

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marko MUHIČ

**VPLIV ZUNAJCELIČNIH SIGNALNIH MOLEKUL  
NA PRESNOVO GLUKOZE V ASTROCITIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marko MUHIČ

**VPLIV ZUNAJCELIČNIH SIGNALNIH MOLEKUL NA PRESNOVO  
GLUKOZE V ASTROCITIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE EFFECT OF EXTRACELLULAR SIGNALING MOLECULES  
ON GLUCOSE METABOLISM IN ASTROCYTES**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 5. 7. 2013 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje Znanost o celici. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Marko Kreft.

Doktorska disertacija je zaključek študijskega interdisciplinarnega programa Bioznanosti, področje Znanost o celici, na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljena je bila v Laboratoriju za nevroendokrinologijo – molekularno celično fiziologijo na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani in v Laboratoriju za celično inženirstvo na družbi Celica, biomedicinski center, d.o.o., Ljubljana.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: akad. prof. dr. Robert ZOREC  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Član: prof. dr. Mojca KRŽAN  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za farmakologijo in ekperimentalno toksikologijo

Član: prof. dr. Kristina SEPČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za biokemijo

Datum zagovora: 22.5.2015

Podpisani izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Marko MUHIČ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd  
DK UDK/ UDC 612:547.455.623(043.3)=163.6  
KG astrociti/presnova/glukoza/laktat/noradrenalin/inzulin/IGF-1/FRET/Laconic/FLII12Pglu-700 $\mu\Delta$ 6  
AV MUHIČ, Marko (magister farmacije)  
SA KREFT, Marko (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje Znanosti o celici  
LI 2015  
IN VPLIV ZUNAJCELIČNIH SIGNALNIH MOLEKUL NA PRESNOVO GLUKOZE V ASTROCITIH  
TD Doktorska disertacija  
OP X, 67 str., 18 sl., 190 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Skoraj polovico vse glukoze, ki vstopi v astrocit, se presnovi posredno, prek vgrajevanja v glikogen. Na presnovo glukoze v astrocitih vplivajo številne molekule. Pri našem delu smo uporabili FRET meritve D-glukoze z nanosenzorjem FLII12Pglu-700 $\mu\Delta$ 6 in laktata z nanosenzorjem Laconic. Noradrenalin v astrocitu povzroči glikogenolizo in s tem zviša znotrajcelično koncentracijo D-glukoze. Adrenergični receptorji  $\alpha_1$  so ključni za razgradnjo glikogena in porast znotrajcelične koncentracije proste D-glukoze, kar je signalizirano prek porasta aktivnosti kalcija v celici, medtem ko adrenergični receptorji  $\beta$  modulirajo nadaljno presnovo glukoze v L-laktat preko zvišanja znotrajcelične koncentracije sekundarnega prenašalca cAMP. Ta dognanja so v skladu s hipotezo o astrocitno-nevronske laktatni poti. Miši z izbitim genom za protein Gdi1, ki so model bolezni umske manjzmožnosti, imajo spremenjeno presnovo glukoze v astrocitu. Astrociti izražajo receptorje za inzulin in IGF-1, koncentracija citosolne glukoze pa se zniža ob stimulaciji z inzulinom ali IGF-1. Inzulin ne vpliva na transport glukoze preko celične membrane astrocitov, verjetno zaradi odsotnosti na inzulin občutljive translokacije transporterja GLUT4. S pomočjo barvanja PAS smo ugotovili, da se zaloge glikogena lahko obnavljajo in da inzulin ter IGF-1 še ojačata resintezo glikogena.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDK/ UDC 612:547.455.623(043.3)=163.6  
CX astrocytes/metabolism/glucose/lactate/noradrenaline/insulin/IGF-1/FRET/Laonic/FLII12Pglu-700 $\mu\Delta$ 6  
AU MUHIČ Marko (master of pharmacy)  
AA KREFT Marko (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, scientific field Cell science  
PY 2015  
TI THE EFFECT OF EXTRACELLULAR SIGNALING MOLECULES ON GLUCOSE METABOLISM IN ASTROCYTES  
DT Doctoral Dissertation  
NO X, 67 p., 18 fig., 190 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Almost half of glucose that enters into the astrocyte is metabolised *via* the glycogen shunt. Glucose metabolism in astrocytes is regulated with numerous signalling molecules. Most of the experiments were performed with the glucose FLII12Pglu-700 $\mu\Delta$ 6 and the lactate Laonic FRET nanosensors. We showed that noradrenaline induces glycogenolysis and consequently elevates intracellular D-glucose concentration in astrocyte.  $\alpha_1$  adrenergic receptors are mainly involved in glycogenolysis and increase of intracellular D-glucose concentration, which is signalled by increase in intracellular calcium.  $\beta$  receptors primarily modulate further glucose metabolism to lactate *via* increase in intracellular second messenger cAMP. These findings are in accordance with astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. Gdi1 knockout mice, which are model for mental disability, have altered glucose metabolism in astrocytes. Astrocytes express insulin and IGF-1 receptors. Cytosolic D-glucose concentration is decreased by insulin or IGF-1 stimulation. Glucose transport across the plasma membrane is not affected by insulin stimulation, likely due to lack of insulin-sensitive GLUT4 transporter translocation. PAS staining was used to show that glycogen stores are rebuilt after glucose deprivation and following recovery, where insulin and IGF-1 boost the process of glycogen formation.

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	1
1.1	NAMEN DELA.....	1
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b> .....	2
2.1	CELICE GLIJE .....	2
2.2	VLOGA ASTROCITOV.....	4
2.3	NEVROMETABOLNA ZVEZA.....	5
2.4	ADRENERGIČNI RECEPTORJI NA ASTROCITIH.....	8
2.5	INZULIN IN IGF-1 V MOŽGANIH.....	11
2.6	FRET – PRENOS ENERGIJE Z RESONANCO FLUORESCENCE.....	12
<b>2.6.1</b>	<b>Glukozni nanosenzor - FLII12Pglu-700<math>\mu</math><math>\Delta</math>6</b> .....	12
<b>2.6.2</b>	<b>Laktatni nanosenzor – Laconic</b> .....	14
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	15
3.1	RAZTOPINE, KEMIKALIJE IN MEDIJ.....	15
<b>3.1.1</b>	<b>Hranilni medij za celično kulturo</b> .....	15
<b>3.1.2</b>	<b>Medij za izolacijo celic</b> .....	15
<b>3.1.3</b>	<b>Zunajcelične raztopine</b> .....	15
<b>3.1.4</b>	<b>Rastni medij za gojenje bakterij LB (angl. »Lysogeny broth« oz. Luria- Bertani«)</b> .....	15
<b>3.1.5</b>	<b>Medij za transfekcijo celic</b> .....	15
<b>3.1.6</b>	<b>Plazmidna DNA</b> .....	16
3.2	METODE CELIČNE IN MOLEKULARNE BIOLOGIJE.....	16
<b>3.2.1</b>	<b>Celična kultura</b> .....	16
<b>3.2.2</b>	<b>Izolacija pDNA iz bakterij</b> .....	17
<b>3.2.3</b>	<b>Vnos pDNA v sesalske celice – transfekcija</b> .....	17
3.3	FLUORESCENTA MIKROSKOPIJA.....	17
<b>3.3.1</b>	<b>Superfuzijski sistem in dodajanje raztopin</b> .....	20
<b>3.3.2</b>	<b>Barvanje PAS (angl. »Periodic Acid-Schiff staining«)</b> .....	20
<b>3.3.3</b>	<b>Imunocitokemija</b> .....	21
<b>3.3.4</b>	<b>Analiza in statistično ovrednotenje podatkov</b> .....	22
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	23
4.1	URAVNAVANJE METABOLIZMA GLUKOZE IN LAKTATA PREKO ADRENERGIČNIH RECEPTORJEV.....	23
<b>4.1.1</b>	<b>Noradrenalin zviša znotrajcelično koncentracijo glukoze</b> .....	24
<b>4.1.2</b>	<b>Regulacija glukoze in laktata preko adrenergičnih receptorjev <math>\alpha</math> in <math>\beta</math> v posameznem astrocitu</b> .....	26
<b>4.1.3</b>	<b>Genetsko spremenjeni astrociti izražajo drugačen metabolizem glukoze</b> .....	33

4.2	INZULIN IN IGF-1 MODULIRATA CITOSOLNO GLUKOZO IN ZALOGE GLIKOGENA V ASTROCITU, NE PA TRANSPORTA GLUKOZE SKOZI MEMBRANO.....	35
4.2.1	<b>Citosolna koncentracija glukoze v astrocitu se zniža ob stimulaciji z inzulinom.....</b>	35
4.2.2	<b>Pretok glukoze skozi membrano astrocita ni odvisen od inzulina.....</b>	38
4.2.3	<b>Citosolna koncentracija glukoze v astrocitu se zniža ob stimulaciji z IGF-1.....</b>	40
4.2.4	<b>Inzulin in IGF-1 povečata zaloge glikogena v astrocotih.....</b>	42
5	<b>DISKUSIJA.....</b>	44
5.1	REGULACIJE GLUKOZE IN LAKTATA PREKO RECEPTORJEV $\alpha$ IN $\beta$ V POSAMEZNEM ASTROCITU.....	44
5.2	INZULIN IN IGF-1 MODULIRATA CITOPLAZEMSKO GLUKOZO IN ZALOGE GLIKOGENA V ASTROCITU, NE PA TRANSPORTA ČEZ MEMBRANO CELICE.....	46
5.2.1	<b>Inzulin in IGF-1 povečata zaloge glikogena v astrocitih neodvisno od transporta glukoze preko celične membrane.....</b>	46
5.2.2	<b>Inzulin in IGF-1 znižata koncentracijo citosolne glukoze v astrocitu preko signalnih poti.....</b>	47
6	<b>SKLEPI.....</b>	49
7	<b>POVZETEK.....</b>	50
7.1	SUMMARY.....	53
8	<b>VIRI.....</b>	56



