å inneholde en rekke ulike signalstoffer (12), deriblant neuropeptider, som vasoaktivt intestinalt polypeptid (VIP), kalsitoning-relatert peptid (CGRP) og substans P (13-16), samt klassiske neurotransmittere som serotonin (17) og glutamat (18).



Figur 4: (A): Elektronmikroskopibilde av Merkelcellens cytoplasma med «dense core»-vesikler, samt to mitokondrier (m). (B): Skjematisk fremstilling av en «dense core»-vesikkel (Cathrine Gudding, 2014/2015).

1.2.3. Merkelcellens funksjon

Til tross for at det er 130 år siden Merkel introduserte Merkelceller som berøringssensorer i hud, er cellenes eksakte rolle fortsatt debattert. En fremherskende oppfatning er at Merkelceller er mekanosensoriske celler som, når de stimuleres, aktiverer langsomme (SAI-type) afferenter via synaptisk transmisjon (19, 20). Dette støttes av funn som indikerer at Merkelceller er følsomme for mekanisk strekk av membranen (21), som f.eks. ved svelling (20, 22), samt ultrastrukturelle (elektronmikroskopiske) studier som viser synapselignende kontaktpunkter mellom Merkelceller og nerver (denne studien; 19) (figur 3); omtalt som Merkelcelle-nevritt-kompleks. På genekspresjonsnivå har man funnet presynaptiske komponenter som «active zone scaffolding protein», «SNARE complex genes», spenningsstyrte kalsiumkanaler, kalsiumsensorer og neurotransmittertransportører, som alle er nøkkelkomponenter for celler som har en synaptisk eksosytose av vesikler (18).

En alternativ hypotese er at Merkelceller, isteden for å indusere mekanosensorisk informasjon, fungerer som filtre eller regulatorer for slik informasjon, eventuelt at

Merkelceller og sensoriske afferente nerveterminaler utgjør to parallelle mekanoreseptorer som initierer ulike deler av SA1-responsen (23).

Den store usikkerheten knyttet til Merkelcellenes funksjon, forsterkes ytterligere av at både innerverte og ikke-innerverte Merkelceller er rapportert i samme vev. Merkelceller som ikke danner synaptiske kontakter med nerver, kan antas å ha en parakrin funksjon i berøringssensorikken, men detaljene i denne signalering er ikke kjent. I munnhulen finnes begge typer av Merkelceller (24).

1.2.4. Merkelcellens opphav

Et annet mysterium rundt Merkelcellen er dens embryologiske opphav. I 1977 foreslår R.K. Winkelmann at disse cellene har opphav i nevrallrøret (25). Det er stor usikkerhet knyttet til dette temaet, men den seneste forskningen peker på at Merkelceller dannes fra proliferative keratinocytter i huden (26, 27). Hvilke faktorer som initierer og regulerer proliferasjon fra keratinocytiske stamceller til modne Merkelceller, er i stor grad ukjent (for diskusjon, se (28)).

1.2.5. Merkelceller i værhårfollikler

Flere studier (29-31) har vist at det i værhårfollikler (hos f.eks. gnagere) finnes Merkelceller. Merkelceller *in situ* kan avfyre et aksjonspotensiale som respons på depolarisering og er rapportert å være det primære stedet for taktil transduksjon (32).

Ved bruk av elektronmikroskop på snitt fra værhårfollikler finner man Merkelceller innimellom andre celler, hovedsakelig keratinocytter, hvor de sammen danner en lang rekke av celler rett ved basalmembranen (figur 21). Identifiseringskriterier for Merkelceller bestemmes på bakgrunn av immuncytokjemisk merking og/eller på morfologiske trekk (se avsnitt 1.2.1. Merkelcellens morfologi).

1.2.6. Merkelceller i oralt vev

I oralt vev er Merkelcellen funnet i ganen, samt i gingivale og bukkale orale mukosa (4, 9). Her finnes, som nevnt tidligere, både innerverte og ikke-innerverte Merkelceller (24). Både morfologisk og fysiologisk ser orale Merkelceller ut til å ligne Merkelceller i andre vev. Tilsammen tyder dette på at Merkelceller i munnhulen, i likhet med Merkelceller i andre

taktile områder, kan fungere som mekanoreseptorer for berøring, basert på funn av mikrovilli på Merkelcellens overflate (5). Man har videre sett at antall Merkelceller er økt i kronisk skadet mukosa (lichen planus, kronisk aspesifikk inflammasjon), i slimhinnen over tumorer (4), samt hos tannløse personer (6). Dette mener Righi og medarbeidere (4) kan indikere en reparativ funksjon. I tillegg til Merkelceller som inngår i Merkelcelle-nevritt-komplekser, inneholder normal oral slimhinne også dendrittiske Merkelceller, som ikke ser ut til å danne direkte forbindelser med nerver. Disse har trolig en parakrin påvirkning på keratinocytter og andre nærliggende celler (33), men de fysiologiske effektene av dette er ikke kjent.

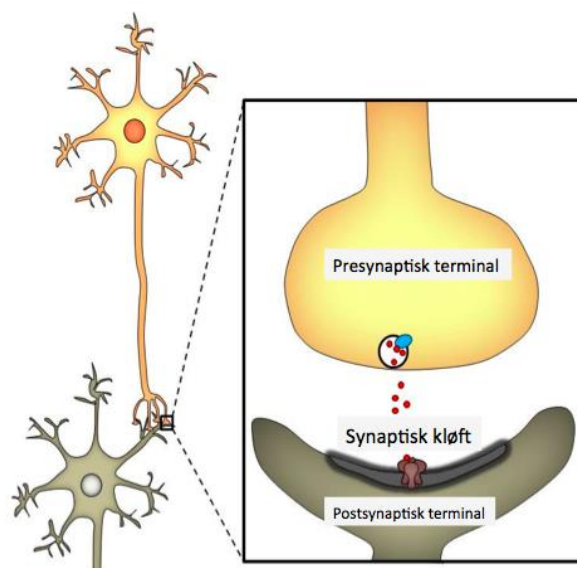
Merkelceller ser altså ut til å kunne kommunisere med andre celler via frigjøring av parakrine og synaptiske signalstoffer. Et vesentlig spørsmål i den forbindelse er hvilke signalstoffer Merkelcellene bruker for å kommunisere med omkringliggende celler. For å karakterisere Merkel-nevritt-synapsen, er det naturlig å sammenligne med godt karakteriserte synapser, slik som kjemiske synapser i hjernen.

1.3. KJEMISKE SYNAPSER

Etter 1850 var det allment akseptert blant biologer at kroppen består av celler, men allikevel var det mange uløste spørsmål. Helt fram til begynnelsen av 1900-tallet pågikk en diskusjon om hvorvidt nervecellene var separate enheter eller om de hang sammen. Troen på at nevronene var separate enheter har i senere tid blitt referert til som «Nevron-doktrinen», og ble første gang framsatt av Fritjof Nansen i hans doktoravhandling. Han mente da at det fantes en kløft mellom nervecellene (34). Fram mot år 1900 var det den spanske nevroanatomien Santiago Ramon y Cajal, som promoterte nevron-doktrinen, mens den italienske legen og forskeren Camillo Golgi mente at cellene hang sammen, og derfor ikke kunne betraktes som helt uavhengige enheter. De ble begge belønnet med nobelpris for dette arbeidet i 1906. I dag forstår vi at Ramon y Cajal og Golgi i virkeligheten diskuterte hvorvidt det fantes synapser. Ramon y Cajal og Nansen hadde rett da de mente at det fantes en kløft mellom nervecellene, og dette måtte bety at kommunikasjonen mellom cellene gikk via ekstracellulærommet (for historisk oversikt, se (35)). Den intercellulære kommunikasjonen over synapsen var i stor grad ukjent fram til 1921, da Otto Loewi demonstrerte at nevroner kommuniserte med hverandre via kjemiske stoffer, neurotransmittere (36).

1.3.1. Karakteristika ved en synapse

Selve synapsen består av en sender; presynaptisk celle, som kontakter en mottaker; postsynaptisk celle (figur 5). Da elektronmikroskopet kom i bruk på 1950-tallet, kunne man for første gang se disse synaptiske strukturene. I den presynaptiske terminalen kunne man se små membranomsluttede runde organeller, mens den postsynaptiske membranen var tykk og elektrontett. Dette representerer henholdsvis presynaptiske vesikler som inneholder neurotransmittere, og høy tetthet av reseptorer i den postsynaptiske membranen. Neurotransmittere er inndelt etter hvilke reseptorer de binder seg til, og dermed hvilken effekt de har på mottakercellen. Gamma-amino-butansyre (GABA) og glysin er inhibitoriske transmittere, mens glutamat, og sannsynligvis også aspartat, er eksitatoriske neurotransmittere.



Figur 5: Skjematisk figur av en kjemisk synapse (Modifisert fra Cecilie Morland, 2012).

1.3.2. Glutamat som neurotransmitter

En klassisk neurotransmitter defineres som et kjemisk stoff som syntetiseres i nerveceller, kan pakkes i vesikler og frisettes ved kalsiumavhengig eksosytose, som respons på et aksjonspotensial (nerveimpuls). Når neurotransmitteren er frisatt i synapsespalten, formidler den et kjemisk signal fra ett nevron til et annet, ved at den binder seg til spesifikke reseptorer på mottakercellens overflate. Da glutamat ble etablert som neurotransmitter på 1980-tallet, hadde man visst i 20 år at nevroner kunne aktiveres av glutamat (37). En viktig

brikke i å etablere glutamat som neurotransmitter var at min biveileder, Jon Storm-Mathisen, og medarbeidere klarte å lage antistoffer mot aminosyrer slik at man i mikroskopet kunne se hvor i vevet de var (38). I oppfølgingen ble det klart at blant de eksitatoriske transmitterne, var glutamat den mest utbredte (39, 40). Den finnes i svært høye totalkonsentrasjoner i sentralnervesystemet, men med ujevn fordeling mellom ulike cellulære og subcellulære «compartments». I hjernen finner vi glutamat oppkonsentrert i den presynaptiske terminalen, hvor den akkumuleres i synaptiske vesikler (40, 41).

1.3.3. Vesikkeltransport og fusjon til membranen (frisetting av neurotransmittere)

Synaptiske vesikler er organeller på ca. 40nm i diameter som er omsluttet av en membran. Disse er, ved hjelp av transportørproteiner i vesikkelmembranen, i stand til å ta opp og akkumulere neurotransmittere. Vesikulært opptak av de kjente neurotransmitterne er sekundært aktivt og drives av den elektrokjemiske gradienten for hydrogenioner (H^+). H^+ -gradienten skapes ved at en adenosintrifosfat (ATP)-avhengig protonpumpe transporterer H^+ inn i vesiklene mot en stor gradient (42). I membranen til vesikler som frigjør glutamat, sitter det vesikulære glutamattransportører (VGLUT), som bruker den elektrokjemiske gradienten for H^+ som drivkraft for å transportere neurotransmitter-glutamat inn i vesiklene. Vi har tre subtyper VGLUT: VGLUT1, VGLUT2 og VGLUT3. VGLUT1 og VGLUT2 er ansvarlig for opptak av glutamat til vesikler i de fleste eksitatoriske synapser i hjernen, mens VGLUT3 finnes bare i noen få nevroner, gjerne i synapser som primært frigjør andre transmittere enn glutamat (se (43) for review). Disse proteinene er selektive for glutamat, men har lav affinitet ($K_m = 1$ til $3mM$) for glutamat sammenlignet med plasmamembrantransportørene. Allikevel ligger K_m for VGLUTene i samme område som den intracellulære konsentrasjonen av glutamat, slik at de vesikulære transportørene vil være aktive under normale fysiologiske glutamatkonsentrasjoner. VGLUT1 og VGLUT2 er svært like hverandre, og 75-80% av aminosyresekvensen er identisk (43), men de har litt forskjellig molekylvekt; VGLUT1 er ca. 60kDa, mens VGLUT2 er ca. 65kDa (for oversikt, se review (44, 45)).

Frisetting av neurotransmitter til synapsen initieres av at et aksjonspotensial ledes nedover aksonet og depolariserer membranen i den presynaptiske terminalen. Depolariseringen, med påfølgende åpning av spenningsstyrte kalsium (Ca^{2+})-kanaler, fører til at Ca^{2+} strømmer inn i den presynaptiske nerveterminalen. Dette fungerer som et signal som

fører til frisetting av neurotransmitteren til den synaptiske kløften, hvor den kan utøve sin funksjon ved å binde seg til reseptorer på den postsynaptiske membranen.

På grunn av den sentrale rollen glutamat har som neurotransmitter i hjernen, er det naturlig å spørre seg om også Merkelceller også kan kommunisere via glutamat, og et viktig spørsmål i så måte er hvorvidt Merkelceller har vesikulære glutamatpumper, VGLUTer, som kan transportere glutamat inn i vesikler.