## KAZALO SLIK

<b>Sl. 1.</b>	Astrocita vzgojena iz korteksa neonatalnih podgan v primarni kulturi in označena s protitelesi proti GFAP, ki je zanje značilen protein.....	3
<b>Sl. 2.</b>	Delovanje proteina G po aktivaciji adrenergičnih receptorjev.....	10
<b>Sl. 3.</b>	Glukozni nanosenzor FLII12Pglu700 $\mu\Delta$ 6.....	13
<b>Sl. 4.</b>	Shema merilnega sistema za FRET.....	20
<b>Sl. 5.</b>	FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 FRET razmerje v izoliranem astrocitu.....	23
<b>Sl. 6.</b>	Noradrenalin zviša koncentracijo proste glukoze v astrocitu, ki izraža FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 FRET nanosenzor.....	25
<b>Sl. 7.</b>	Spremembe FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 FRET razmerja v izoliranem astrocitu ob stimulaciji z izoprenalinom (200 $\mu$ M), ki zviša koncentracijo citosolne glukoze.....	26
<b>Sl. 8.</b>	Fenilefrin in izoprenalin povišata koncentracijo citosolne glukoze v astrocitu, ki izraža FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 FRET nanosenzor.....	28
<b>Sl. 9.</b>	Ionomicin zviša koncentracijo proste glukoze v astrocitu, ki izraža FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 FRET nanosenzor.....	30
<b>Sl. 10.</b>	Fenilefrin in izoprenalin povišata koncentracijo citosolnega laktata v astrocitu, ki izraža laktatni nanosenzor Laconic.....	32
<b>Sl. 11.</b>	Stimulacija z noradrenalinom dvigne koncentracijo citosolne glukoze pri WT (polni krogci) in v Gdi1 KO astrocitih (prazni krogci).....	34
<b>Sl. 12.</b>	Izolirani podganji astrociti izražajo inzulinske receptorje.....	35
<b>Sl. 13.</b>	Stimulacija z inzulinom zniža citosolno koncentracijo glukoze v astrocitu.....	37
<b>Sl. 14.</b>	Tretiranje z inzulinom ne vpliva na vstop glukoze v astrocite.....	39
<b>Sl. 15.</b>	Izolirani podganji astrociti izražajo IGF-1 receptorje.....	41
<b>Sl. 16.</b>	IGF-1 stimulacija zniža citosolno koncentracijo glukoze v astrocitu.....	41
<b>Sl. 17.</b>	Količina glikogena v astrocitih je uravnana z inzulinom in IGF-1.....	43
<b>Sl. 18.</b>	Inzulin in IGF-1 uravnava glikogenske zaloge v astrocitu.....	48

## SLOVAR

ANLSH	hipoteza o astrocitno-nevronske laktatne poti (hipoteza ANLSH, ang. »astrocyte-neuron-lactate shuttle hypothesis«)
ANP	atrijski natriuretični peptid (angl. atrial natriuretic peptide)
ATP	adenozin trifosfat
cAMP	ciklični adenzin-3'-5'-monofosfat
BDNF	rastni dejavnik možganskega izvora (angl. brain-derived neurotrophic factor)
CFP	modro-zelena fluorescirajoča beljakovina (angl. »cyan fluorescent protein«)
CŽS	centralni živčni sistem
DAG	diacilglicerol (angl. »diacylglycerol«)
DMEM	osnovni medij za gojenje astrocitov (angl. »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«)
EDTA	etilen diamino-tetraocetna kislina (angl. »Ethylenediaminetetraacetic acid«)
FBS	fetusni serum goveda (angl. »fetal bovine serum«)
FRET	prenos energije s Försterjevo resonanco ali prenos energije z resonanco fluorescence (angl. »Förster resonance energy transfer«)
GABA	$\gamma$ -aminobutirna kislina (angl. » $\gamma$ -aminobutyric acid«)
Gdi1	inhibitor 1 GDP disociacije (angl. »GDP dissociation inhibitor 1«)
GDP	gvanozin difosfat (angl. »guanosine diphosphate«)
GFAP	glialna fibrilarna kislina beljakovina (angl. »glial fibrillary acidic protein«)
GGBP	glukozno-galaktozno vezavni protein (angl. »glucose-galactose binding protein«)
GLUT	glukozni transporter (angl. »glucose transporter«)
GP	glikogen fosforilaza (angl. »glycogen phosphorylase«)
GPR81	z beljakovino G sklopljeni receptor 81 (angl. »G protein-coupled receptor 81«)

GS	glikogen sintaza (angl. »glycogen synthase«)
GSK	glikogen sintaza kinaza (angl. »glycogen synthase kinase«)
IGF	inzulinu podoben rastni faktor (angl. »insulin like growth factor«)
IP <sub>3</sub>	inozitol trifosfat
IRS	substrat inzulinskega receptorja
IR	inzulinski receptor
KO	žival z izbitim genom (angl. »knockout«)
LDH	laktatna dehidrogenaza (angl. »lactate dehydrogenase«)
MCT	monokarboksilatni transporter (angl. »monocarboxylate transporter«)
mTFP	modro-zeleno fluorescirajoča beljakovina (angl. »monomeric teal fluorescent protein«)
NA	noradrenalin
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
PAS	barvanje s perjordovo kislino in s pomočjo Schiffove reakcije (angl. »periodic acid schiff«)
PBP	bakterijski periplazemski vezavni protein (angl. »bacterial periplasmic-binding protein«)
PBS	fosfatni pufer (angl. »phosphate buffer saline«)
PKA	protein kinaza A (angl. »protein kinase A«)
PKC	protein kinaza C (angl. »protein kinase C«)
PLL	poli-L-lizin (angl. »poly-L-lysine«)
PPP	pikropodofilotoksin (angl. »picropodophyllotoxin«)
Venus	zeleno fluorescirajoča beljakovina
YFP	rumeno fluorescirajoča beljakovina (angl. »yellow fluorescent protein«)
WT	divji tip živali (angl. »wild type«)



## 1 UVOD

Nevroni in celice glije komunicirajo s kemičnimi signali, kar je ključno za normalno delovanje živčnega sistema. Številne raziskave kažejo na vpletenost astrocitov v patogenezo nevrodegenerativnih bolezni. V luči nedavnih spoznanj o tem, da so astrociti ključnega pomena za lokalno komuniciranje v možganih in da imajo pomembno vlogo v fiziologiji in patofiziologiji, je izrednega pomena razumeti temelje komunikacije med astrociti in sosednjimi celicami. Astrociti so pomembni tudi za metabolizem možganov (Sofroniew in Vinters, 2010). Glukoza in druge hranilne snovi iz krvi prvenstveno vstopajo v astrocitate. Ko glukoza vstopi v astrocit, se lahko presnovi v manjše molekule, npr. laktat, (Pellerin in Magistretti, 1994; Tsacopoulos in sod., 1988) ali pa se skladišči v obliki glikogena. Glikogen je zaloga energije, ki je skoraj izključno v astrocitih (Brown, 2004; Castro in sod., 2009; Pellerin in Magistretti, 1994; Wiesinger in sod., 1997). Mehanizem uravnavanja presnove glikogena in zunajcelične signalne molekule, ki pri tem sodelujejo, še niso povsem raziskani. Zanimalo nas je, kako in s kakšno dinamiko fiziološki dejavniki vplivajo na koncentracijo glukoze v citosolu astrocita.

### 1.1 NAMEN DELA

Namen je bil z nanosenzorji FRET (angl. »Förster resonance energy transfer«, prenos energije z resonanco fluorescence) raziskati metabolizem glukoze v astrocitu. FRET mikroskopija omogoča spremljanje metabolitov v celici z veliko prostorsko in časovno ločljivostjo. Opazujemo lahko dinamiko odzivov ene celice z veliko časovno in prostorsko ločljivostjo, kar je velika prednost pred raziskavami z drugimi metodami. Postavili smo naslednje hipoteze:

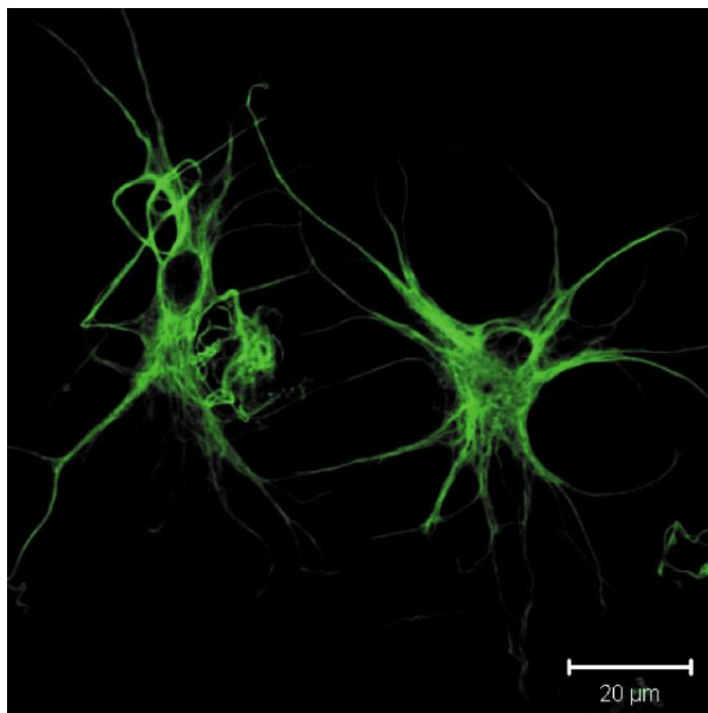
1. Noradrenalin zviša koncentracijo citosolne glukoze v astrocitu s pospeševanjem razgradnje glikogena.
2. Izoprenalin (adrenergični agonist  $\beta$ ) je aktivator razgradnje glikogena, fenilefrin, specifični agonist receptorjev  $\alpha_1$ , pa le modulira presnovo glukoze v astrocitu.
3. Aktivacija adrenergičnih receptorjev stimulira nastanek laktata v astrocitu.
4. Genetsko modificirani organizmi, brez gena *Gdi1*, imajo spremenjen energijski metabolizem v astrocitu.
5. Inzulin in inzulinu podoben rastni faktor 1 (IGF-1) znižata koncentracijo citosolne glukoze v astrocitu s pospeševanjem vgradnje glukoze v glikogen.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 CELICE GLIJE

Celice glije je sredi 19. stoletja prvi opisal Rudolf Virchow in jih opredelil kot »možgansko polnilo«, ki obdaja nevrone in zapolnjuje prostor med njimi (Somjen, 1988). Naše razumevanje o celicah glije se je od takrat močno razširilo, imajo številne vloge in jim pripisujejo zelo pomembno funkcijo pri delovanju centralnega živčnega sistema (CŽS). Živčni sistem sestavljata dve vrsti celic: nevroni in celice glije. V nekaterih delih CŽS je astrocitov nekajkrat več kot nevronov (Sofroniew in Vinters, 2010). Celice glije delimo na makroglijo in mikroglijo. Makroglijo sestavljajo astrociti in oligodendrociti (Kandel in sod., 2000). Oligodendrociti so satelitne celice v osrednjem živčevju, so v stiku z nevroni in okoli njih tvorijo izolacijski mielinski ovoj. Imajo podobno vlogo kot Schwannove celice v obkrajnem živčnem sistemu. Mikroglija je mezodermalnega izvora in je sorodna makrofagom in monocitom. Je večinoma okoli krvnih žil in se aktivira ob patoloških procesih (Cooper in sod., 1996).

Astrociti so morfološko celice zvezdaste oblike in v citoplazmi vsebujejo veliko fibril. So predvsem v področju aksonov in dendritov ter obdajajo krvne žile (Cooper in sod., 1996). Večina jih izraža gliialno fibrilarno kislino beljakovino, GFAP, ki lahko služi kot molekularni označevalec teh celic (Slika 1) (Sofroniew in Vinters, 2010; Wang in Bordey, 2008). Vendar pa astrociti niso edine celice, ki izražajo GFAP, pri nekaterih populacijah pa proteina ne moremo zaznati zaradi omejitev detekcijskih metod (Sofroniew in Vinters, 2010). Poleg GFAP sta znana molekularna označevalca za astrocite še beljakovina S100B in glutamin sintetaza (Souza in sod., 2013; Wang in Bordey, 2008).



**Slika 1. Astrocita vzgojena iz korteksa neonatalnih podgan v primarni kulturi in označena s protitelesi proti GFAP, ki je zanje značilen protein**

Slika je bila posneta v Referenčnem centru za konfokalno mikroskopijo Carl-Zeiss Laboratorija za neuroendokrinologijo in celično fiziologijo, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Ljubljana.

**Figure 1. Cortex astrocytes from neonatal rat in primary culture labelled with anti-GFAP antibodies, which is protein typically found in astrocytes**

Image was taken in Reference centre for confocal microscopy Carl-Zeiss in The Laboratory of Neuroendocrinology - Molecular Cell Physiology, Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Ljubljana.

Astrociti so ektodermalnega izvora, njihova vloga pa ni le podpora nevronov, temveč tudi aktivno sodelujejo pri dogajanju v CŽS, npr. uravnavajo koncentracije nevrottransmitterjev, citokinov, rastnih dejavnikov in molekul zunajceličnega matriksa (Siegel in sod., 2006). Omenjene celice predstavljajo eno večjih shramb glikogena v centralnem živčnem sistemu (Perdan Pirkmajer in sod., 2009). Pomembno vlogo imajo pri izgradnji in vzdrževanju krvno-možganske pregrade. Medsebojno so povezani preko presledkovnih stikov. Le-ti omogočajo komunikacijo, predvsem preko spremembe koncentracije kalcijevih ionov, ter izmenjavo drugih ionov in manjših molekul (Deutch in Roth, 1999; Perdan-Pirkmajer in sod., 2009). V večini možganskih področij predstavljajo 25-50% celičnega volumna. Astrociti se po obliki med seboj razlikujejo in tudi različno imenujejo. Sivo substanco poseljujejo predvsem protoplazemski, belo substanco pa fibrilarni astrociti (Nestler in sod., 2001). Pomemben delež glije predstavljajo radialni astrociti, ki se med razvojem do odraslega organizma večinoma pretvorijo v zvezdaste astrocite. Radialni astrociti so prisotni v retini (Müllerjeva glija) in malih možganih (Bergmanova glija). Obstajajo tudi manjše skupine astrocitov, značilne za posamezne regije, npr. tanciti in periciti (Verkhratsky in Morgan Butt, 2007).

## 2.2 VLOGA ASTROCITOV

Oblika in funkcija astrocitov se posebej razlikuje med razvojem, v odraslem obdobju in po poškodbi osrednjega živčevja. Med razvojem so embrionalni radialni astrociti poglavitni vir molekul zunajceličnega matriksa in adhezijskih molekul, ki omogočajo usmerjeno rast, organizacijo in povezovanje nevronov. Poleg tega sproščajo tudi nevrotrofične dejavnike, ki omogočajo preživetje, rast in diferenciacijo nevronov. Po končanem razvojnem obdobju pa se proizvodnja nevrotrofičnih dejavnikov bistveno zmanjša (Verkhatsky in Morgan Butt, 2007).

V odraslem obdobju, ko se izrastki astrocitov skrčijo in se celice preoblikujejo v protoplazemske in fibrilarne astrocite, je njihova vloga predvsem vzdrževanje stalnega zunajceličnega okolja, ki je nujno potrebno za nemoteno delovanje nevronov. Astrociti so umeščeni med krvne žile in nevrone, kar dokazuje njihovo vpletenost v energijski presnovi možganov. Astrocitni končiči na koncu astrocitnega izrastka so sestavljeni iz struktur, ki so podobne rozetam ali prstom, s katerimi se prilegajo na endotelijske celice krvnih žil (Kacem in sod., 1998; Kimelberg, 2007). Astrociti sodelujejo s periciti pri nadzoru pretoka krvi v možganih preko uravnavanja tonusa žil (Bonkowski in sod., 2011; Gordon in sod., 2008), udeleženi pa so tudi pri sinaptičnem prenosu, saj privzamejo prebitek  $K^+$  ionov, ki se sprostijo ob prenosu dražljaja. Pomembno vlogo pa imajo tudi pri inaktivaciji neurotransmiterjev, ki se sprostijo v sinaptično špranjo. Iz sinaptične špranje odstranjujejo večino glutamata, kar ščiti živčne celice pred ekscitotoksično poškodbo. Astrociti v glutamatno-glutaminskem ciklusu glutamat pretvorijo v glutamin, slednjega sprostijo v zunajcelični prostor, od koder nato vstopi v nevrone in se tam uporablja kot gradnik pri ponovni sintezi glutamata z encimom glutaminazo (Erecinska in Silver, 1990). Glutamin sintetaza je v možganih prisotna izključno v astrocitih (Martinez-Hernandez in sod., 1977). Glutamat je eden najpomembnejših vzbujevalnih živčnih prenašalcev (Amara in Fontana, 2002) in ker ne prehaja krvno-možganske pregrade, je glukoza pomemben prekurzor za sintezo glutamata v možganih (Kreft in sod., 2012). Na membrani astrocitov najdemo tudi transportne proteine za številne druge neurotransmiterje, npr. aspartat, GABA, glicin, biogene amine. Astrociti omogočajo sinaptogenezo (Pfrieger in Barres, 1997). Pri patoloških procesih se spremenijo v reaktivne celice, ki aktivno posredujejo v procesu regeneracije osrednjega živčevja. V živčnem sistemu so nevroni in astrociti neločljivo povezani pri uravnavanju aktivnosti nevronov in prenosu informacije preko sinaps. Raziskave kažejo, da se astrociti ob povečani aktivnosti nevronov odzovejo s povečano znotrajcelično koncentracijo  $Ca^{2+}$  ionov. Ta porast kalcija sproži sproščanje neurotransmiterjev iz astrocitov, kar posledično vpliva na aktivnost nevronov in plastičnost sinapse (Araque in sod., 1999; Vesce in sod., 1999). Astrociti so torej enakopraven član tridelne sinapse, uravnavajo tvorbo in vzdrževanje sinaps (Araque in sod., 1999; Nedergaard in sod. 2003; Vesce in sod., 1999).



Astrociti posedujejo posebno vrsto vzdražnosti, ki je posredovana preko znotrajceličnih sprememb kalcija in se lahko prenaša na sosednje celice. Na ta način se signali med astrociti prenašajo okoli 100 krat počasneje kot med nevroni (Kreft in sod., 2004). Na dražljaje se odzovejo z zvišano znotrajcelično koncentracijo kalcija in ne s spremembo membranskega potenciala kot nevroni (Stobart in Anderson, 2013). Poznamo dve poti proženja kalcijevih valov. Ena vključuje direktno komunikacijo med dvema astrocitoma preko presledkovnih stikov (angl. »gap junctions«), druga pa temelji na sproščanju gliotransmiterjev, ki aktivirajo receptorje na sosednjih celicah (astrocitih, nevronih in drugih). Obe poti proženja kalcijevih valov se prepletata (Scemes in Giaume, 2006). Aktivacija receptorjev, sklopljenih s proteini G, povzroči sproščanje kalcija iz endoplazmatskega retikuluma v citoplazmo preko inozitol trifosfata (IP3) (Stobart in Anderson, 2013). Valovi kalcija se potem lahko širijo do drugih astrocitov s pomočjo difuzije IP3 po že omenjenih dveh poteh: preko presledkovnih stikov ali pa izločanjem gliotransmiterjev v zunajcelični prostor (Scemes in Giaume, 2006). Aktivacija adrenergičnih receptorjev  $\alpha_1$  inducira kalcijeve valove v astrocitih (Muyderman in sod., 2001).

Gliotransmiterji so spojine, ki jih izločajo celice glije ter zadostujejo naslednjim kriterijem: se sintetizirajo ali hranijo v celicah glije, njihovo sproščanje je posredovano s fiziološkim ali patofiziološkim dražljajem in da dosežejo odziv na sosednjih celicah v nekaj milisekundah do sekundah. Lahko jih razdelimo na amino kisline (npr. glutamat, D-serin), nukleotide (npr. ATP) in peptide (npr. ANP, BDNF). V zunajcelični prostor se lahko sproščajo po večjih mehanizmih, npr. preko hemikanalov, ionotropnih purinergičnih receptorjev, preko organskih transporterjev in transporterjev za aminokisline ter s  $\text{Ca}^{2+}$  posredovano eksocitozo (Parpura in Zorec, 2010). Gliotransmiterji lahko vplivajo na sinaptični prenos in plastičnost v časovnem razponu od nekaj sekund do minut (Araque in sod., 2014).

### 2.3 NEVROMETABOLNA ZVEZA

Možgani predstavljajo le 2 % mase telesa porabijo pa kar 20 % glukoze in 25 % kisika v mirovanju (Belanger in sod., 2011). Živčno tkivo za nemoteno delovanje nujno potrebuje stalno preskrbo z glukozo in kisikom (Blomqvist in sod., 1991). Normalna koncentracija glukoze v krvi človeka je okoli 5 mM, če koncentracija glukoze v plazmi pade pod 4 mM to vpliva na kognitivne procese (Castro in sod., 2009). Prenos živčnih impulzov v centralnem živčnem sistemu zahteva učinkovit sistem za dostavo energije. Največji porabnik energije v možganih je prenos akcijskega potenciala po depolarizaciji nevronov,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aza pa v največji meri prispeva k energijski oskrbi tega procesa (Attwell in Laughlin, 2001). Krvno-možgansko pregrado sestavljajo kapilarne endotelijske celice, bazalna membrana, ki ovija kapilare in astrocitni izrastki (Hawkins, 2009). Transporter GLUT (angl. »glucose transporter«) omogoča prenos glukoze v celice možganov s

pomočjo olajšane difuzije (Zhao in Keating, 2007). Transporter GLUT1 je v možganih navzoč povsod in ima pomembno vlogo pri transportu glukoze skozi krvno-možgansko pregrado, del katere so tudi astrociti (Brown in Ransom, 2007; Heni in sod., 2011). GLUT1 45 kDa se izraža predvsem v astrocitih (Leino in sod., 1997; Morgello in sod., 1995), GLUT1 55 kDa pa v endotelijskih celicah krvno-možganske pregrade (Maher in sod., 1994). V nevronih se izražajo predvsem transporterji GLUT3 (Leino in sod., 1997). Hitrost transporta preko transporterjev GLUT3 je sedemkrat hitrejša kot pri transporterjih GLUT1 (Maher in sod., 1994). Astrociti imajo prvenstveno mesto pri privzemu glukoze iz plazme ob povečani možganski aktivnosti, saj so umeščeni med krvne žile in nevrone. S svojimi izrastki povezujejo obe strukturi ter zagotavljajo glukozo in druge molekule za energijski metabolizem v nevronih (Kacem in sod., 1998). Nevroni namreč nimajo neposrednega dostopa do glukoze, saj jih od notranjosti krvnih žil ločujejo štiri membrane – dve membrani endotelija žil in dve membrani astrocita (Barros, 2013). V membranah humanih astrocitov sta prisotna transporterja GLUT1 in GLUT3, zelo malo pa je tudi GLUT2. GLUT1 in GLUT3 sta od inzulina neodvisna transporterja, transporter, GLUT2 pa je prisoten predvsem v jetrih in trebušni slinavki (Heni in sod., 2011; Ohtsubo in sod., 2005). Transporterja GLUT3 je več v humanih astrocitih, v podganjih pa ga je le malo. Transporterja GLUT4, katerega translokacija na membrano je posredovana s signalizacijo preko inzulinskih receptorjev, je v astrocitih malo (Heni in sod., 2011).