2. HYPOTESE

Denne oppgaven vil teste følgende hypotese:

Merkelceller frigir glutamat via «dense-core»-vesikler.

For å søke å bekrefte eller avkrefte hypotesen, vil vi besvare følgende forskningsspørsmål:

Spørsmål 1: Inneholder «dense core»-vesikler vesikulære glutamattransportører?

Vesikulære glutamattransportører (VGLUTer) er uttrykt i den vesikulære membranen hvor de har som oppgave å transportere glutamat over membranen. VGLUTene er dermed ansvarlig for akkumuleringen av glutamat i synaptiske vesikler før eksosytotisk frisetting. Hvis disse transportørene finnes i «dense core»-vesikkelmembranen i Merkelceller, vil dette indikere at glutamat blir lagret og frigitt fra disse vesiklene. Vi vil bruke kvantitative elektronmikroskopiske analyser for å finne ut hvorvidt VGLUT1 og/eller VGLUT2 er lokalisert på disse vesiklene.

Spørsmål 2: Er glutamat lagret i vesikler i Merkelceller?

Ved hjelp av kvantitativ postembedding immunogullmerking og elektronmikroskopi, vil vi undersøke om «dense core»-vesikler i Merkelceller inneholder aminosyren glutamat. Dersom vi kunne finne at glutamat ble akkumulert i disse vesiklene, ville dette ytterligere støttet hypotesen om at Merkelceller signalerer ved hjelp av denne eksitatoriske aminosyren.

3. METODE

3.1. KJEMIKALIER OG BUFFERE TIL WESTERN BLOTTING

Homogeniseringsbuffer	1 % SDS, 10mM NaPi, pH 7,4
Stock løsning	Bovine serum albumin (BSA) (2mg/ml) + homogeniseringsbuffer
Samplebuffer	Glycin 20%, Tris HCl 0,125M, pH 6,8, SDS 4%, Bromophenol blue, i H ₂ O
Running buffer	Tris Base 25mM, Glycine 192mM, SDS 0.1%, i H ₂ O
Blottingbuffer	Tris Base 25mM, Glycine 192mM, Isopropanol 10%, i H ₂ O
TBST	Tris HCl 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05%, i H ₂ O
Blokkeløsning	1% BSA i TBST
Primærantistoff	Kanin anti-VGLUT1 antistoff 456-560, fra Synaptic Systems (1:1000) Kanin anti-VGLUT2 antistoff 135-402, fra Synaptic Systems (1:1000)
Sekundærantistoff	HRP-koblet esel anti-kanin IgG, fra GE Healthcare

3.2. WESTERN BLOTTING

Western blotting er en metode brukt til å separere proteiner etter størrelse, for deretter å visualisere dem ved hjelp av antistoffer. I denne oppgaven ble Western blotting brukt for å kontrollere antistoffenes spesifisitet. Dette er med på å kvalitetssikre våre resultater. Metoden består av flere trinn. De innledende trinnene (prøveopparbeidelsen) består av disseksjon og homogenisering av vev, samt proteinmåling av vevshomogenatet. Etter prøveopparbeidelsen har vi denaturerte proteiner i løsning. Det neste trinnet er gelelektroforese. Proteinene separeres da etter ladning og molekylvekt. Dette skjer ved at proteinene migrerer med ulik hastighet i en gel i et elektrisk felt. Denaturerte proteiner binder seg til «sodium dodecyl sulfat» (SDS), som gjør dem negativt ladet. Binding av negativt ladede proteiner er proporsjonal med proteinets molekylvekt, slik at migrasjonshastigheten bestemmes av proteinenes molekylvekt. Hvert bånd som dannes representerer dermed en molmasse. En proteinstandard/markør (i oppgaven også omtalt som «std») med kjente molekylvekter inkluderes for å identifisere båndene. De siste trinnene er immunblotting og kjemoluminescensdeteksjon. Proteinbåndene overføres da til en nitrocellulosemembran (kalt blotting), deretter detekteres båndene ved hjelp av antistoffer. Til slutt ønsker vi å visualisere protein-antistoff-kompleksene ved hjelp av kjemoluminescens. Vi anser antistoffene for spesifikke hvis de gir et tydelig bånd ved forventet molekylvekt og ingen eller svært svake tilleggsbånd. Tykkelsen og intensiteten på båndet vi ser, vil korrespondere med mengden av det aktuelle proteinet i homogenatet.

3.2.1. Prøveopparbeidelse

Disseksjon og homogenisering

Våre forsøk klassifiseres ikke som dyreforsøk, siden dyrene kun avlives for uttak av organer. Det er derfor ikke nødvendig å søke forsøksdyrvalget om tillatelse. Forsøkene dekkes av gruppens tillatelse til *in vitro* forsøk; prosjekt nr. VIT05.03.

Wistar hannrotter (WIST) var fra NOVA-SCB AB (Solluna, Sweden). De ble oppstallet ved Avdeling for komparativ medisin, Institutt for medisinske basalfag (IMB) og hadde kontinuerlig tilgang på mat og vann. Temperaturen i dyrerommene var 24°C og døgnet var delt inn i 12 timer lys og 12 timer mørke. Håndtering av dyrene var i overensstemmelse med lokale og nasjonale regelverk, og ble utført av FELISA-sertifisert personale. Ved avlivning ble rottene anestesert med isofluran og dekapitert. Hjernen ble dissekert ut på is og veid. Hjernevevet ble overført til homogenisatorrør, tilsatt 10 volumer homogeniseringsbuffer som var iblandet en cocktail av proteasehemmere (Complete™, Roche, Tyskland) og homogenisert (450 rpm; 10 strokes). Deretter ble prøven sonikert (15 sek.) og umiddelbart frosset i flytende nitrogen. Prøvene ble deretter oppbevart ved -80°C fram til proteinmåling og Western blotting.

Proteinmåling

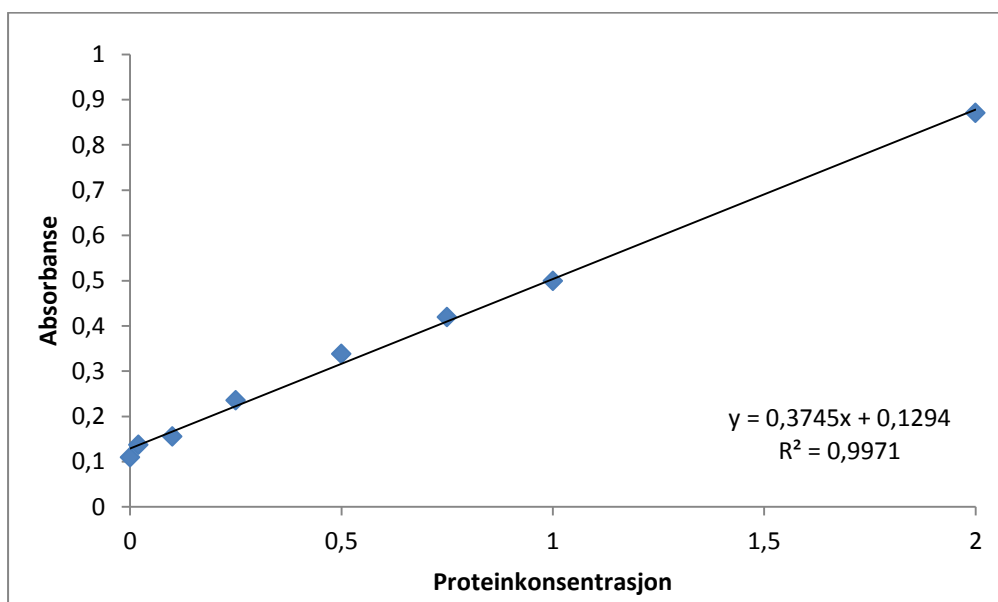
Proteinmengden i homogenatet ble bestemt ved bruk av BC Assay (Interchim, Montluçon, France). Assayet gir kolorimetrisk deteksjon av proteinkonsentrasjonen, har høy nøyaktighet og er kompatibelt med SDS opp til 10 %.

Standardkurve: En stock-løsning av BSA (2mg/ml) ble laget ved å løse BSA i homogeniseringsbuffer. Denne ble så fortynnet i homogeniseringsbuffer som beskrevet nedenfor (tabell 1), slik at vi fikk 8 standarder med kjente proteinkonsentrasjoner.

Tabell 1: Fortynning av proteinstandard for standardkurve.

Standard (std)	BSA 2mg/ml	Buffer	Konsentrasjon
Std 1	60 µl stock	-	2000 µg/ml
Std 2	60 µl stock	60 µl	1000 µg/ml
Std 3	84 µl stock	140 µl	750 µg/ml
Std 4	20 µl stock	60 µl	500 µg/ml
Std 5	20 µl stock	140 µl	250 µg/ml
Std 6	40 µl std 5	60 µl	100 µg/ml
Std 7	20 µl std 5	80 µl	20 µg/ml
Std 8	-	60 µl	0 µg/ml

Proteinmålingen ble utført i 96-brønners brett med flat bunn. For hver standard ble 10µl «std» blandet med 200µl BC-reagens (49 deler komponent A + 1 del komponent B). Det var viktig å unngå luftbobler under pipetteringen, siden luftbobler ville forstyrre avlesningen. Hver standard ble målt i triplikate. Prøvene ble dekket med parafilm, satt på ristebrett i 15 min., og deretter inkubert ved 37°C i 30 min.. Etter inkubering ble absorbansen målt ved 562nm (plateleser; Labsystems Multiskan Bichromatic, Finland). Gjennomsnitt av absorbansen i de tre parallellene ble plottet mot proteinkonsentrasjon (Microsoft Excel), og ga en linjær standardkurve (figur 7) med en R-kvadrat (R^2 -) verdi på 0.997. R^2 -verdier nært 1 indikerer at kurven er tilnærmet linjær.



Figur 7: Gjennomsnitt av absorbansen mot proteinkonsentrasjon. Innsatt ligning for trendlinjen (denne ble brukt til beregning av proteinkonsentrasjonen i prøven). R^2 : R-kvadratverdi for trendlinjen.

Måling av protein i homogenatet

Homogenatet ble analysert i samme 96-brønners brett som standardkurven, for å sikre at prøver og standarder ble behandlet så likt som mulig. Homogenatet ble fortynnet i homogeniseringsbuffer (1 del homogenat + 9 deler buffer), og 10µl av denne fortynningen ble blandet med 200µl BC-reagens. Prøvene ble inkubert som beskrevet for standardene, og analysert i triplikater. Proteinkonsentrasjonen i prøven ble beregnet ved å sammenligne den

målte absorbanverdien med den etablerte standardkurven. Ved å løse ligningen presentert i figur 7 for x, får man:

$$x = \frac{y - 0.1294}{0.3745}$$

Der x er proteinkonsentrasjonen ved absorban y. Utfra dette kan proteinkonsentrasjonen i prøven bestemmes basert på målt absorban.

3.2.2. Gelelektroforese

Gelelektroforesen ble utført som beskrevet av Laemmli (46), med noen modifikasjoner (47). I korte trekk ble homogenatet fortynnet til 2µg/µl i homogeniseringsbuffer og blandet 1:1 med «sample buffer» slik at sluttkonsentrasjonen ble 1µg/µl. Prøven ble så satt i varmeskap (70°C) i 10 min..

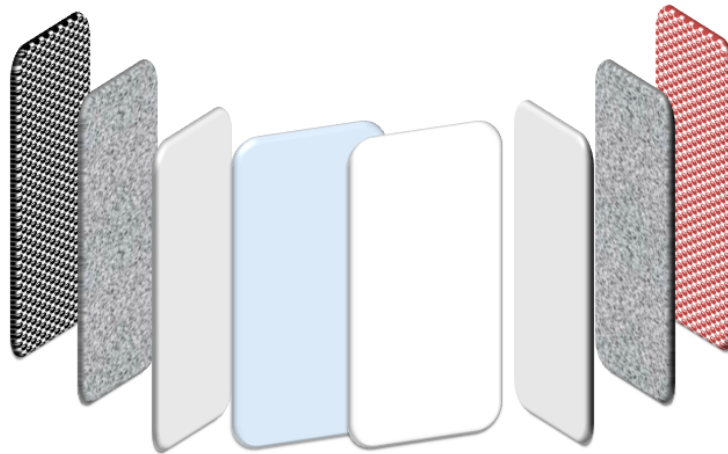
Brønnene på en Criterion gel, 12,5 % Tris-HCl (BioRad, USA), ble fylt med «running buffer», og plassert i et kjørekar med «running buffer». Homogenat tilsvarende 10 eller 30 µg protein (beregnet som beskrevet overfor), ble applisert i hver brønn etter ett gitt mønster (tabell 2). Proteinstandarden «Precision Plus Protein Standard, Dual Color» (BioRad, USA), ble applisert i brønner merket «std» (grønn farge i tabell 2). Proteinene ble separert ved 200V i 1 time.