Večina glukoze v astrocitih se presnovi preko glikolize s pomočjo encima heksokinaze. V astrocitih je encim v obliki izooblike I (Wilson, 1995). Heksokinaza II je mišična izooblika, ki se v astrocitih izraža ob pomanjkanju glukoze (Niitsu in sod., 1999). Glukoza-6-fosfat (G6F), ki nastane po fosforilaciji s heksokinazo, se lahko razgrajuje z glikolizo, vstopi v pentozno-fosfatno pot ali pa sodeluje kot gradnik pri sintezi glikogena (Jeffery in Jornvall, 1983). Glikoliza je prvenstvena pot presnove glukoze, pentozno-fosfatna pot pa predstavlja manjši delež (Ben-Yoseph in sod., 1994). Študije na primarnih kulturah nevronov in astrocitov so pokazale, da imajo astrociti višjo glikolitično aktivnost kot nevroni. V astrocitih ima anaerobna glikoliza do laktata termodinamsko prednost pred oksidacijo do piruvata (Schousboe in sod., 1997; Walz in Mukerji, 1988; Zwingmann in Leibfritz, 2003). Redukcija laktata do piruvata poteka s pomočjo encima laktatna dehidrogenaza (LDH). LDH je v petih izooblikah, ki so heterogeno porazdeljene med živčnimi celicami. LDH-1 prevladuje v nevronih (Bittar in sod., 1996), LDH-5 pa predvsem v astrocitih (Pellerin in sod., 1998). Izsledki raziskav kažejo, da imajo astrociti veliko kapaciteto za sintezo laktata iz piruvata, medtem ko nevroni lažje sintetizirajo piruvat iz laktata (Parpura in Haydon, 2009). Prisotnost encima LDH-5 predvsem v astrocitih in specifična distribucija podtipov monokarboksilatnega transporterja (MCT, angl. »monocarboxylate transporter«) med nevroni in astrociti nakazujeta na produkcijo in izločanje laktata iz astrocitov (Pellerin in sod., 1998). Na plazemski membrani astrocitov sta MCT-1 in MCT-4, na nevronih pa predvsem MCT-2 (Barros in Deitmer, 2010; Stobart in Anderson, 2013). Navedena dognanja o metabolizmu laktata so bila podlaga za

postavitev hipoteze o astrocitno nevronske laktatne poti (hipoteza ANLSH, ang. »Astrocyte-neuron-lactate shuttle hypothesis«). Model opisuje produkcijo laktata iz glukoze v astrocitih in njegovo sproščanje ter privzem v nevrone za oksidacijo (Hyder in sod., 2006; Jakoby in sod., 2014; Magistretti in sod., 1999; Pellerin in Magistretti, 1994; Pellerin in Magistretti, 2004). Pomen in obseg posredovanja laktata nevronom še ni povsem pojasnjen (Mangia in sod., 2009; Pellerin in sod., 2007).

Laktat je v možganih pomemben presnovni substrat (Abi-Saab in sod., 2002) v stanjih pomanjkanja glukoze (Evans in sod., 2013). Poleg tega ima v možganih tudi vlogo signalne molekule (Kreft in sod., 2012), in sicer lahko uravnava lastno produkcijo (Sotelo-Hitschfeld in sod., 2012). Laktat na presnovne poti lahko vpliva z dvema mehanizmoma: uravnava nastanek cAMP preko laktatnega receptorja GPR81 (Lauritzen in sod., 2014) ali s prilagajanjem NADH/NAD<sup>+</sup> redoks razmerja (Bergersen in Gjedde, 2012). Receptor GPR81 je bil odkrit v adipocitih, kjer je sklopljen s proteini G. Le-ti inhibirajo aktivnost adenilat-ciklaze in tvorbo cAMP iz ATP. Znižanje znotrajcelične koncentracije cAMP inhibira lipolizo v adipocitih (Ahmed in sod., 2010). V možganih je receptor GPR81 večinoma prisoten na sinaptičnih membranah vzbujevalnih (ekscitatornih) sinaps, prisoten pa je tudi na membranah astrocitov in endotelijskih celicah žil. Stimulacija tkivnih rezin hipokampusa z L-laktatom in 3,5-DHBA (3,5-dihidroksibenzoična kislina), ki je agonist laktatnega receptorja, povzroči znižanje znotrajceličnega cAMP v tkivnih rezinah (Lauritzen in sod., 2014). Astroцитi regulirajo tvorbo spomina z nadzorom dostave laktata za delovanje nevronov (Newman in sod., 2011). Nevroni lahko ob pomankanju glukoze uporabljajo laktat kot vir energije, laktat pa je tudi preferenčni energijski substrat kadar sta na voljo tako glukoza kot laktat (Wyss in sod., 2011).

Glukoza se v astrocitih lahko uskladišči v obliki glikogena (Cataldo in Broadwell, 1986; Wender in sod., 2000). Glikogen je v možganih prisoten skoraj izključno v astrocitih (Cataldo in Broadwell, 1986; Pfeiffer-Guglielmi in sod., 2003). Količina glikogena v možganih je relativno majhna v primerjavi z jetri ali mišičnimi celicami, kljub temu pa ima izreden pomen za delovanje nevronov. To je rezervoar glukoznih enot, ki se po potrebi lahko sprostijo (Brown in Ransom, 2007).

Astroцитi imajo encime glikogenolize in glikogeneze (Ibrahim, 1975; Swanson in Choi, 1993; Wiesinger in sod., 1997). Glikogen fosforilaza (GP) je ključen encim pri razgradnji glikogena v astrocitih (Pfeiffer in sod., 1990). Astroцитi izražajo dve obliki GP, za kateri je značilna nekoliko drugačna regulacija, imenujeta pa se po organih, v katerih se izražata v večji meri: mišični tip, MM, in možganski tip, BB (Pfeiffer-Guglielmi in sod., 2003). Oblika BB je alosterično uravnavana z adenozin monofosfatom (AMP), ki nastaja iz ATP ob povečanem celičnem energijskem metabolizmu. Oblika MM se aktivira predvsem s fosforilacijo (pretvorbo iz fosforilaze b v fosforilazo a), ki jo povzroči zunanji stimulus (Pfeiffer-Guglielmi in sod., 2003). Oblika MM je regulirana predvsem z zunajceličnim

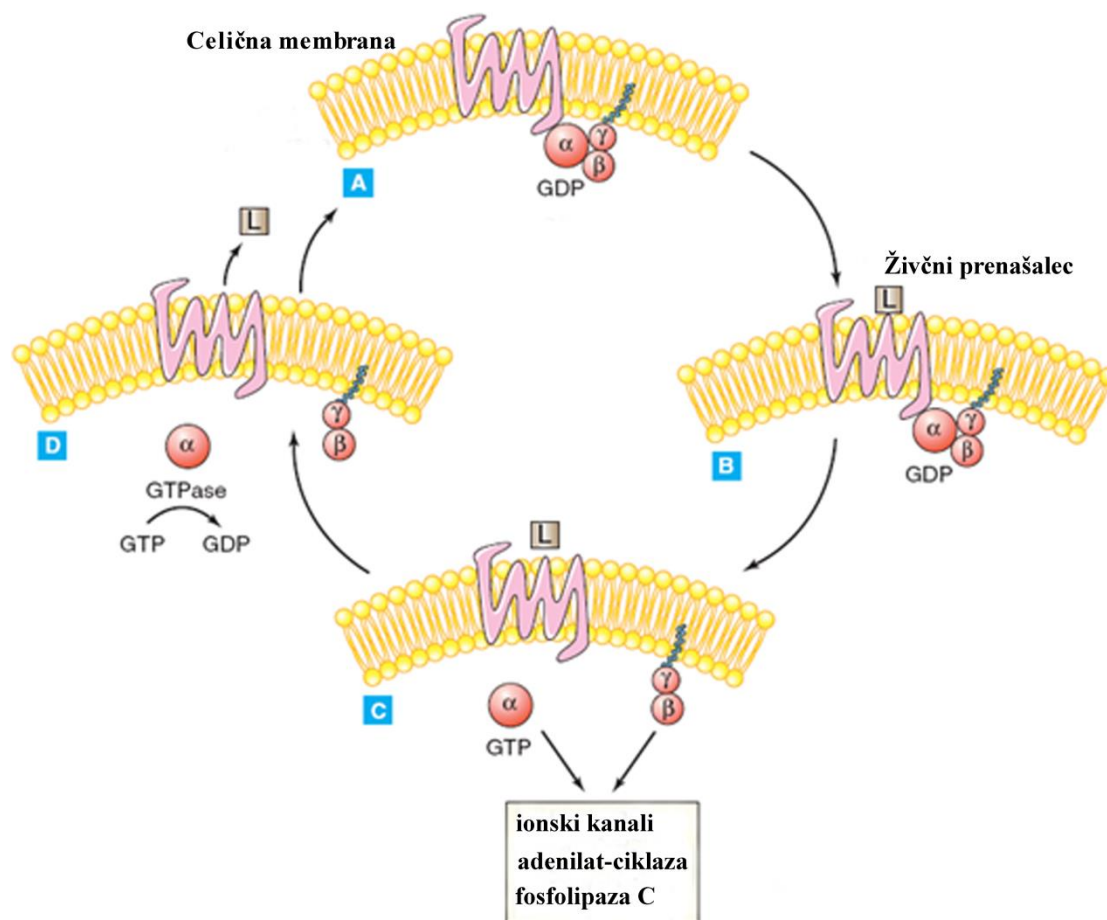
vplivom preko fosforilacijske kaskade, medtem ko je oblika BB modulirana predvsem za zagotavljanje energije za potrebe same celice (Crerar in sod., 1995). Glikogen fosforilaza je poleg z AMP alosterično uravnavana tudi z ATP in glukozo-6-fosfatom (Bollen in sod., 1998; Mutalik in Venkatesh, 2005). Sintezo glikogena katalizira glikogen sintaza (GS), ki se izraža po vseh delih možganov in jo najdemo tako v astrocitih, kot tudi v nevronih (Inoue in sod., 1988; Pellegrini in sod., 1996). Višje ravni izražanja so bile opažene v astrocitih (Pellegrini in sod., 1996). Glikogen sintaza je alosterično regulirana z ADP, ATP, fosfatnimi ioni in glukozo-6-fosfatom (Ferrer in sod., 2003; Mutalik in Venkatesh, 2005). Vloga glikogena v možganih še ni povsem pojasnjena, vemo pa, da se zelo hitro presnavlja (Hertz in sod., 2007). Glikogen je preko glikogenskega obvoza dinamičen vir energije (Walls in sod., 2009). Glikogenski obvoz je pot glukoze, ki se iz glikogena sprošča, hkrati pa tudi porablja (Dienel in sod., 2007; Shulman in sod., 2001; Swanson, 1992). Raziskave kažejo, da mobilizacija glikogena iz astrocitov lahko vzdržuje delovanje živčevja med hipoglikemijo (Choi in sod., 2003) in v času povečane nevrnske aktivnosti (Brown in Ransom, 2007; Cruz in Dienel, 2002; Ransom in Fern, 1997; Suh in sod., 2007a; Swanson, 1992). Pomanjkanje spanja vodi do zmanjšanja zalog glikogena (Kong in sod., 2002). Preko glikogena se v astrocitih presnavlja kar 40 % glukoze (Walls in sod., 2009). V patoloških razmerah, ko je na primer hipoglikemija, glikogen omogoča preživetje nevronov (Ransom in Fern, 1997; Suh in sod., 2007b). Glikogen v astrocitih je pomemben tudi ob hipoksiji. Takrat je respiratorna aktivnost v mitohondrijih zmanjšana (Chavez in sod., 1995) in anaerobna glikoliza postane pomembnejša od oksidativne fosforilacije. Zveča se vnos glukoze v astrocite (Vega in sod., 2006). Z glikolizo nastaja manj ATP kot pri oksidativni fosforilaciji, zato astrociti v hipoksičnih razmerah uporabijo rezervo glukoze iz glikogena (Callahan in sod., 1990; Marris in Juurlink, 1999; Niitsu in sod., 1999). Glikogen si lahko predstavljamo kot energijski pufer s kratkoročnim delovanjem, ki je v pomoč pri premeščanju energijskih potreb možganov. Manj verjetno je, da glikogen služi kot energijska rezerva za daljša obdobja pomanjkanja glukoze (Brown in sod., 2003). Glikogen pa ni le energijska rezerva, ampak tudi vir ogljika za sintezo glutamina, preko karboksilacije piruvata v astrocitih, glutamin pa je prekursor za glutamat (Gibbs in sod., 2006; Hertz in sod., 2003).

Tudi oligodendroglija metabolno podpira nevrone, njena disfunkcija pa lahko pomembno vpliva na nevrodegeneracijo (Lee in sod., 2012). Znano je, da astrociti sodelujejo z oligodendrociti pri privzemu glukoze iz kapilar, mobilizaciji glikogena in sproščanju laktata ob nevrnskih potrebah (Barros, 2013).

## 2.4 ADRENERGIČNI RECEPTORJI NA ASTROCITIH

Poznamo adrenergične receptorje  $\alpha$  in  $\beta$ . Delimo jih glede na vrsto proteina G, ki ga vežejo. Ob stimulaciji pride do konformacijske spremembe receptorja, kar aktivira G-proteine. V neaktivnem stanju je G-protein heterotrimer, sestavljen iz  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$  podenote,

na  $\alpha$  podenoto pa je vezan gvanozin difosfat (GDP). Po aktivaciji proteina G se GDP fosforilira v gvanozin trifosfat (GTP). To povzroči konformacijsko spremembo, pri kateri  $\alpha$  podenota disociira od  $\beta\gamma$  podenote. Ločeni podenoti nato delujeta na encime in ionske kanale ter s tem omogočita prenos signala (Slika 2) (Siegel in sod., 2006). Receptorji beta aktivirajo adenilat-ciklazo ali  $K^+$  kanale, oboje preko  $G_s$ , vendar poteka aktivacija  $K^+$  kanalov neodvisno od aktivacije adenilatne ciklaze (Kume in sod., 1994). Receptor  $\beta_2$  sproži aktivacijo izmenjevalca  $Na^+/H^+$  celo neodvisno od  $G_s$  (Barber in Ganz, 1992). Stimulacija receptorjev  $\alpha_1$  aktivira fosfolipazo C in posledično tvorbo sekundarnih prenašalcev inozitol-trifosfata (IP3) in diacilglicerola (DAG) (Nestler in sod., 2001; Perez in sod., 1993). Receptorji  $\alpha_2$  inhibirajo adenilatno ciklazo preko  $G_i$  (Cotecchia in sod., 1990). Astrociti izražajo adrenergične receptorje  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$  in v manjši meri  $\beta_1$  (Hertz in sod., 2004; Hertz in sod., 2010; Sutin in Shao, 1992). Aktivacija adrenergičnih receptorjev z noradrenalinom v astrocitih zviša raven cAMP preko adenilat-ciklaze, kar verjetno povzroči razgradnjo glikogena (Pellerin in sod., 1997). Raziskave z antagonistami in agonisti so pokazale, da noradrenalin na astrocite deluje preko adrenergičnih receptorjev  $\beta$  in  $\alpha_2$ , pa tudi  $\alpha_1$  (Subbarao in Hertz, 1990). Znano je, da noradrenalin z vezavo na receptorje  $\beta$  poveča koncentracijo cAMP (Wallukat, 2002). Adrenergičnim receptorjem v astrocitih so pripisovali pomen pri preskrbi glukoze za nevrone (Stone in Ariano, 1989), vendar nekatere raziskave kažejo, da glikogenoliza v kulturah astrocitov omogoči predvsem sproščanje laktata in ne glukoze (Dringen in sod., 1993). Noradrenalin preko receptorjev  $\alpha_1$  in  $\alpha_2$  vpliva tudi na oksidativno presnovo glukoze v Krebsovem ciklu (Subbarao in Hertz, 1991). V astrocitih so odkrili bifazni učinek noradrenalina na vsebnost glikogena. Poleg kratkoročne razgradnje glikogena noradrenalin dolgoročno stimulira resintezo tega polimera (Pellerin in sod., 1997). Dolgoročna resinteza glikogena po začetni glikogenolizi omogoča, da se dovolj glikogena shrani kot rezerva (Magistretti, 2006).



**Slika 2. Delovanje proteina G po aktivaciji adrenergičnih receptorjev** (povzeto po Nestler in sod., 2001)  
Ob stimulaciji adrenergičnih receptorjev pride do konformacijske spremembe receptorja, kar aktivira proteine G. (A) V neaktivnem stanju je protein G heterotrimer, sestavljen iz podenot  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$ , na podenoto  $\alpha$  je vezan gvanozin difosfat (GDP). Po aktivaciji proteina G (B) se GDP fosforilira v gvanozin trifosfat (GTP). To povzroči konformacijsko spremembo, pri kateri podenota  $\alpha$  disocira od podenote  $\beta\gamma$  (C). Ločeni podenoti nato delujeta na encime in ionske kanale ter s tem omogočita prenos signala. (D) GTP-aza prekine signaliziranje in omogoči premestitev disocirane podenote na prvotno mesto (A).

**Figure 2. G-protein functioning of adrenergic receptors**

Conformational change occurs when adrenergic receptors are stimulated, which then activates G-proteins. (A) G-protein is in inactive state heterotrimer, composed from  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. There is GDP bound to  $\alpha$  subunit. When G-protein is activated (B), GDP is phosphorylated to GTP. This causes conformational change and  $\alpha$  subunit dissociates from  $\beta\gamma$  subunit (C). Dissociated  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits enable signal transduction by affecting enzymes and ion channels. (D) GTP-ase can stop signalling and enables translocation of dissociated subunit on its original space (A).

Receptorji  $\beta$  aktivirajo adenilat-ciklazo ali  $K^+$  kanale (Kume in sod., 1994). Receptorji  $\alpha_1$  aktivirajo fosfolipazo C, kar sproži tvorbo sekundarnih prenašalcev inozitol-trifosfata (IP3) in diacilglicerola (DAG) (Harvey L, 2000) ali pa aktivirajo fosfolipazo A2 in s tem tudi  $Ca^{2+}$  kanale (Perez in sod., 1993).

## 2.5 INZULIN IN IGF-1 V MOŽGANIH

Količina glikogena je v astrocitih uravnavana s številnimi dejavniki, vključno s hormoni (Magistretti, 1988; Wiesinger in sod., 1997). Inzulinski receptorji so razporejeni po vsem centralnem živčnem sistemu (Havrankova in sod., 1978) in so prisotni tudi v astrocitih (Heni in sod., 2011; Zhu in sod., 1990). Predvidevajo, da v možganih nastane zelo malo ali pa nič inzulina (Banks, 2004; Woods in sod., 2003), lahko pa prehaja skozi cirkumventrikularno regijo, kjer je oslABLJENA krvno-možganska pregrada (Weindl in Sofroniew, 1981), ali pa z receptorji posredovanim aktivnim transportom (Banks, 2004; Baskin in sod., 1987; Baura in sod., 1993; Schwartz in sod., 1990; Steffens in sod., 1988). Raziskave nakazujejo, da je delovanje inzulina potrebno za preživetje nevronov (Schubert in sod., 2003), regulacijo vnosa hrane (Bruning in sod., 2000; Rodin in sod., 1985; Woods in sod., 1979) in ima vlogo pri mišljenju in tvorbi spomina (Benedict in sod., 2007; Craft in sod., 1999; Craft in sod., 2012; Kern in sod., 2001). Domnevajo, da pomanjkanje inzulina pri diabetesu prispeva k nevrološkim in psihiatričnim zapletom (Kodl in Seaquist, 2008; McEwen in sod., 2002; Reagan, 2007). Za možgane človeka so pokazali, da koncentracija inzulina in gostota receptorjev za inzulin pada s starostjo (Frölich in sod., 1998). Pri Parkinsonovi bolezni se ob propadanju nevronov v substanci nigri zmanjša tudi količina receptorja za inzulin v tem področju (Takahashi in sod., 1996). Pri pacientih z Alzheimerjevo boleznijo so ravni inzulina v plazmi višje, v cerebrospinalni tekočini pa nižje, v primerjavi s kontrolno skupino (Craft in sod., 1998; Gil-Bea in sod., 2010).