Tabell 2: Fordeling av homogenat (H) og proteinstandard (std) i brønn 1-13.

Brønn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Mengde	5µg std	10µg H	30µg H	5µg std	10µg H	30µg H	5µg std	10µg H	30µg H	5µg std	10µg H	30µg H	5µg std

3.2.3. Immunoblotting

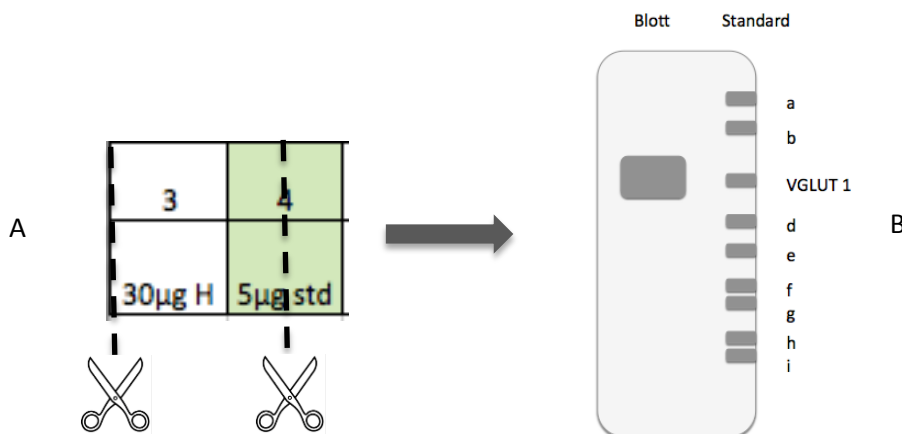
Gelen og nitrocellulosemembranen ble pakket som en «sandwich» (figur 8) med «pads» og blottepapir på hver side. Eventuelle luftbobler ble fjernet før «sandwichene» ble plassert i et blottekar. Karet ble fylt med blottebuffer, og en magnet og et kjøleelement ble lagt ned i karet. Strøm (50V) ble satt på i 2 timer under omrøring, slik at proteinene ble overført til nitrocellulosemembranen. Deretter ble nitrocellulosemembranen tørket på kleenexpapir.



kassett – «pad» – blottepapir – gel – nitrocellulosemembran – blottepapir – «pad» - kassett

Figur 8: Gel og nitrocellulosemembran pakket i en «sandwich» av blottepapir, «pads» og kassett (Cathrine Gudding, 2015).

Da nitrocellulosemembranen hadde tørket, ble den klipt opp slik at hver bit inneholdt blott av hjernehomogenatet sammen med en proteinstandard (figur 9). Uspesifikk binding ble blokkert ved å inkubere blottet i blokkeløsning på shaker i 1 time. Etter blokking ble blottene lagt i små poser med primærantistoff mot VGLUT1 (kanin anti-VGLUT1; 456-560; Synaptic Systems, fortynnet 1:1000) eller VGLUT2 (kanin anti-VGLUT2; 135-402; Synaptic Systems; fortynnet 1:1000) i blokkeløsning. Posene ble lagt på vippebrett over natten.



Figur 9: (A) Teoretisk tenkt utklipp av cellulosemembranen fra to brønner med henholdsvis 30µg homogenat (H) og 5µg standard (std) tatt ut fra tabell 2. (B) Illustrasjon av en oppklipt cellulosemembran slik det ser ut etter kjemoluminescensdeteksjon, hvor "blott" tilsvarer homogenatet og "standard" er proteinstandarden. Vi ser da at vi får ett tydelig sterkt bånd som ut i fra proteinstandarden kan leses av som spesifikk merking for VGLUT1.

Neste dag ble blottene vasket med TBST i 3 x 10 min. og inkubert med sekundærantistoff HRP-koblet esel anti-kanin IgG (NAV934V; GE Healthcare; fortynnet 1:20.000) i blokkeløsning på «shaker» i 1 time. Blottene ble vasket i TBST 3 x 10 min. før fremkalling.

3.2.4. Kjemoluminescensdeteksjon

Da blottene var ferdig rensert i TBST, ble de tørket forsiktig av mot kleenexpapir og eksponert for substratløsning (Supersignal West Dura Extended Duration Substrat, Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A.). Etter 5 min. ble blottene avbildet i Fujifilm LAS3000-imager (Fujifilm, Japan).

3.3. KJEMIKALIER OG LØSNINGER BRUKT TIL IMMUNGULLMERKING

TBST	NaCl 0,3 %, Tris 5 mM, Triton X-100 0,1 %
TBST/Glycin/Na-borohydrid	50mM glycin, 0,1 % Na-borohydrid
Blokkeløsning	2 % humant serumalbumin (HSA) i TBST
Primærantistoff	Kanin anti-VGLUT1 antistoff 456-560, fra Synaptic Systems (1:1000) Kanin anti-VGLUT2 antistoff 135-402, fra Synaptic Systems (1:1000)
Primærantistoffløsning	Antistoff (1:1000) i blokkeløsning
Blokkeløsning m/PEG 2000	Blokkeløsning med Polyethylene glycol (PEG) 2000 0,5mg/ml (48)
Sekundærantistoff	Geit F(AB)-fab anti-kanin IgG, 10nm, fra British biocell International (Cardiff UK)
Sekundærantistoffløsning	Sekundærantistoff (1:20) i blokkeløsning m/PEG2000

3.4. POSTEMBEDDING IMMUNGULLMERKING FOR VGLUT1 OG VGLUT2

Postembedding immungullmerking er en velutviklet metode for visualisering av proteiner i et vev ved hjelp av elektronmikroskopi. Denne metoden består av flere komplekse og teknikk-sensitive trinn. Innledende må vevet fikseres og dissekeres, støpes inn og deretter snittes. De ultratynne snittene legges så på en grid. Alle disse innledende prosedyrene er en del av prøveopparbeidelsen. Fiksering er vesentlig før bruk av immungullmetoden. Dette gjøres for å opprettholde cellenes morfologi i vevet, ved at proteiner og aminosyrer bevares. Valg av fiksativ og konsentrasjon er viktig fordi ulike tilsetninger fikserer ulike molekyler, og ulik konsentrasjon bevarer morfologiene i ulik grad. Innstøpning av vevet gjøres i et plastmateriale (her en akrylplast kalt Lowicryl, se nedenfor) og gjør at man får et fast vev som tåler påkjenningen av ultratynn snitting. Når vevet er blitt snittet, festes det på en grid. Vevet festes da på en hinne eller en nikkelrist omgitt av en metallring, som gjør det mulig for

oss å fysisk håndtere snittene og immunmerke dem. Etter at dette er gjort, starter selve immungullmerkingen og kontrastering, etterfulgt av deteksjon og billedtaking i elektronmikroskop, samt avsluttende analyser av bildene.

3.4.1. Prøveopparbeidelse

Fiksering og disseksjon av vevet

Perfusjonsfiksering og disseksjon av vevsbiter ble gjort av våre samarbeidspartnere i USA (Ellen Lumpkins gruppe, Columbia University, New York, USA). De er eksperter på Merkelceller og har jobbet med Merkelceller fra værhårfollikler i mange år. I korte trekk, ble brysthulen på det dypt anesteserte (anestesi: isofluran) forsøksdyret (mus) åpnet, og høyre ventrikkel punktert. En kanyle ble ført inn i venstre ventrikkel, og det ble pumpet inn fosfatbufret saltløsning (PBS; 10mM fosfatbuffer, 2,7 mM kaliumklorid og 137 mM natriumklorid, pH 7,4) ved hjelp av en peristaltisk pumpe. Deretter ble det, ved bruk av samme pumpe, tilført fiksativ: 4 % paraformaldehyd (PFA) og 0,1 % glutaraldehyd (GA). Dagen etter ble værhårsfolliklene dissekert ut. Prøvene ble sendt avkjølt til oss, og ble oppbevart ved +4 °C fram til innstøpning (se under).

Vevsinnstøpning

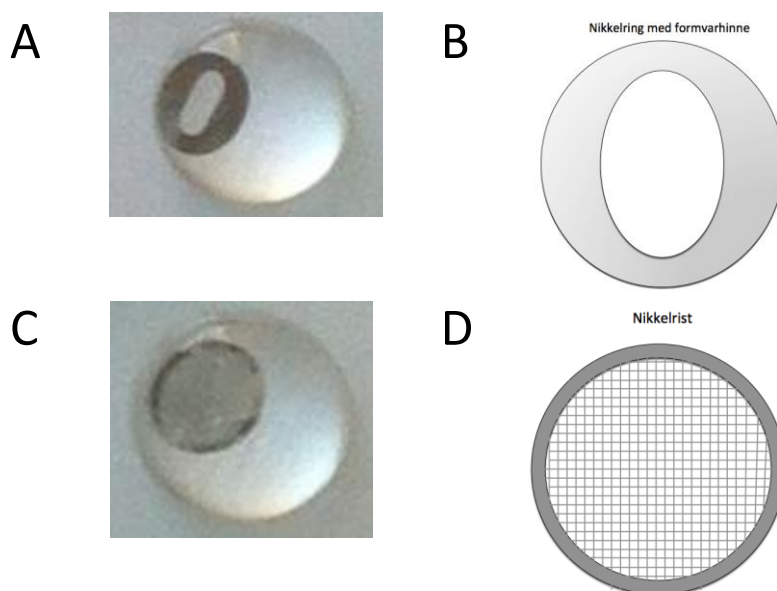
Før man kan skjære ultratynne snitt, må vevet støpes inn i et resin, som er et hardt plastmateriale. Lowicryl resin-metoden brukt for vevsinnstøpning er basert på kryssbinding av akryl- og metakrylestere. Disse esterene har egenskaper som gjør at de kan polymeriseres ved lave temperaturer, med for eksempel UV-lys. En av resintypene, Lowicryl HM20, et hydrofobt resin, har den egenskapen at den sjelden reagerer med biologisk materiale, hvilket er avgjørende for å beholde proteinenes molekylstruktur slik at epitopen(e) antistoffet binder seg til blir minst mulig forandret (49). Innstøpningen ble gjort av erfarne ingeniører ved Det medisinske fakultet, UiO.

Vevsbiter, ca. 1 x 1 x 0,5mm ble kryoprotektert i økende konsentrasjon av glyserol (10-20- 30 %) i natrium fosfat buffer. Eksponeringstidene var: en halv time i 10- og 20 % konsentrasjon (romtemperatur), og over natten i 30 % konsentrasjon (4 °C). Deretter ble de overført til flytende propan, ved -170 °C. Prøvene ble så overført i flytende nitrogen til et kammer (-90°C), hvorpå de ble eksponert for 1.5 % uranyl acetat fortynnet i vannfri metanol.

Løsningen ble helt over i Reichert kapsel og plassert i et kammer. Etter 30 timer ble temperaturen hevet stegvis, 4°C per time, fra -90°C til -45°C. Prøvene ble deretter vasket med vannfri metanol. Lowicryl HM20 resin ble infiltrert ved -45°C etter følgende oppskrift: Lowicryl/metanol (1:1) i 2 timer, Lowicryl/metanol (2:1) i 2 timer, ren Lowicryl i 2 timer og tilslutt ren Lowicryl over natten. Prøvene ble overført til nylaget Lowicryl, og Reichert kapselen, med prøven i, ble flyttet til en Lowicryl-fylt gelatinkapsel som så ble overført til etanol. Polymerisering skjedde ved bruk av UV lys etter følgende oppskrift: 24 timer ved -45°C, så økende temp til 0°C (5°C/time), og avslutningsvis 35 timer ved 0°C.

Snitting av vev og festing til grid

For å kunne studere vevsprøvene i elektronmikroskop, måtte det lages ultratynne snitt. Disse hadde en tykkelse på ca. 90nm og ble gjort av gruppens ingeniør. Det ble brukt en kuttemaskin av typen Reichert ultracuts Type702501 (Leica AG, Østerrike). Snittene ble så festet på en grid, som er en nikkelring med enten formvarhinne, kalt etthullsgrid (figur 10 A,B), eller en nikkelring med rutenett, kalt nikkelrist (figur 10 C,D). I denne studien har vi benyttet oss av begge gridtypene.



Figur 10: Bilde av to forskjellige gridtyper: (A) Bilde av en nikkelring med formvarhinne, (B) en skjematisk fremstilling av (A). (C) Bilde av nikkelrist, (D) en skjematisk fremstilling av (C).