Med inzulinskimi receptorji na periferiji in v CZS so razlike. Inzulinski receptor, prisoten na nevronih, ima nekoliko manjšo molekularno maso kot tisti, ki je prisoten na celicah glije in na zunaj osrednjega živčevja. Nevronski inzulinski receptor ni podvržen zniževanju ravni izražanja, če je izpostavljen visokim koncentracijam inzulina (Gerozissis, 2003; Lizcano in Alessi, 2002). Inzulin v astrocitih aktivira PI3K/Akt signalno pot, ki je vseskozi endogeno aktivirana pod bazalnimi pogoji, stimulacija astrocitov z inzulinom pa jo še ojači. Dve tretjini inzulinskih receptorjev je v astrocitih v obliki izoforme A, eno tretjino receptorjev pa je izoforme B. Izoforma B ima poleg inzulina veliko afiniteto za vezavo tudi za IGF-2. Navzdol po signalni poti so v humanih astrocitih zaznali IRS-1 in IRS-2 (Heni in sod., 2011).

Inzulin je najmočnejši stimulator privzema glukoze in sinteze glikogena zunaj osrednjega živčevja, kjer je bilo narejenih tudi največ študij. Vezava inzulina na inzulinski receptor aktivira tirozin kinazo, ki fosforilira tirozinske ostanke endogenega substrata (Holman in Kasuga, 1997; Moule in Denton, 1997). Po fosforilaciji se lahko aktivirajo tri večje znotrajcelične poti, ki so posredovane s fosfolipazo C (PLC), fosfoinozitol-3-kinazo (PI3K) in z mitogenim proteinom aktivirano proteinsko kinazo (MAPK) (Gerozissis, 2003).

Inzulinu podoben rastni faktor (IGF-1) je po strukturi in biološki aktivnosti zelo podoben inzulinu. Receptorji obeh proteinov imajo skupno PI3K/Akt pot (Heni in sod., 2011; Werner in sod., 2008). IGF-1 lahko prehaja krvno možgansko pregrado (Armstrong in sod., 2000), IGF-1 receptorji pa se izražajo v astrocitih in nevronih (Ocrant in sod., 1988). Med inzulinom in IGF-1, ter njunima receptorjema, obstajajo medsebojne povezave v delovanju (Werner in sod., 2008). Inzulin in IGF-1 imata verjetno vlogo pri uravnavanju življenjske dobe kvasovk in miši (Cheng in sod., 2005), disfunkcija njunih poti pa lahko prispeva k pospešenemu propadu nevronov pri Alzheimerjevi in Parkinsonovi bolezni (Bassil in sod., 2014).

Povišane koncentracije inzulina v celičnih kulturah astrocitov pospešujejo celično rast (Kum in sod., 1992). Dodajanje inzulina ali IGF-1 celičnim kulturam astrocitov stimulira sintezo glikogena (Dringen in Hamprecht, 1992; Hamai in sod., 1999; Kum in sod., 1992). Mehanizem delovanja inzulina in IGF-1 v astrocitih še ni pojasnjen. Ni pokazano ali inzulin stimulira privzem glukoze v astrocite (Hamai in sod., 1999; Wiesinger in sod., 1997). V naši študiji smo se tega še neraziskanega področja lotili s tehniko FRET (Prenos energije z resonanco fluorescence) in glukoznim nanosenzorjem, s katerim lahko dinamično merimo koncentracije glukoze v astrocitu z veliko časovno ločljivostjo (Bittner in sod., 2010).

## 2.6 FRET – PRENOS ENERGIJE Z RESONANCO FLUORESCENCE

Prenos energije z resonanco fluorescence je od razdalje odvisen fizikalni proces, pri katerem se energija prenese brez sevanja z molekule donorja na molekulo prejemnika, ki ni nujno, da je fluorescenten (Jares-Erijman in Jovin, 2003). Prenos energije poteče ob ustreznem spektru svetlobe, primerni bližini in orientaciji molekul. Donorski in akceptorski fluorofori za mikroskopijo FRET izhajajo iz avtofluorescentnega proteina GFP (Sekar in Periasamy, 2003). S FRET lahko opazujemo inter- in intramolekularne razdalje v živih celicah v velikostnem razredu 1-10 nm (Jares-Erijman in Jovin, 2003).

### 2.6.1 Glukozni nanosenzor - FLII12Pglu-700 $\mu\Delta$ 6

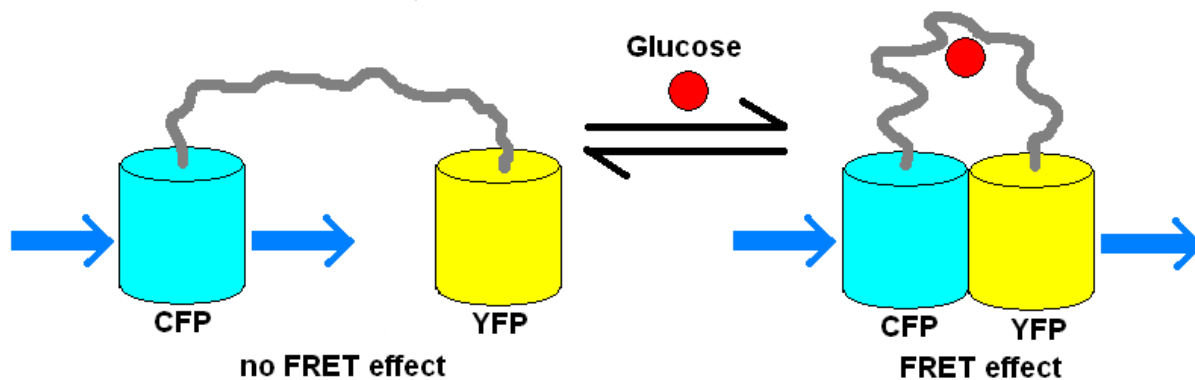
Prvi nanosenzor za meritve koncentracije glukoze v živih celicah je bil razvit leta 2003. Nanosenzor je sestavljen iz bakterijskega periplazemskega vezavnega proteina (angl. »bacterial periplasmic-binding protein«, PBP). PBP spadajo v obsežno skupino proteinov, ki lahko specifično in z visoko afiniteto vežejo širok spekter ligandov. Nekateri imajo ključno vlogo kot senzorji pri kemotaktičnem gibanju bakterij (Fehr in sod., 2002). Po vezavi spremenijo konformacijo in so zato primerni za detekcijske sisteme nanosenzorjev (Deuschle in sod., 2005). Za glukozni nanosenzor je bil. glukozno-galaktozno vezavni protein (angl. »Glucose-galactose binding protein«, GGBP), vzet iz kemotaktičnih receptorjev bakterije *E. coli* (Takanaga in sod., 2008). Fluorescentna proteina sta vezana eden na N-in drugi na C- konec GGBP proteina (Fehr in sod., 2002). Najpogostejši par



fluorescentnih proteinov sta rumeni fluorescentni protein (angl. »yellow fluorescent protein«, YFP), kot donor, in modrozeleni fluorescentni protein kot prejemnik (angl. »cyan fluorescent protein«, CFP) (Fehr in sod., 2003).

Med prvimi glukoznimi nanosenzorji, ki so omogočali meritve ravni glukoze *in vivo*, je bil nanosenzor FLIPglu-600 $\mu$ . Slabosti nanosenzorja sta bila nizko razmerje med signalom in šumom ter ozko območje občutljivosti (Fehr in sod., 2003). Robustnejše nanosenzorje so izdelali tako, da so najprej zamenjali na pH in klorid občutljiv eYFP s citrinom (Griesbeck in sod., 2001) ter s krajšanjem povezave med fluorescentnima proteinoma (Deuschle in sod., 2005).

Pri našem delu smo uporabljali FLII12Pglu-700 $\mu$  $\Delta$ 6, ki zanesljivo zazna koncentracije glukoze med 0,05 in 9,6 mM (Takanaga in sod., 2008). Poenostavljena shema glukoznega nanosenzorja je predstavljena na Sliki 3.



**Slika 3. Glukozni nanosenzor FLII12Pglu-700 $\mu$  $\Delta$ 6**

Glukozni nanosenzor je sestavljen iz osrednjega dela GGBP, ki veže glukozo, in dveh fluorescentnih proteinov – CFP in YFP. Po vezavi glukoze (ligand, na sliki rdeč krog) na GGBP pride do konformacijske spremembe globularnih domen GGBP. Vezava glukoze spremeni razdaljo med fluorescentnima proteinoma CFP (moder valj) in YFP (rumen valj) na N- in C- koncu, ki sta vsak na svoji globularni domeni (Fehr in sod., 2002; Takanaga in sod., 2008).

**Figure 3. Glucose nanosensor FLII12Pglu-700 $\mu$  $\Delta$ 6**

Glucose nanosensor is composed from central part, GGBP, which binds glucose, and two fluorescent proteins – CFP and YFP. After glucose (red circle) binding to GGBP, conformational change occurs in globular domains of GGBP. Glucose binding causes change of distance between fluorescent proteins CFP (blue) and YFP (yellow), which are bound on N- and C- ends of globular domains.

### **2.6.2 Laktatni nanosenzor – Laconic**

Laconic (angl. »LACtate Optical Nano Indicator from Cecs«) je prvi nanosenzor za dinamično spremljanje laktata v posamezni živi celici. Laconic je sestavljen iz laktat-vezavnega proteina LldR iz bakterije *E. coli*, modro-zelenega fluorescenčnega proteina mTFP, ki deluje kot donor, in rumenega fluorescenčnega proteina Venus, ki je prejemnik. Laktatni nanosenzor je specifičen za vezavo L-laktata. Vezava L-laktata na nanosenzor povzroči povečanje razdalje med Venus in mTFP, kar se kaže kot znižanje emisije Venus in zvišanje emisije mTFP, ter posledično znižanje razmerja Venus/mTFP. Nanosenzor lahko zazna koncentracije laktata med 1  $\mu$ M in 10 mM (San Martin in sod., 2013).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 RAZTOPINE, KEMIKALIJE IN MEDIJI**

##### **3.1.1 Hranilni medij za celično kulturo**

Fetalni goveji serum (10 %), Na-piruvat (1 mM), L-glutamin (2 mM), mešanica antibiotikov ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) penicilina in streptomicina, DMEM D5671 (angl. »Dulbecco's modified Eagle's medium«, medij za gojenje astrocitov) z visoko vsebnostjo glukoze ( $4500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Končno sterilizacijo medija smo izvedli s filtracijo skozi membranski filter s premerom  $0,2 \mu\text{m}$  in ga hranili v hladilniku pri  $4^\circ \text{C}$ .

##### **3.1.2 Medij za izolacijo celic**

L-glutamin (2 mM), mešanica antibiotikov ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) penicilina in streptomicina, BSA (angl. »Bovine serum albumine«, goveji serumski albumin) ( $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), medij Leibovitz (L-15).

##### **3.1.3 Zunajcelične raztopine**

NaCl (131,8 mM), KCl (5 mM), HEPES (N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-etansulfonska kislina) (10 mM),  $\text{MgCl}_2$  (2 mM) (Kemika, Zagreb, Hrvaška),  $\text{CaCl}_2$  (1,8 mM) (Riedel De Haen AG, Seelze, Hannover, Nemčija),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,5 mM),  $\text{NaHCO}_3$  (5 Mm); pH smo uravnali z NaOH na 7,2. Glukozo smo dodali raztopini v koncentraciji 3 mM. Zunajcelične raztopine s koncentracijo 0 mM in 10 mM D-glukoze smo pripravili z uravnavanjem koncentracije NaCl, tako da smo ohranili željeno osmolarnost. Osmolarnost zunajcelične raztopine je bila 295-305 mOsm. Osmolarnost smo merili z ozmometrom Osmomat 030 (Gonotech GmbH, Nemčija).