Etter at disse trinnene ble utført satt man igjen med vevssnitt festet til gridder. Påfølgende prosedyre var inkubasjon med primære antistoffer og sekundære antistoffer med gullpartikkel, før snittene ble kontrastert, som muliggjorde analysering og kvantitering.

3.4.2. Immungullmerking

Immungullmetoden ble først beskrevet av Faulk og Taylor (50), og baserer seg på å bruke gullpartikler festet til antistoff for å merke epitoper i vevet, for senere å kunne detektere disse gullpartiklene ved hjelp av et elektronmikroskop. I elektronmikroskop vil gullpartiklene fremstå som små, men tydelige, sorte prikker i vevet på grunn av gulletts høye elektrontetthet.

Snittene ble immunmerket i henhold til postembedding immungullmetoden (48). All inkubering ble gjort på store petriskåler dekket med parafilm (figur 11). Pipetterte dråper på 50 µl av de ulike løsningene ble lagt på parafilmen. Ultratynne snitt fra værhårfollikler, festet til grid, ble plassert i dråpene ut i fra følgende oppskrift: Først ble snittene etset med hydrogenperoksid (2 % i fosfatbuffer) i 15 min., dette for å etse bort noe av Lowicrylen slik at ulike løsninger kom bedre til i vevet. Deretter ble snittene vasket i tre runder à 10 min. med rensed H₂O og inkubert med TBST tilsatt glycin (50mM) og Na-borohydrid (0,1 %) i 10 min.. Dette nøytraliserer frie aldehydgrupper, noe som reduserer bakgrunnsmerkingen (48). Snittene ble så vasket i TBST i tre omganger à 10 min., for så å bli inkubert med blokkeløsning i to runder à 10 min.. Dette trinnet reduserer også bakgrunnsmerkingen, ved at løselige proteiner i blokkeløsningen vil binde opp uspesifikke antistoffer, slik at disse ikke kan binde seg i vevet. Deretter ble snittene inkubert i primærantistoffløsning: Anti-VGLUT1 (1:1000) eller anti-VGLUT2 (1:1000). Glutamatantistoffet (Glu 607; sluttkonsentrasjon 1:10 000) var på forhånd blitt inkubert med komplekser av glutamin, aspartat og asparagin koblet til glutaraldehyd over natten, før eksponering av vevet. Blokkekomplesene ble brukt i en konsentrasjon på 0,2mM i TBST med 2 % HSA. Negative (kontroll for uspesifikk binding av sekundærantistoffene) ble behandlet nøyaktig som de andre snittene, men ble ikke eksponert for primærantistoff. I stedet ble negative lagt i blokkeløsning over natten. Neste dag ble snittene vasket i TBST fem ganger à 10 min., så overført til blokkeløsning i 10 min., deretter 10 min. i blokkeløsning med Polyetylen glycol 2000 (PEG2000), før snittene fikk stå en time i sekundærantistoffløsning (1:20 i blokkeløsning med PEG2000). PEG2000 reduserte klumping av gullpartiklene, og hindret at flere gullpartikler markerte samme

epitop (48). I dette trinnet skulle også negativene inkuberes med sekundærantistoff. Så ble snittene tilslutt vasket i rensset H₂O i fem runder à 10 min., og tørket.



Figur 11: Bilde av en petriskål dekket med parafilm. Oppå ser vi pipetterte dråper. På de to kolonnene med dråper til venstre, er det blitt plassert på gridder som er under inkubering (Cathrine Gudding, 2014).

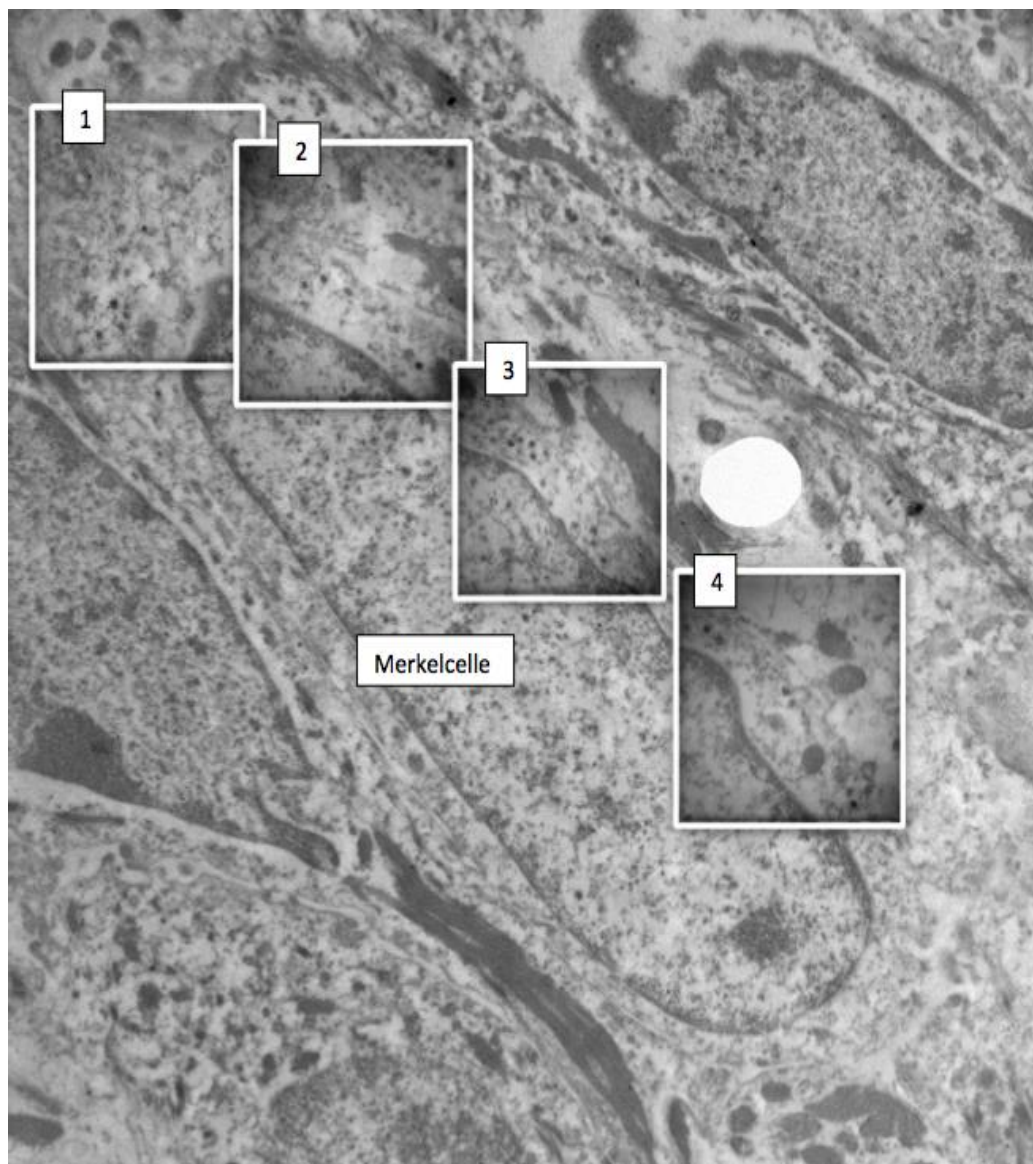
3.4.3. Kontrastering

Etter at snittene hadde tørket (minimum 1/2 time), ble de kontrastert. Først med uranylacetat (2 % løst i vann) i 15 min.. Snittene ble dekket til for å hindre lystilførsel, da uranylacetat er lyssensitivt. De ble deretter vasket i rensset H₂O i 3x10 min. og tørket. Blysitrat (0,3 %) ble først satt på sentrifugering i 2 min. for å fjerne eventuelle utfelte partikler, deretter ble snittene inkubert med blysitrat i 90 sek., skylt med rensset H₂O i 3x10 min. og til slutt tørket.

3.4.4. Elektronmikroskopi

For å undersøke snittene brukte vi et elektronmikroskop av typen «Tecnai 12 biotwin». Med en forstørrelse på 43000x kunne man detektere gullpartikler i Merkelceller, for senere å kunne analysere disse videre. Merkelceller ble gjenkjent som celler med lappedelt kjerne og «dense core»-vesikler i sitt cytoplasma. Disse lå innimellom keratinocytter langs basalmembranen, hvor disse cellene sammen dannet en rekke (figur 12). De fleste av disse

dannet synaptisk kontakt med en nerve. Bildene brukt i analysen ble tatt med forstørrelse på 43000 x, og det ble tatt bilder systematisk av de delene av cellens cytoplasma som inneholdt «dense core»-vesikler. Dette samsvarte som regel med den delen av cellen som lå mot et akson. Det ble kontrollert at ingen gullpartikler eller vesikler ble analysert flere ganger, ved å sammenligne et oversiktsbilde av hele Merkelcellen (tatt med lavere forstørrelse), med alle bilder som skulle brukes i analysen, som var tatt med høyere forstørrelse (figur 12). Eventuelle områder som forekom i flere bilder ble kun analysert én gang.



Figur12: Her ser vi i bakgrunnen et stort oversiktsbilde av en Merkelcelle. Innsatt over dette oversiktsbildet er fire små bilder (henholdsvis bilde 1,2,3 og 4), tatt med høyere forstørrelse (43000x), som representerer de bildene som analysene ble gjort på. Bilde merket 1,2,3 og 4 ble på denne måten kontrollert for å hindre overlappinger og dobbeltanalyseringer. Tilsvarende ble gjort for alle celler som ble analysert (Cathrine Gudding, 2015).

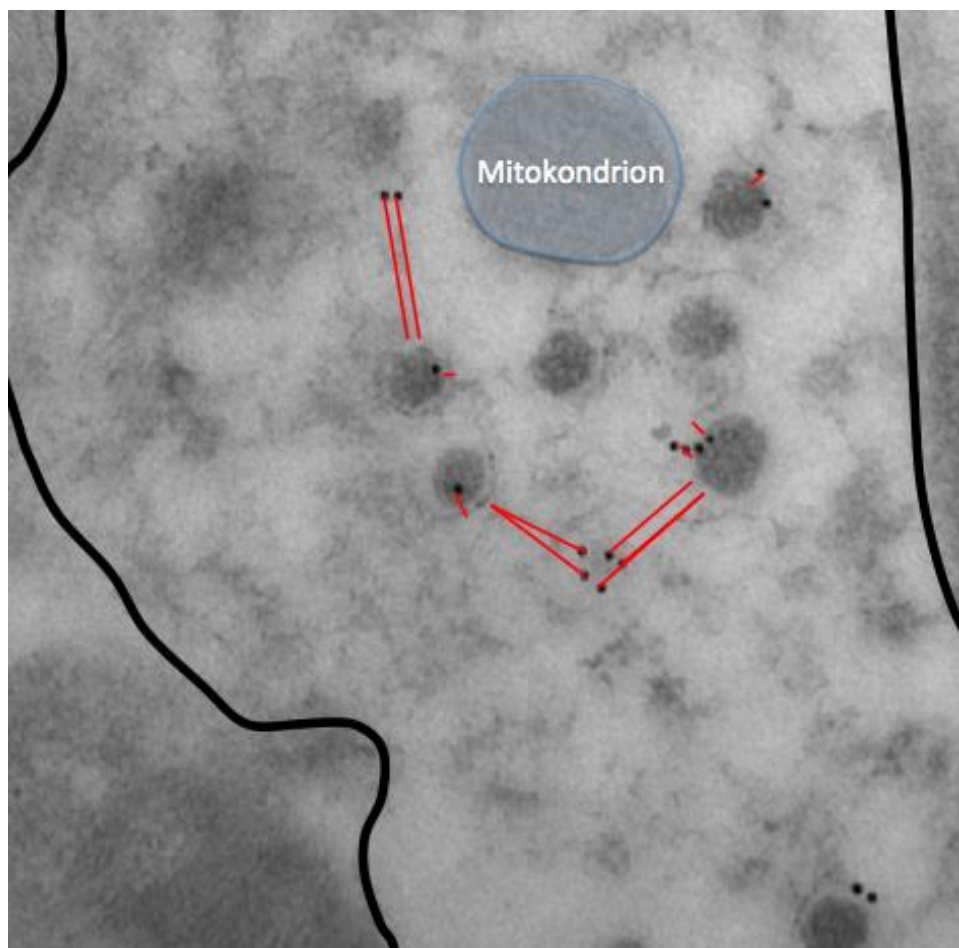
3.4.5. Kvantitative analyser

Med dataprogrammet «ImageJ» har vi utført den kvantitative analysen av bildematerialet for å finne ut om VGLUT 1 og VGLUT2 var assosiert med «dense core»-vesikkelmembraner. En «plugin» for «ImageJ» (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ble brukt for å angi Merkelcellens plasmamembran og mitokondrienes yttermembran (mitokondrier samt partikler over disse er ikke tatt med i analysen). Tilfeldige punkter («random points») ble plassert over mikroskopbildene (51) og analysert på samme måte som gullpartiklene. Bildematerialet bestod av totalt 7 Merkelceller, hvorav 3 celler var merket for VGLUT1 (1:1000) og 4 celler merket for VGLUT2 (1:1000). Celler merket for VGLUT1 og VGLUT2 bestod av henholdsvis 16 og 18 unike bilder. Til sammen ble det registrerte 318 gullpartikler, mot 495 «random points». Fordelingen er satt opp i tabellen under (tabell 3).

Tabell 3: Oversikt over antall gullpartikler og «random points» fordelt på Merkelceller merket for henholdsvis VGLUT1 og VGLUT2.

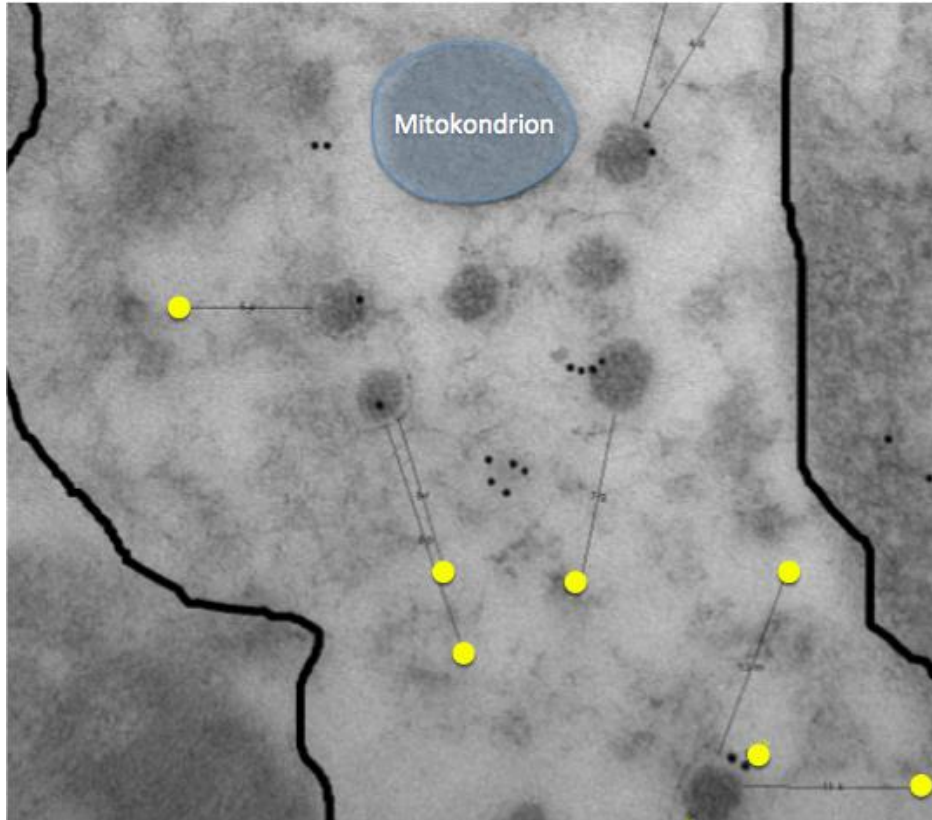
	Gullpartikler	«Random points»
VGLUT1	185	269
VGLUT2	133	226

Selve analysen av materialet bestod av å måle avstanden mellom hver enkelt gullpartikkel (i cytoplasmaet til en Merkelcelle) og nærmeste «dense core»-vesikkelmembran, som vist på figur 13 nedenfor. Vi utelot gullpartikler som befant seg over mitokondrier og i Merkelcellekjernen.



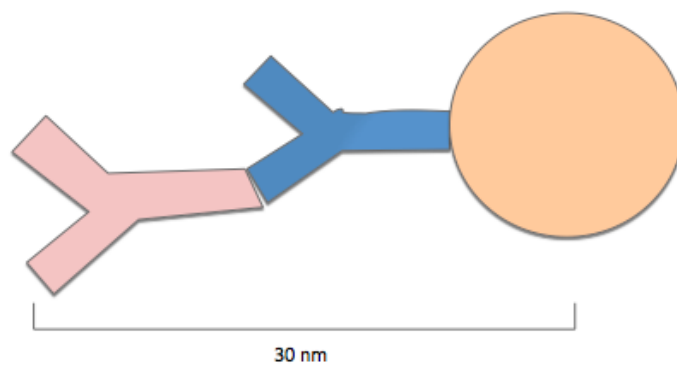
Figur 13: Måling av avstand (rød strek) mellom senter av gullpartikkel (sort prikk) til nærmeste «dense core»-vesikkelmembran. De gullpartiklene som lå akkurat på membranen ble målt til 0nm. De svarte tykke strekene på høyre og venstre side i figuren representerer avgrensning av Merkelcellens cytoplasma (Cathrine Gudding, 2015).

Deretter ble det på samme bildet satt på randomiserte punkter, «random points». Det ble brukt 40 tilfeldige punkter per bilde, slik at antall tilfeldige punkter var tilnærmet likt eller større enn antall gullpartikler. De samme avstandsmålingene ble gjort mellom hver «random point» og nærmeste vesikkelmembran (figur 14). Også her ekskluderte vi punkter over kjernen og mitokondrier. Målingene som ble gjort, fra både gullpartiklene og «random points», ble lagt inn i hver sin frekvenstabell, og ut i fra denne tabellen laget vi en fordelingskurve for gullpartikler og for «random points» (figur 18 og 19).



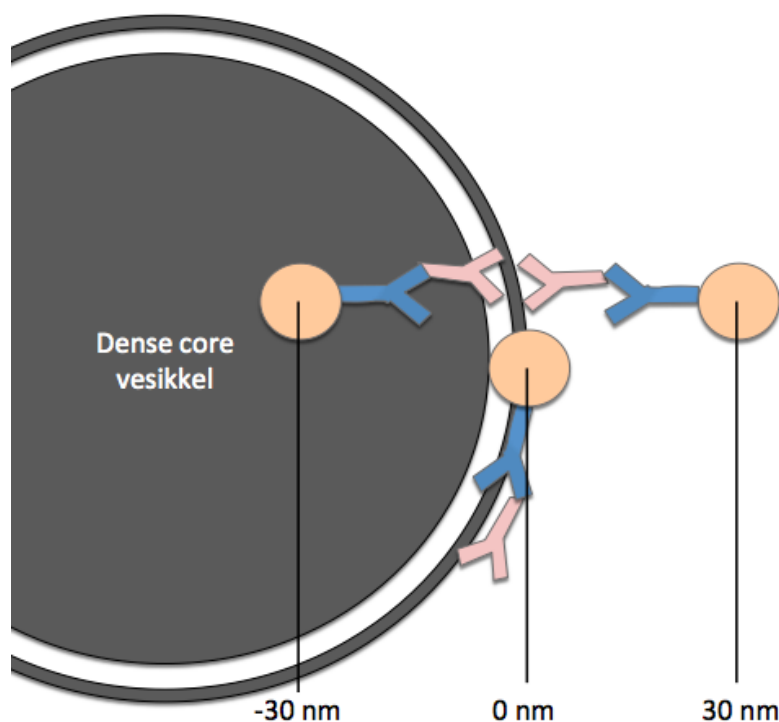
Figur 14: Måling av avstand (sort tynn strek) mellom «random points» (gul) og nærmeste «dense core»-vesikkelmembran. Her er randomiserte punkter tydeliggjort med gule rundinger, da de datainnsatte punktene ikke kommer tydelig fram på bildet (Cathrine Gudding, 2015).

Basert på lengden til antistoffene og radius av gullpartikkelen, kan vi beregne at teoretisk distanse mellom epitopen (her glutamattansportører i vesikkelmembranen) og sentrum av gullpartikkelen er $\sim 23\text{nm}$. Men i praksis, ser man at avstanden ofte er $\sim 30\text{ nm}$ (for diskusjon, se (48, 52-54)) (figur 15).



Figur 15: Skjematisk tegning av et antistoffkompleks. Rosa; primærantistoff, Blå; sekundærantistoff med gul; gullpartikkel festet på seg (Cathrine Gudding, 2015).

Det betyr at sentrum av en gullpartikkel i prinsippet kunne befinne seg i alt fra 30nm på innsiden av en vesikkelmembran til 30nm utenfor vesikkelmembranen, og fortsatt representere epitoper i membranen (figur 16).



Figur 16: Teoretisk framstilling av gullpartikler som markerer en tenkt epitop i vesikkelmembranen. Gitt lengden på antistoffkomplekset, kan en gullpartikkel befinne seg i alt fra -30nm, på innsiden av «dense core»-vesikkelen, til 30 nm på utsiden av vesikkelen (Cathrine Gudding, 2015).

For gullpartikler som befant seg på innsiden av vesiklene, ble avstanden angitt som et negativt tall, mens avstander på utsiden av vesikkelen ble angitt som positive (figur 16). Partikler som var distribuert fra -30nm til +30nm ble derfor betraktet som potensielt tilhørende vesikkelmembranen.

3.4.6. «Test-sandwich»

Aminosyrer er for små til å separeres ved bruk av konvensjonell Western blotting, og vi måtte derfor benytte et annet testsystem for å undersøke spesifisiteten til glutamatantistoffet. Til dette formålet har vi et snitt av en «test sandwich» som vi inkuberte sammen med vevssnittene under immunmerkingen. «Test sandwich» bestod av tynne lag av aminosyre-glutaraldehyd-hjerneprotein-komplekser med tynne lag av hjernevev i

mellom. Spesifikk merking indikeres av at det er høy tetthet av gullpartikler over komplekset som inneholder den aminosyren antistoffet er rettet mot (her: glutamat), og lite eller ingen merking over de andre aminosyre-kompleksene.

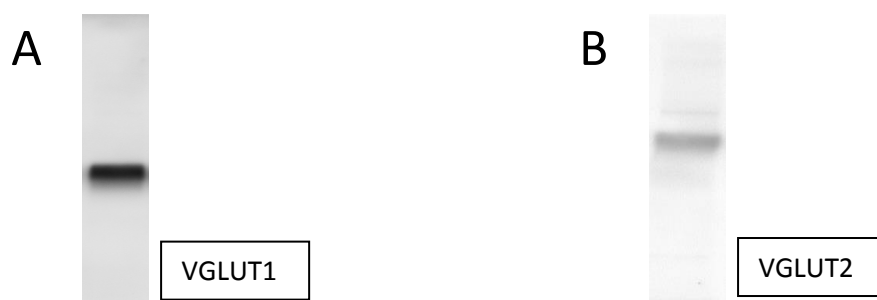
3.5. STATISTIKK

Distansen mellom sentrum av hver gullpartikkel som representerte VGLUT1-merking og nærmeste «dense core»-vesikkelmembran ble sortert i «bins». Det samme ble distansen mellom tilfeldige punkter og nærmeste «dense core»-vesikkelmembran. Deretter ble de to distribusjonene sammenlignet statistisk med «Pearson Chi square test» (Minitab). På samme måte ble gullpartikler som representerte VGLUT2 sammenlignet med distribusjonen av tilfeldige punkter. Forskjeller som ga en p-verdi $\leq 0,05$ (mindre enn 5 % sannsynlighet for at den observerte forskjellen skyldes tilfeldig variasjon) ble betraktet som statistisk signifikant.

4. RESULTATER

4.1. TESTING AV VGLUT1- OG VGLUT2-ANTISTOFF MED WESTERN BLOTTING

Western blott med VGLUT1-antistoffet viser et tydelig bånd ved ca. 60KDa (figur 17 A), som stemmer med den oppgitte molekylvekten for VGLUT1. Blottet viser ingen tilleggsbånd, noe som indikerer at antistoffet har høy spesifisitet. Tilsvarende viste Western blott for VGLUT2 et tydelig bånd ved 65KDa (figur 17 B), som samsvarer med oppgitt molekylvekt for VGLU2.. Her ser vi noen tilleggsbånd, men disse er langt svakere enn hovedbåndet, noe som indikerer at antistoffet mot VGLUT2 er av høy spesifisitet.