##### **3.1.4 Rastni medij za gojenje bakterij LB (angl. »Lysogeny broth« oz. Luria-Bertani«)**

Tripton (10 %), kvasov ekstrakt (0,5 %), NaCl (1 %) in deionizirana in sterilizirana voda. Medij smo avtoklavirali pri  $121^\circ \text{C}$  25 minut, kar je v skladu z predpisi sedme izdaje Evropske farmakopeje.

##### **3.1.5 Medij za transfekcijo celic**

Medij za transfekcijo celic je enak hranilnemu mediju za celične kulture, ne vsebuje pa seruma in antibiotikov.

Za odlepljanje celic od podlage smo uporabili raztopino tripsina-EDTA.

### 3.1.6 Plazmidna DNA

Pri poskusih smo uporabljali naslednji plazmidni DNA (pDNA), ki kodirata 2 različna nanosenzorja. Glukoзни nanosenzor: plazmid FLII12Pglu-700 $\mu\Delta$ 6, pDNA (Addgene plasmid 17866, <https://www.addgene.org/17866/>) (Takanaga in sod., 2008). Laktatni nanosenzor: plazmid pCMV/myc/nuc (Addgene plasmid 46307, <https://www.addgene.org/46307/>) (San Martin in sod., 2013).

Če ni drugače navedeno, je vir kemikalij Sigma Aldrich (St. Louis, Montana, ZDA). Medij LB smo kupili od Biolife (ZDA). Komercialno dostopno metodo za izolacijo plazmida smo kupili od Promega (ZDA). Vse kemikalije so bile analitske kakovosti.

## 3.2 METODE CELIČNE IN MOLEKULARNE BIOLOGIJE

### 3.2.1 Celična kultura

Za pripravo celične kulture smo uporabili podganje samice linije Wistar. Živali so bile žrtvovane pri starosti dva dni. Priprava celic je potekala v skladu z zakonodajo o delu na izoliranih tkivih, organih in truplih predhodno usmrčenih živali po 22.a členu Zakona o zaščiti živali (ZZZiv-UPB3, Ur.l. RS, št. 38/2013 z dne 3. 5. 2013)

Izolacija celic je potekala po uveljavljenem postopku (Schwartz in Wilson, 1992). Po dekapitaciji živali smo zarezali kožo glave po sredini proti prednjemu delu in pred ušesi. Na enak način smo prerezali lobanjo, nato pa zajeli možgane ter jih prestavili v medij za izolacijo celic. Možgane smo previdno razprli med možganskima poloblama in z obeh odstranili hipokampus. Odstranili smo možgansko ovojnico. Možgansko tkivo smo mehansko razbili z uporabo 10 ml Pasteurjevih pipet. Sledila so tri zaporedna centrifugiranja možganskega tkiva po vsakokratni odstranitvi supernatanta. Pred zadnjim centrifugiranjem smo možgansko tkivo potiskali skozi igle različnih premerov in nato skozi filter (75  $\mu$ m). Celice smo zalili s hranilnim medijem z visoko vsebnostjo glukoze. Hranilni medij smo menjali vsakih 48 ur. Celice smo gojili pri 37 °C, 95 % zračni vlagi in 5 % CO<sub>2</sub>. Ko so se celice dovolj namnožile, smo jih stresali čez noč in nato zamenjali medij; slednje smo ponovili trikrat. Po tretjem stresanju smo celice odlepili od podlage z EDTA in tripsinom ter celice prenesli v plastične epruvete za celične kulture s površino 10 cm<sup>2</sup>. Nato smo medij zopet menjali vsakih 48 ur. Dva do tri dni pred poskusi smo celice nasadili na steklene krovnike s premerom 22 mm, ki smo jih pred tem premazali s poli-L-lizinom.

Pri poskusih z noradrenalinom, kjer je posebej navedeno, smo uporabili gensko spremenjene astrocite miši z izbitim genom za Gd1l (D'Adamo in sod., 2002). Primarno celično kulturo smo prejeli na podlagi sodelovanja iz laboratorija raziskovalke D'Adamo z

Inštituta Dulbecco Telethon iz Milana. Proteomska analiza je pokazala, da imajo manjše izražanje možganskega tipa glikogen fosforilaze (neobjavljeni rezultati D'Adamo).

### 3.2.2 Izolacija pDNA iz bakterij

pDNA za glukozni in laktatni nanosenzor smo od dobavitelja dobili v bakterijah DH5 $\alpha$  (laboratorijski sev bakterije *E. coli*). Te smo nacepili v medij LB, ki smo mu dodali antibiotik ampicilin (1  $\mu$ M) ter stresali čez noč pri 37°C. Plazmidno DNA smo iz bakterij izolirali s komercialno dostopno metodo (Pure field Plasmid Midiprep system; Promega). Izolirano DNA smo shranili v 400  $\mu$ l deionizirane vode. Koncentracijo in čistost DNA smo določili s spektrofotometrom (Ultrospec 3100 pro, Amersham Bioscience, Švedska) in pripravek shranili pri -20 °C.

### 3.2.3 Vnos pDNA v sesalske celice – transfekcija

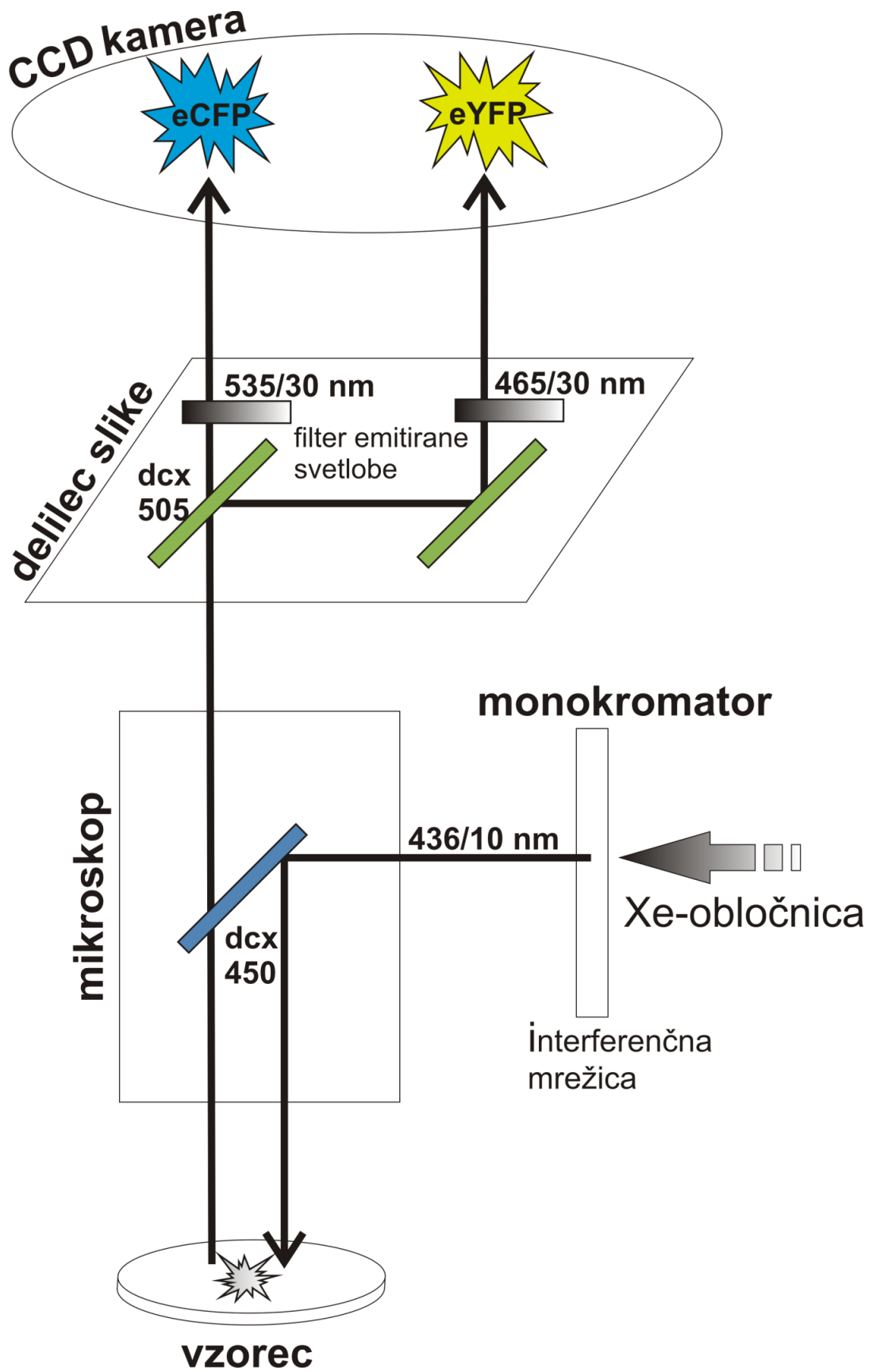
pDNA smo vnesli v astrocite z dvema različnima kationskima transfekcijskima reagentoma. Eden od reagentov za lipofekcijo je Lipofektamin v kombinaciji z reagentom Plus (Invitrogen, Life Technologies, ZDA). Postopek smo izvedli po navodilih izdelovalca: 1  $\mu$ g DNA smo razredčili v 100  $\mu$ l medija za lipofekcijo. Dodali smo 6  $\mu$ l reagenta Plus, da so se tvorili kompleksi med DNA in reagentom Plus in inkubirali 15 min na sobni temperaturi. 4  $\mu$ l reagenta Lipofektamin smo razredčili s 100  $\mu$ l medija za lipofekcijo. Vse komponente smo med seboj zmešali in spet inkubirali 15 minut. Celice, ki so bile pritrjene na krovniku premera 22 mm, smo sprali z medijem za lipofekcijo in dodali DNA, vezano na Lipofektamin. Inkubirali smo 3 ure pri 37 °C, da je potekla lipofekcija. Po inkubaciji smo dodali 30  $\mu$ l seruma (Ultroser G, Biosepra).

V večini poskusov smo transfekcijo izvedli z reagentom Fugene 6 (Roche, kasneje Promega): 1  $\mu$ g DNA smo razredčili v 100  $\mu$ l medija za lipofekcijo ter dodali 3  $\mu$ l reagenta Fugene 6, nato pa komponente nežno premešali in dodali na celice po 15 minutni inkubaciji ter predhodnem spiranju celic z medijem za lipofekcijo. Že v 24 urah je prišlo do transkripcije in translacije glukoznega plazmida, kar smo lahko opazovali s pomočjo emitirane svetlobe fluorescentnih proteinov YFP in CFP. Laktatni senzor se je primerno izrazil po 15 urah.