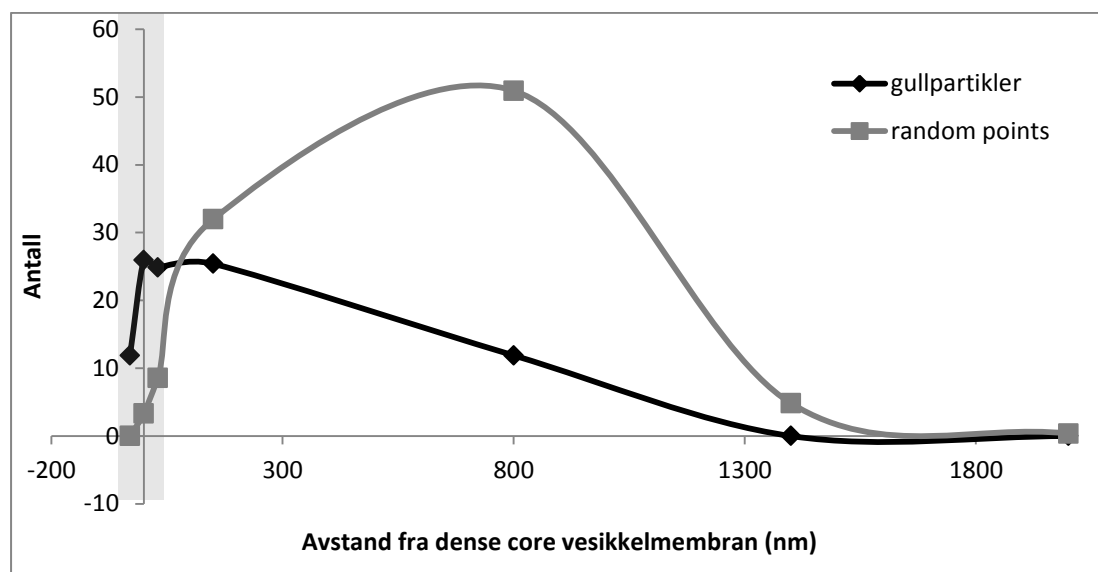


Figur 17: Western blott av VGLUT1 (A) viser tydelig bånd ved ca. 60KDa. Western blott av VGLUT2 (B) viser tydelig bånd ved ca. 65KDa, samt noen svake tilleggsbånd.

4.2. ASSOSIASJON MELLOM VGLUT1-MERKING OG «DENSE CORE»-VESIKLER I MERKELCELLER

Kvantitative analyser av avstand mellom gullpartikler som representerte VGLUT1 og nærmeste «dense core»-vesikkelmembran, viste at VGLUT1 var assosiert med «dense core»-vesikler. Avstanden fra intravesikulære partikler til vesikkelmembranen presenteres som negative verdier, mens avstanden til ekstravesikulære partikler presenteres som positive verdier. For VGLUT1-gullpartiklene var 63 % lokalisert innenfor ± 30 nm fra vesikkelmembranen (figur 18), hvilket representerer partikler som kan være bundet til vesikkelmembranen, jamfør metodens spatiale oppløsning. Til sammenligning var bare 12 % av tilfeldige punkter assosiert med vesikkelmembranen (figur 18). Dette viser at VGLUT1 var

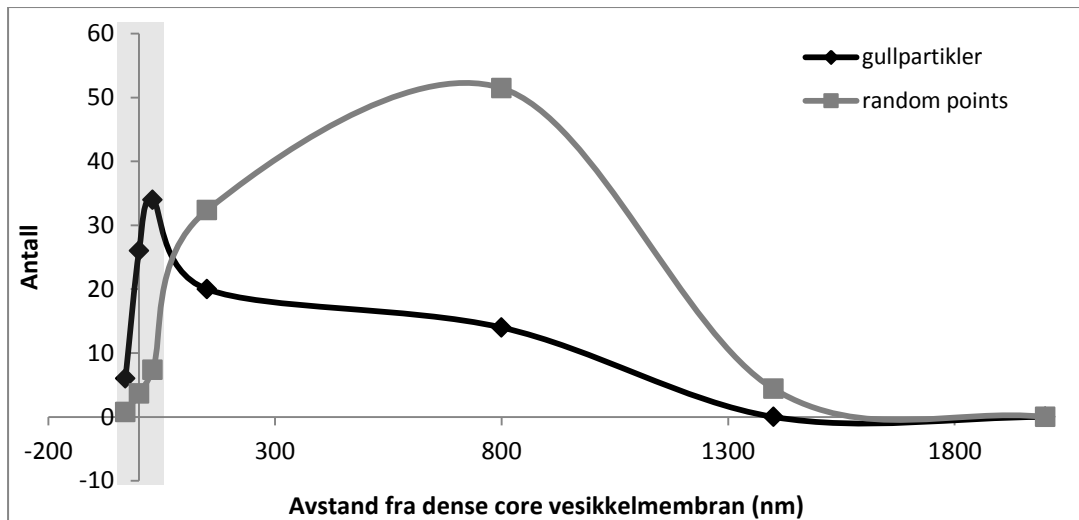
assosiert med «dense core»-vesikler i langt større grad enn «random points» var ($p \leq 0,0005$; «Pearsons Chi-square test» (MiniTab)), hvilket tyder på at «dense core»-vesikler har VGLUT1 i membranen.



Figur 18: Viser antall VGLUT1-gullpartikler (svart linje) og tilfeldige punkter (grå linje) plottet mot avstanden fra nærmeste «dense core»-vesikkelmembran. Lysegrått område på y-aksen illustrerer metodens spatiale oppløsning, slik at punkter som befinner seg innenfor dette området (± 30 nm fra membranen) kan betraktes som membranbundet.

4.3. ASSOSIASJON MELLOM VGLUT2- MERKING OG «DENSE CORE»-VESIKLER I MERKELCELLER

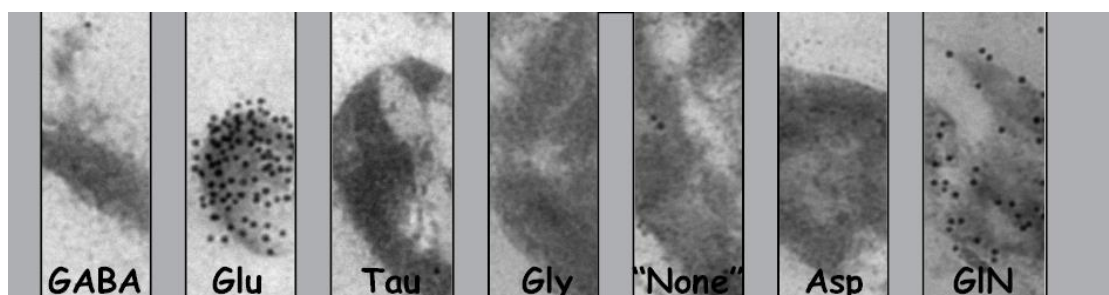
Gullpartikler som representerte VGLUT2 var også nært assosiert med «dense core»-vesikkelmembran: Avstanden fra gullpartikkel til nærmeste «dense core»-vesikkelmembran ble målt som negative verdier dersom partikkelen befant seg på vesikkelens innside, og positiv hvis partikkelen var ekstravesikulære. Vi fant at 66 % av partiklene som representerte VGLUT2 var lokalisert innenfor ± 30 nm fra vesikkelmembranen (svart linje i figur 19), hvilket representerer partikler som kan være bundet til vesikkelmembranen, jamfør metodens spatiale oppløsning. For tilfeldige punkter var bare 12 % av punktene assosiert med vesikkelmembranen (figur 19). Dette viser at VGLUT2 var assosiert med «dense core»-vesikler i langt større grad enn tilfeldige punkter var ($p \leq 0,0005$; «Pearsons Chi-square test» (MiniTab)), hvilket tyder på at «dense core»-vesikler har VGLUT2 i membranen.



Figur 19: Viser antall VGLUT2-gullpartikler (svart linje) og tilfeldige punkter (grå linje) plottet mot avstanden fra nærmeste «dense core»-vesikkelmembran. Lysegrått område på y-aksen illustrerer $\pm 30\text{nm}$ fra membranen, hvilket er metodens spatiale oppløsning. Punkter som befinner seg innenfor dette området kan derfor betraktes som membranbundet.

4.4. GLUTAMATMERKING AV «SANDWICH»-SNITT

Merking for glutamat på «sandwich»-snitt viser høy konsentrasjon av gullpartikler over glutamat (Glu) (Figur 20). Vi ser tilnærmet ingen merking over komplekser som inneholder gamma-aminosmørsyre (GABA), taurin (Tau), glysin (Gly), aspartat (Asp), eller kompleks som ikke inneholdt aminosyre («None»). Derimot ser vi noe merking over komplekser som inneholder glutamin (GIN), men merkingen var langt svakere enn over komplekset som inneholdt glutamat.



Figur 20: Immungullmerking av «test sandwich». En «test sandwich» inneholder komplekser av GABA, glutamat (Glu), taurin (Tau), glysin (Gly), ingen aminosyre («none»), aspartat (Asp) og glutamin (GIN), bundet til hjerneprotein med glutaraldehyd, separert av tynne lag av hjernevev (grå).. Disse ble merket med glutamatantistoff sammen med snittene av værhårfollikler.

4.5. GLUTAMATEMERKING AV MERKELCELLER

Til tross for flere forsøk på å merke værhårfollikler med glutamatantistoffet, fikk vi tilnærmet ingen immungullmerking for glutamat i dette vevet. Dette til tross for at vi økte konsentrasjonene av antistoffet til 1:3000 (normal konsentrasjon i hjernevev er mellom 1:10.000 og 1:60.000). Høyere konsentrasjoner kunne vi ikke bruke, da vi så kryssreaktivitet med glutamin ved 1:3000-fortynningen (se avsnitt 3.4.6 «test sandwich» overfor), selv etter preabsorpsjon med glutamin-GA-komplekser som beskrevet. Glutamatmerkingen lot seg derfor ikke kvantitere.

5. DISKUSJON

5.1. METODISKE BETRAKTNINGER

Bruk av elektronmikroskopisk analyse av postembedding immunogullmerking, for lokalisering av VGLUT1 og VGLUT2 i «dense core»-vesikler i Merkelceller, er en fremragende og godt etablert metode, skreddersydd for denne typen forskning. Metoden muliggjør påvisning og kvantitering av spesifikke proteiner i et vev. For de analysene som presenteres i denne oppgaven, er elektronmikroskopi den eneste teknikken som gir høy nok spatial oppløsning til å kunne detektere proteiner i relasjon til vesikler. Men samtidig er det viktig å ha *in mente* at prosedyren er svært teknikk sensitiv og begrensede faktorer må tas hensyn til ved tolkning av resultatene. I de neste avsnittene vil jeg diskutere metodene jeg har brukt, samt hvilke tiltak som ble gjort for å sikre at dataene som framkommer er pålitelige.

5.1.1. Antistoffenes spesifisitet

Ved bruk av immunocytochemisk metode, slik som i denne oppgaven, vil antistoffenes spesifisitet i stor grad bestemme kvaliteten på resultatene. Det er viktig at antistoffene man bruker blir grundig kontrollert, slik at merkingen man analyserer i størst mulig grad representerer den biologisk sanne distribusjonen av epitopen (antigenet) i vevet.

Spesifisitetstesting av antistoffer mot proteinene VGLUT1 og VGLUT2

Selv om antistoffene er laget ved å immunisere dyr med deler av aminosyresekvensen i det proteinet man er interessert i, finnes det allikevel en mulighet for at antistoffene kan gjenkjenne andre proteiner som inneholder samme eller lignende aminosyresekvens, eller av andre grunner har en liknende struktur et sted på sin overflate, og dermed kan binde seg til disse. Vi har spesifisitetstestet våre antistoffer mot VGLUT1 og VGLUT2 ved hjelp av Western blotting, og begge antistoffene ga ett tydelig bånd ved riktig molekylvekt (figur 17). Dette båndet var langt sterkere enn eventuelle tilleggsbånd, noe som tyder på at antistoffene har høy selektivitet. Det at antistoffene merket over Merkelceller og lite over naboceller, styrket vårt inntrykk av at antistoffene var spesifikke. Det vil alltid være vanskelig å unngå all uspesifikk merking, og i vårt forsøk så vi svak merking også over mitokondriemembraner, hvor de vesikulære transportørene ikke er lokalisert. Denne type uspesifikk merking er et kjent problem for mange antistoffer ved postembedding

immungullmetoden, og har sammenheng med at mitokondrier er svært proteinrike og derfor får mye uspesifikk merking som skyldes protein-protein-interaksjon utenom antistoff-antigen-interaksjonen. Bruk av blokkeløsning (se tidligere avsnitt) reduserer denne merkingen, men det var fremdeles en svak merking over mitokondrier i denne studien. Gullpartikler over mitokondrier ble ekskludert ved kvantitering og analyse av materialet.

Spesifisitetstesting av antistoffer mot aminosyren glutamat

Antistoffene mot aminosyren glutamat er produsert ved å immunisere kaniner med glutamat festet til et bærerprotein (BSA) ved hjelp av glutaraldehyd (GA). Min biveileder, Jon Storm-Mathisen, var den første som klarte å lage antistoffer mot aminosyrer (38) på denne måten, og antistoffet mot glutamat, som ble brukt i denne studien, er produsert i vårt laboratorium, og har blitt grundig testet i tidligere studier (55-57). Glutamatantistoffene ble behandlet med komplekser av aspartat, glutamin og asparagin bundet til GA over natten, før de ble benyttet til immunmerking. Dette gjorde vi for å absorbere bort eventuelle antistoffer som kunne kryssreagere med andre aminosyrer. Antisera inneholder flere ulike antistoffmolekyler med ulik affinitet for ulike bindingssteder.

Glutamatantistoffet ga sterk merking over komplekser som inneholdt glutamat, og lite merking over komplekser med de andre aminosyrene, noe som indikerer god selektivitet i antistoffet. Imidlertid så vi noe merking over komplekset som inneholdt glutamin, til tross for at antistoffet var forbehandlet med glutamin-komplekser som beskrevet, men tettheten av gullpartikler over glutamin-kompleksene var mye lavere enn merkingen over glutamatkompleksene. Kryssreaktiviteten med glutamin i denne immunmerkingen gjorde at vi ikke kunne øke konsentrasjonen av antistoffet ytterligere, selv om dette kunne være ønskelig for å få bedre merking for glutamat i Merkelcellepreparatene. I hjernevevet, hvor vi vet at glutamat er oppkonsentrert i presynaptiske nerveterminaler, så vi akkumulering av gullpartikler over disse strukturene, og lav merking over de postsynaptiske elementene, noe som igjen tyder på stor grad av spesifisitet. Videre så vi lite merking over astrocytter i hjernen, der man vet at glutamin produseres fra glutamat.

5.1.2. Fiksativ og fikseringsmetode

Vevet som er brukt i denne studien er fiksert ved hjelp av perfusjonsfiksering, som innebærer at fiksativet pumpes inn i hjertet på det dypt anesteserte forsøksdyret, og dermed hurtig kommer ut i alle organer, helt på cellenivå. Alternativet til denne

fikseringsmetoden er immersjonsfiksering, hvor vevet først blir dissekert ut fra forsøksdyret, for så raskt å bli overført til en fikseringsløsning. Av disse to typene er det perfusjonsfiksering som gir best morfologi.

Vevet var fiksert med en blanding av paraformaldehyd (PFA; 4 %) og glutaraldehyd (GA; 0,1 %). Dette er optimalt for merking av proteiner med immungullmetoden, selv om en høyere konsentrasjon av GA ville gitt bedre morfologi. I vår studie fikk vi god merking med antistoffene rettet mot VGLUT1 og VGLUT2. Vi kunne imidlertid ikke detektere glutamat i «dense core»-vesikler, noe som kan skyldes at lav GA (0,1 %) normalt gir lav merkingsgrad ved bruk av antistoffer mot aminosyrer. Som nevnt over, er glutamatantistoffet laget mot GA-bundet aminosyre, og vil derfor primært gjenkjenne glutamat som er bundet til GA i vevet. Ved lav GA, vil konsentrasjonen av denne epitopen være svært lav, og derfor vanskelig å detektere over bakgrunnen. Optimalt for aminosyrer er fiksering med 2,5 % GA, men dette er ikke kompatibelt med deteksjon av proteiner. Etersom hovedfokuset for denne studien var å avklare hvorvidt de vesikulære transportørene VGLUT1 og VGLUT2 var tilstede i vesikler i Merkelceller, ble vevet fiksert med tanke på dette. For å avklare om glutamat finnes i Merkelcellenes «dense core»-vesikler, måtte vi ha fiksert nytt vev spesielt med tanke på aminosyremerking, men dette var utenfor denne oppgavens omfang.

5.1.3. Forholdet mellom epitoptetthet og antall gullpartikler

Selv om immuncytokjemisk merking av proteiner er den optimale metoden for kvantitativ analyse av spesifikke proteiner i bestemte cellulære og subcellulære strukturer, vil aldri mengden gullpartikler tilsvare antall proteiner. Man får altså aldri 100 % binding. Dette vil bety at også vesikler som ble analysert til å være uten merking i denne studien, allikevel kan inneholde de proteinene vi merket for.

Valg av grid kan være av betydning. Normalt kan man legge vevet på små nikkellerister som gir mulighet for antistoffbinding på begge sider av snittet, men vår erfaring var at snittene som ble brukt i denne studien var svært skjøre og ble ødelagt i elektronmikroskopet. I denne studien har vi brukt begge typer gridder. For merking av VGLUT1 og VGLUT2 brukte vi nikkellerister, mens vi for glutamatmerkingen ble vi nødt til å bruke ultratynne vevssnitt lagt på små nikkelleringer (etthullsgridd), hvor den ene siden var dekket av formvarhinne. Etthullgridder ble brukt på grunn av at snittene var svært skjøre (disse hadde ligget lenger etter snitting fram til immunmerking), og lett ble ødelagt i elektronmikroskopet. En annen grunn til å bruke etthullsgridder er at det er lettere å få

bilder av relativt sjeldne motiver, fordi viktige deler ikke blir dekket av trådene som er karakteristiske for en nikkelrist. Den gjør også snittet mer stabilt, men hindrer antistoffene i å binde vevet fra den siden hinnen ligger på, og kan dermed gi mindre merking. I tillegg til er vesiklene snittet og merking kan kun skje i overflaten av snittet. VGLUT-proteinene som sitter på andre deler av vesikkelmembranen enn den som eksponeres i snittets overflate, vil derfor ikke merkes. Til sammen gjør dette at merkingsgraden blir lavere enn den egentlige tettheten av proteinet i vevet.

5.1.4. Kvantitering og kvantitativ analyse

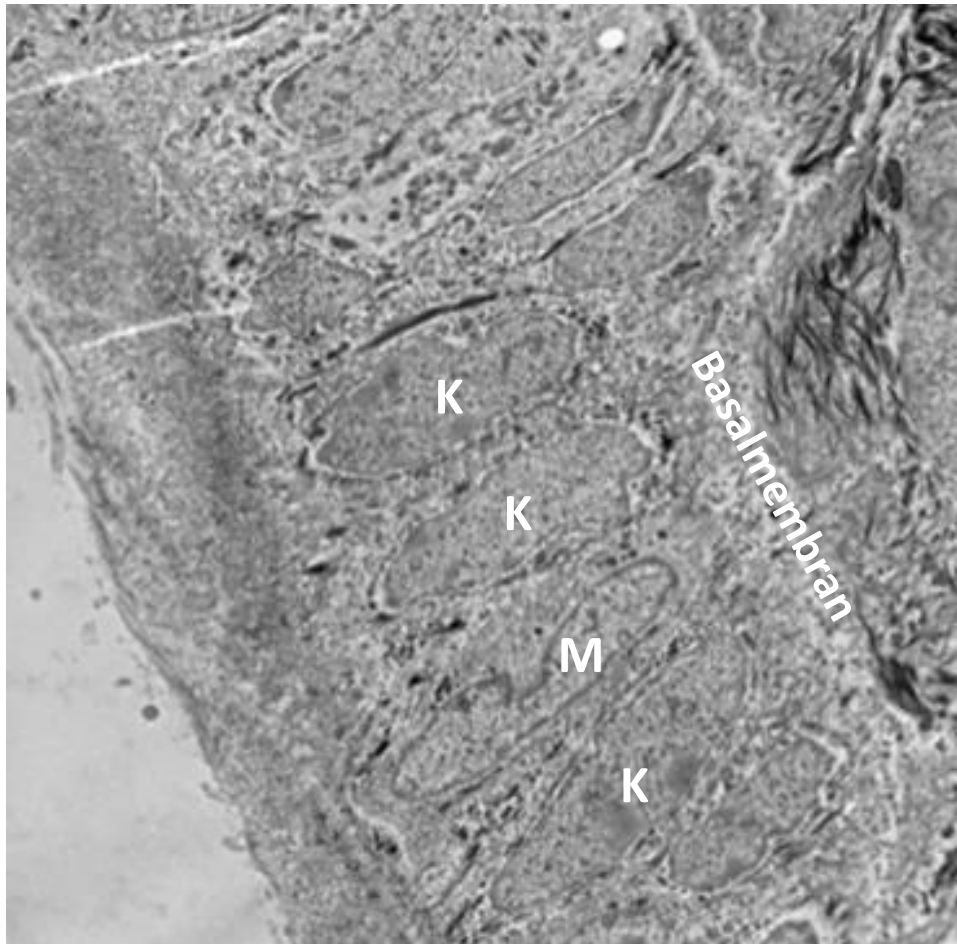
Selv om elektronmikroskopi er en utmerket måte å analysere vev på, og den eneste metoden som gir høy nok oppløsning til å detektere proteiner i relasjon til vesikler, må resultatene tolkes med forsiktighet. Både snittene og bildene vi tok, representerer todimensjonale bilder av virkeligheten. Dermed vil det alltid være noe informasjon som forsvinner. På bakgrunn av dette, vet vi at det som tilsynelatende ser ut som uspesifikk merking ikke nødvendigvis er uspesifikk, men merking som kan tilhøre strukturer som ikke kan identifiseres i bildet/snittet. Vi har i vårt kvantitative arbeid valgt å måle avstanden mellom en gullpartikkel og den nærmeste tydelige «dense core»-vesikkelen. I materialet ser vi noen mindre, runde membranstrukturer uten tydelig tett kjerne (for eksempel, ved de fem gullpartikler, midt på bildet i figur 13 og 14). Disse kan representere «dense core»-vesikler som er snittet slik at kun membranen og den ytterste (lite elektrontette) delen kommer med i snittet, mens det meste av den elektrontette kjernen ikke er med. Slike strukturer er ikke tatt med i analysene, slik at den reelle middellavstanden mellom gullpartikkel og «dense core»-vesikkel kan være kortere enn den som angis i denne studien. Imidlertid har vi i våre avstandsmålinger sammenlignet avstanden mellom gullpartikkel og nærmeste vesikkel, med avstanden mellom tilfeldig plasserte punkter («random points») og nærmeste vesikkel. Vi ser helt entydig at VGLUT1 og VGLUT2 partikler i større grad er assosiert med «dense core»-vesikler, enn tilfeldige plasserte punkter er.

I litteraturen er det også snakk om en type vesikler som kalles «synaptic like vesicles» (SLV) som man ser i flere ikke-nevronale celler (for eksempel, se (58)). Disse er mindre enn «dense-core»-vesikler, og mangler den elektrontette kjernen. De ligner derfor i størrelse og utseende de vesiklene som er ansvarlige for frisetting av transmitterglutamat fra nerveterminaler. Det er usikkert om SLV finnes i Merkel-nevritt-komplekset. Noen av de små membranstrukturene vi så i Merkelcellenes cytoplasma (se overfor) kan samsvare i størrelse

og fasong med slike vesikler, men de er få og finnes spredt i cellen. Uten en god markør er det ikke mulig å fastslå om dette er vesikler eller om det er fragmenter av andre membranomsluttede organeller, det være seg «dense core»-vesikler eller annet. Binding over slike organeller vil i denne studien oppfattes som uspesifikk merking, siden strukturene vanskelig kan detekteres som «dense core»-vesikler i EM.

5.1.5. Kriterier for å gjenkjenne Merkelceller ved elektronmikroskopi

I denne studien gjenkjente vi Merkelceller kun basert på deres morfologiske kjennetegn, altså uten bruk av markører. Man må derfor ha noen kriterier som absolutt minimumskrav før man kan kalle en celle for Merkelcelle. Merkelceller er en celletype det ikke er store mengder av i snittene og de kan variere i lokalisering alt etter hvordan værhaarfolliklene ble snittet. I denne studien ble Merkelceller gjenkjent som avlange celler, som sammen med keratinocytter, dannet en rekke av celler rett ved basalmembranen (figur21). De hadde en stor, elektrontett kjerne omgitt av et lite cytoplasma. Invaginasjoner på kjernen/cytoplasmamembranen, samt tydelige «dense core»-vesikler i cytoplasmaet kunne også sees. Alle disse kriteriene måtte være oppfylt for at cellen kunne inkluderes i denne studien. Mange av cellene hadde dessuten nær relasjon til et akson, som kunne gjenkjennes ved mange mitokondrier i et klart (lite elektrontett) cytoplasma. Det siste ble ikke benyttet som et inklusjonskriterium, ettersom vi vet ut i fra litteraturen at ikke alle Merkelceller er i assosiasjon med en nerveende, og at aksonet, som er tynt i forhold til Merkelcellen, ofte ikke er med i snittet som observeres.



Figur 21: Merkelcelle (M) og keratinocytter (K) som sammen danner en rekke av celler rett ved basalmembranen (Cathrine Gudding, 2015)

5.2. TOLKNING AV RESULTATER

Denne studien gir de første immungull-elektronmikroskopiske data for at Merkelceller har vesikulære glutamattransportører, VGLUT1 og VGLUT2, assosiert med sine «dense core»-vesikler. Ved hjelp av kvantitativ immungullmerking viser vi at Merkelceller har det vesikulære maskineriet for å pumpe glutamat inn i «dense core»-vesikler. Dette indikerer at Merkelceller kan kommuniserer med de perifere nervene, eventuelt med andre omkringliggende celler, ved hjelp av glutamat. Dette støttes av nyere litteratur fra lysmikroskopiske analyser (18). En studie har forsøkt å gjøre preembedding elektronmikroskopi for VGLUT2, men på grunn av metodologiske problemer ble disse resultatene vanskelig å tolke og gav ingen konklusive svar (59).

For endelig å bevise at glutamat er et signalmolekyl (transmitter) i Merkel-nevrittkomplekset, trengs ytterligere data. Direkte bevis for tilstedeværelse av glutamat i «dense

core»-vesiklene, slik vi forsøkte å finne i denne studien, vil være viktig. I tillegg mangler fortsatt fysiologiske studier som viser glutamatfrigjøring fra Merkelceller, og eventuelt aktivering av glutamatreseptorer på den postsynaptiske cellene. Denne masteroppgaven legger derfor til rette for ytterligere undersøkelser av Merkelcellenes normale signalering, samt hvordan disse cellene påvirkes ved sykdom.

6. FREMTIDIGE ASPEKTER

For videre studier av Merkelceller, og for i ennå større grad å kunne bygge opp under våre funn, vil det være naturlig å se på vev fiksert med høy glutaraldehyd. Det kan gi mulighet for å påvise glutamat i «dense core»-vesikler. Det gir samtidig muligens god nok morfologi til å se etter SLV.

Videre vil det også være naturlig å se på Merkelceller i oralt vev og verifisere at også disse har VGLUT1 og VGLUT2. Det ville også vært spennende å se på orale Merkelceller etter f.eks. kroniske infeksjon for å se om de blir flere i antall, og om disse eventuelt har endret mengde VGLUT1 eller VGLUT2, eventuelt endret vesikkeltetthet, som i så fall kunne indikere at de var mer/mindre aktive i signaleringen som respons på infeksjonen.

7. KONKLUSJON

Merkelceller er mekanosensitive celler. I oralt vev har man sett at Merkelcellene øker i antall ved bl.a. tannløshet, inflammasjon og munnhulekreft. Hva som er Merkelcellens funksjon i oralbiologien, og hvordan den samspiller med andre celler, er fortsatt i stor grad ukjent. Som et ledd i å forstå Merkelcellens funksjon har vi sett på en del av «verktøyet» disse cellene har til å kommunisere med vevet omkring seg. I denne studien gir vi de første immunogullanalysene av vesikulære glutamattansportører i Merkelceller i værhårfollikler. Vi påviser at disse cellene inneholder både VGLUT1 og VGLUT2 i membranen på «dense core»-vesikler. Ut fra dette er det sannsynlig at vesiklene tar opp glutamat og at glutamat videre blir brukt som transmitterstoff over synapser mellom Merkelcellene og nærliggende aksoner. Siden vi vet at det finnes Merkelceller i oralt vev, vil det være naturlig å tro at Merkelcellene her har de samme basale funksjoner som Merkelceller i værhårfollikler, men man kan ikke utelukke at cellen også har andre funksjoner. Det at Merkelcellen øker i antall ved forskjellige tilstander i munnhulen, tyder på en eller flere roller i sykdomsutvikling, reparasjonsreaksjoner eller kompensasjonsmekanismer. Resultatene fra denne masteroppgaven bringer oss ett steg nærmere forståelsen av Merkelcellens funksjon, og dens samspill med omkringliggende celler.

8. REFERANSER

1. Lindemann B, Ogiwara Y, Ninomiya Y. The discovery of umami. *Chemical senses*. 2002;27(9):843-4.
2. Wikipedia. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:L-Monosodium_Glutamate.svg [cited 2015 27.03].
3. Merkel FS. Tastzellen und Tastkörperchen bei den Hausthieren und beim Menschen *Archiv für Mikroskopische Anatomie*. 1875;11:636-52.
4. Righi A, Betts CM, Marchetti C, Marucci G, Montebugnoli L, Prati C, et al. Merkel cells in the oral mucosa. *International journal of surgical pathology*. 2006;14(3):206-11.
5. Toyoshima K, Seta Y, Takeda S, Harada H. Identification of Merkel cells by an antibody to villin. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1998;46(11):1329-34.
6. Kingsmill VJ, Berkovitz BK, Barrett AW. An immunohistochemical analysis of human Merkel cell density in gingival epithelium from dentate and edentulous subjects. *Archives of oral biology*. 2005;50(10):883-7.
7. Wikipedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Friedrich_Sigmund_Merkel [cited 2015 14.02].
8. Moll I, Kuhn C, Moll R. Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. *The Journal of investigative dermatology*. 1995;104(6):910-5.
9. Fortman GJ, Winkelmann RK. The Merkel cell in oral human mucosa. *Journal of dental research*. 1977;56(11):1303-12.
10. Winkelmann RK, Breathnach AS. The Merkel cell. *The Journal of investigative dermatology*. 1973;60(1):2-15.
11. Lucarz A, Brand G. Current considerations about Merkel cells. *European journal of cell biology*. 2007;86(5):243-51.
12. Woo SH, Lumpkin EA, Patapoutian A. Merkel cells and neurons keep in touch. *Trends in cell biology*. 2015;25(2):74-81.
13. Hartschuh W, Weihe E, Yanaihara N, Reinecke M. Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in Merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodulator function of the Merkel cell. *The Journal of investigative dermatology*. 1983;81(4):361-4.
14. Leung MS, Wong CC. Expressions of putative neurotransmitters and neuronal growth related genes in Merkel cell-neurite complexes of the rats. *Life sciences*. 2000;66(16):1481-90.
15. English KB, Wang ZZ, Stayner N, Stensaas LJ, Martin H, Tuckett RP. Serotonin-like immunoreactivity in Merkel cells and their afferent neurons in touch domes from the hairy skin of rats. *The Anatomical record*. 1992;232(1):112-20.

16. Cheng-Chew SB, Leung PY. Localisation of VIP-and CGRP-like substances in the skin and sinus hair follicles of various mammalian species. *Histochemistry and cell biology*. 1996;105(6):443-52.
17. Zaccane G. Neuron-specific enolase and serotonin in the Merkel cells of conger-eel (Conger conger) epidermis. An immunohistochemical study. *Histochemistry*. 1986;85(1):29-34.
18. Haerberle H, Fujiwara M, Chuang J, Medina MM, Panditrao MV, Bechstedt S, et al. Molecular profiling reveals synaptic release machinery in Merkel cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(40):14503-8.
19. Iggo A, Muir AR. The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairy skin. *The Journal of physiology*. 1969;200(3):763-96.
20. Haerberle H, Lumpkin EA. Merkel Cells in Somatosensation. *Chemosensory perception*. 2008;1(2):110-8.
21. Chan E, Yung WH, Baumann KI. Cytoplasmic Ca²⁺ concentrations in intact Merkel cells of an isolated, functioning rat sinus hair preparation. *Experimental brain research*. 1996;108(3):357-66.
22. Boulais N, Pennec JP, Lebonvallet N, Pereira U, Rougier N, Dorange G, et al. Rat Merkel cells are mechanoreceptors and osmoreceptors. *PloS one*. 2009;4(11):e7759.
23. Yamashita Y, Ogawa H. Slowly adapting cutaneous mechanoreceptor afferent units associated with Merkel cells in frogs and effects of direct currents. *Somatosensory & motor research*. 1991;8(1):87-95.
24. Ramieri G, Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Modica R, Springall DR, Polak JM. Non-innervated Merkel cells and Merkel-neurite complexes in human oral mucosa revealed using antiserum to protein gene product 9.5. *Archives of oral biology*. 1992;37(4):263-9.
25. Winkelmann RK. The Merkel cell system and a comparison between it and the neurosecretory or APUD cell system. *The Journal of investigative dermatology*. 1977;69(1):41-6.
26. Morrison KM, Miesegaes GR, Lumpkin EA, Maricich SM. Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Developmental biology*. 2009;336(1):76-83.
27. Van Keymeulen A, Mascre G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, De Geest N, et al. Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *The Journal of cell biology*. 2009;187(1):91-100.
28. Owens DM, Lumpkin EA. Diversification and specialization of touch receptors in skin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(6).
29. Fukuda J. A pure, monolayer culture of Merkel cells from sinus hair follicles of the rat. *Neuroscience letters*. 1996;216(2):73-6.
30. Nurse CA, Faraway L. Development of Merkel cell populations with contrasting sensitivities to neonatal deafferentation in the rat whisker pad. *Somatosensory & motor research*. 1988;6(2):141-62.

31. Hartschuh W, Weihe E. The effect of denervation of Merkel cells in cats. *Neuroscience letters*. 1977;5(6):327-32.
32. Ikeda R, Cha M, Ling J, Jia Z, Coyle D, Gu JG. Merkel cells transduce and encode tactile stimuli to drive Abeta-afferent impulses. *Cell*. 2014;157(3):664-75.
33. Tachibana T, Kamegai T, Takahashi N, Nawa T. Evidence for polymorphism of Merkel cells in the adult human oral mucosa. *Archives of histology and cytology*. 1998;61(2):115-24.
34. Nansen F. The structure and combination of the histological elements of the central nervous system. . Thesis. 1887.
35. Bock O. Cajal, Golgi, Nansen, Schafer and the neuron doctrine. *Endeavour*. 2013;37(4):228-34.
36. Loewi O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch Ges Physiol*. 1921;193:201-13.
37. Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC. The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *The Journal of physiology*. 1960;150:656-82.
38. Storm-Mathisen J, Leknes AK, Bore AT, Vaaland JL, Edminson P, Haug FM, et al. First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature*. 1983;301(5900):517-20.
39. Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of neurochemistry*. 1984;42(1):1-11.
40. Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *The Journal of comparative neurology*. 1984;229(3):374-92.
41. Somogyi P, Halasy K, Somogyi J, Storm-Mathisen J, Ottersen OP. Quantification of immunogold labelling reveals enrichment of glutamate in mossy and parallel fibre terminals in cat cerebellum. *Neuroscience*. 1986;19(4):1045-50.
42. Maycox PR, Deckwerth T, Hell JW, Jahn R. Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(30):15423-8.
43. Anne C, Gasnier B. Vesicular neurotransmitter transporters: mechanistic aspects. *Current topics in membranes*. 2014;73:149-74.
44. Thompson CM, Davis E, Carrigan CN, Cox HD, Bridges RJ, Gerdes JM. Inhibitor of the glutamate vesicular transporter (VGLUT). *Current medicinal chemistry*. 2005;12(18):2041-56.
45. Fremeau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, et al. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*. 2001;31(2):247-60.
46. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
47. Berg LK, Larsson M, Morland C, Gundersen V. Pre- and postsynaptic localization of NMDA receptor subunits at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuroscience*. 2013;230:139-50.

48. Bergersen LH, Storm-Mathisen J, Gundersen V. Immunogold quantification of amino acids and proteins in complex subcellular compartments. *Nature protocols*. 2008;3(1):144-52.
49. Carlemalm E. Lowicryl resins in microbiology. *Journal of structural biology*. 1990;104(1-3):189-91.
50. Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*. 1971;8(11):1081-3.
51. Larsson M, Broman J. Different basal levels of CaMKII phosphorylated at Thr286/287 at nociceptive and low-threshold primary afferent synapses. *The European journal of neuroscience*. 2005;21(9):2445-58.
52. Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron*. 1995;15(3):711-20.
53. Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, et al. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(7):2506-19.
54. Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami S, Ottersen OP. Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(14):4457-67.
55. Gundersen V, Chaudhry FA, Bjaalie JG, Fonnum F, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: a quantitative immunogold analysis in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(16):6059-70.
56. Gundersen V, Holten AT, Storm-Mathisen J. GABAergic synapses in hippocampus exocytose aspartate on to NMDA receptors: quantitative immunogold evidence for co-transmission. *Molecular and cellular neurosciences*. 2004;26(1):156-65.
57. Gundersen V, Danbolt NC, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate. *Neuroscience*. 1993;57(1):97-111.
58. Bergersen LH, Gundersen V. Morphological evidence for vesicular glutamate release from astrocytes. *Neuroscience*. 2009;158(1):260-5.
59. Nunzi MG, Pisarek A, Mugnaini E. Merkel cells, corpuscular nerve endings and free nerve endings in the mouse palatine mucosa express three subtypes of vesicular glutamate transporters. *Journal of neurocytology*. 2004;33(3):359-76.