## 3.3 FLUORESCENTNA MIKROSKOPIJA

Slike celic s fluorescentnim nanosenzorjem smo zajemali z mikroskopom Zeiss Axiovert 135 (Zeiss, Oberkochen, Nemčija), opremljenim s kamero CCD (angl. »Charge coupled device«, integrirano vezje, svetlobni detektor manjših kamer) in monokromatorjem Polychrome IV (Till Photonics, Graefelfing, Nemčija) za monokromatski vir svetlobe z valovno dolžino 436/10 nm (Slika 4). Razmerje intenzitet emisijske svetlobe YFP/CFP smo posneli z uporabo dveh emisijskih filtrov (465/30 nm – modrozelen in 535/30 nm –

rumen) in delilca slike (Optical Insights, Tucson, Arizona, ZDA). Zajemanje slik je potekalo v 10 sekundnih časovnih intervalih in pri sobni temperaturi (22-24°C), čas odprtosti zaslonke je bil 0,7 s. Uporabili smo vodni imerzijski objektiv C-Apochromat 63x/1,2 NA (Zeiss, Oberkochen, Nemčija). Krovnik s transfeciranimi astrociti smo namestili v kamrico za snemanje na objektni mizici. V vsakem poskusu je bila posneta 1 celica. Pred vsakim eksperimentom smo na celice nanесли 300  $\mu$ L zunajcelične raztopine. Inzulin (1  $\mu$ M), IGF-1 (100 nM), izoprenalin (Iso, 200  $\mu$ M), fenilefrin (PE, 100  $\mu$ M), ionomicin (10  $\mu$ M) in noradrenalin (NA, 200  $\mu$ M) smo dodali zunajcelični raztopini. Pri delu z wortmanninom (100 nM), smo celice inkubirali 15 min v tem selektivnim inhibitorju PI3K. Pri poskusih z pikropodofilotoksinom (100 nM), IGF-1 kinaznim inhibitorjem, smo celice preinkubirali 1 h. Pri delu smo uporabljali tudi novejši fluorescenčni mikroskop (Zeiss Axio Observer.A1, Zeiss, Oberkochen, Nemčija) s CCD kamero in monokromatorjem Polychrome V (Till Photonics, Graefelfing, Nemčija) za monokromatski vir svetlobe z valovno dolžino 436/10 nm. Razmerje intenzitet emisijske svetlobe YFP/CFP smo posneli s pomočjo dveh emisijskih filtrov (465/30 nm – modrozelen in 535/30 nm – rumen) in delilcem slike (Optical Insights, Tucson, Arizona, ZDA). Zajemanje slik je potekalo v 10 sekundnih časovnih intervalih in pri sobni temperaturi (22-24°C), čas odprtosti zaslonke je bil 0,1 s. Uporabili smo vodni imerzijski objektiv C-Apochromat 63x (Zeiss, Oberkochen, Nemčija). Na sistemu z mikroskopom Zeiss Axiovert 135 so bili izvedeni poskusi z inzulinom in IGF-1, vsi ostali pa na sistemu z mikroskopom Zeiss Axio Observer.A1.



#### **Slika 4. Shema merilnega sistema za FRET (povzeto po Prebil, 2011)**

Vir svetlobe je ksenonska obločnica (Xe-obločnica), ki po prehodu skozi monokromator oddaja svetlobo valovne dolžine 436 nm. Le-ta se odbije skozi prvo dikroično zrcalo (dcx 450), ki odbija svetlobo valovne dolžine krajše od 450 nm, svetlobo daljših valovnih dolžin pa prepušča. Po osvetljevanju vzorca z valovno dolžino 436 nm pride do fluorescence in emisij CFP in YFP. Emitirana svetloba z valovno dolžino daljšo od 450 nm prehaja skozi dikroično zrcalo dcx 450, nato pa višje valovne dolžine daljše od 505 nm prehajajo skozi drugo dikroično zrcalo (dcx 505), krajše od 505 nm pa se odbijejo. V obeh primerih prehaja svetloba skozi dodatna zaporna filtra emitirane svetlobe (535/30 nm in 465/30 nm). Delilec slike tako omogoči razcep slike na dve sliki glede na valovno dolžino emitirane svetlobe. CCD kamera zajema optično sliko in jo prevede v digitalno informacijo, kar omogoča opazovanje slike na zaslonu računalnika in nadaljnjo analizo.

#### **Figure 4. Sheme of FRET measuring system**

The source of light is a xenon bulb. The light is passed through monochromator with wavelength 426 nm and then led to first dichroic mirror (dcx 450), which reflects wavelengths shorter than 450 nm, longer wavelengths are passed through. Object is then stimulated with wavelength of 436 nm, which produces fluorescence from CFP and YFP. Emission light with wavelength longer than 450 nm is passed to dichroic mirror dcx 450. Wavelengths longer than 505 nm are led through second dichroic mirror (dcx 505), wavelengths shorter than 505 nm are reflected. In both cases light is led through blocking filters of emission light (535/30 nm and 465/30 nm). This enables image splitter to split image in two images based on wavelength of emission light. CCD camera captures optical image and converts it to digital information, which enables image observation on computer screen and further analysis.

### **3.3.1 Superfuzijski sistem in dodajanje raztopin**

Za izmenjavo raztopin smo uporabili superfuzijski sistem VC-8 (Warner Instruments, Hamden, Connecticut, ZDA). Za doseganje enakomernega pretoka smo speljali raztopino iz 2 brizg v skupno izvodilo. Hitrost superfuzije raztopine je bila 10–14 ml.min<sup>-1</sup>. Metoda menjave raztopin s perfuzijskim sistemom ne vpliva na razmerje signala FRET (Prebil in sod., 2011). Pri poskusih z dodajanjem zunajcelične raztopine s pipeto smo 300 µL raztopine dodali že 300 µl raztopine v snemalno kamrico. Dodajanja zunajcelične raztopine glukoze s pipeto ne vpliva na spremembo razmerja FRET glukoznega nanosenzorja, kar je prikazano pri kontrolnih poskusih z inzulinom in IGF-1 (Slika 13, Slika 16). Prav tako metoda dodajanja zunajcelične raztopine s pipeto ne vpliva na FRET razmerje pri nanosenzorju Laconic, kar je opisano v legendi Slike 10.

### **3.3.2 Barvanje PAS (angl. »Periodic Acid-Schiff staining«)**

Citosolno koncentracijo glikogena smo detektirali z barvanjem po metodi PAS (Rosenberg in Dichter, 1985). Celice smo nasadili na krovnike premera 22 mm prevlečene s poli-L-lizonom dan pred eksperimentom. Po začetnem tretiranju (2 h odtegnitve glukoze, 2 h odtegnitve glukoze + 2 h okrevanja, 2 h odtegnitve glukoze + 2 h okrevanja z dodanim inzulinom (100 nM) ali IGF-1 (10 nM), smo celice sprali z ledeno mrzlim fosfatnim pufrom (PBS) in jih pritrdili pri sobni temperaturi s 3,7 % paraformaldehidom v 90 % etanolu (5 min), nato pa jih trikrat sprali z 70 % (vol/vol) etanolom. Pritrjene celice smo potem 30 min inkubirali pri sobni temperaturi v 1 % (wt/vol) jodovi(VII) kislini raztopljeni v 70 % etanolu in jih nato barvali 60 min pri sobni temperaturi v 0,5 % (wt/vol) bazičnem fuksinu raztopljenem v kislem alkoholu (etanol/voda/koncentrirana HCl, 80:19:1,



vol/vol/vol). Po barvanju smo celice trikrat sprali s 70 % etanolom in jih dehidrirali v absolutnem alkoholu. Končno fiksacijo smo izvedli s smolo Eukitt.

Slike smo posneli s konfokalnim mikroskopom Zeiss LSM 510 in oljnim imerzijskim objektivom Plan APOchromat (63x, NA = 1,4). Za ekscitacijo je bil uporabljen 543 nm He/Ne laser z emisijskim filtrom 560 nm. Slike so bile posnete sistematično z vzorčenjem po celotnem preparatu. Analizirane so bile celotne celice s posnetih slik. Kvantitativno analizo smo izvedli s programom LSM 510 (Zeiss, Nemčija). Povprečno intenzivnost fluorescence barvanja PAS posamezne celice smo določili s povprečenjem intenzitete vseh pikslov. Vedno smo vzeli horizontalni presek celice z najvišjo intenziteto fluorescence.

### 3.3.3 Imunocitokemija

Z namenom identifikacije ekspresije inzulinskega receptorja (IR) in IGF-1 receptorja (IGF1R) v podganjih astrocitech smo izvedli dvojno barvanje z uporabo primarnih zajčjih protiteles anti-IR (Abcam, ab175251), primarnih zajčjih protiteles anti-IGF1R (Abcam, ab131476), primarnih mišjih z vezavo na GFAP, sekundarnih kozjih protiteles z vezavo na zajčje konjugirana s fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, ZDA) in sekundarnih kozjih z vezavo na mišja konjugirana s fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor 488 (Molecular Probes).

Celice smo sprali s PBS in jih 15 min fiksirali s 4 % paraformaldehidom v PBS, potem pa še 10 min z dodanim Tritonom-X, oboje pri sobni temperaturi. Celice smo nato inkubirali v pufru PBS s 3 % govejega serumskega albumina (BSA, angl. »bovine serum albumine«) in 10 % kozjega seruma (angl. »goat serum«) v PBS pri 37 °C za 1 h. Celice smo nato inkubirali s primarnimi protitelesi proti GFAP (redčenje 1:100) v 3 % BSA v PBS pri 37 °C za 2 h. Celice smo nato sprali s PBS in jih inkubirali s protitelesi anti-IR ali anti-IGF1R v 3 % BSA v PBS pri 37 °C za 2 h. Potem smo celice sprali s PBS in jih barvali s sekundarnimi protitelesi, Alexa Fluor 546 in 488 (oboje redčeno 1:600) v 3 % BSA v PBS pri 37 °C za 45 min. Po spiranju s PBS smo krovnike s pomočjo tekočine (Light Antifade, Invitrogen, Eugene; OR, ZDA), ki omili bledenje, pritrdili na objektna stekelca. Slike smo posneli s konfokalnim mikroskopom LSM 510 (Zeiss, Nemčija) opremljenim s Plan APOchromat oljnim imerzijskim objektivom (63x, NA = 1,4). Za ekscitacijo smo uporabili laser 543 nm He/Ne z emisijskim filtrom pri 560 nm in 488 nm argonski laser z emisijskim filtrom pri 505-530 nm. Vsi poskusi so bili izvedeni pri sobni temperaturi.

Barvanje transporterja GLUT4 smo izvedli s primarnimi zajčjimi protitelesi (1:100, Abcam, ab654) z uporabo enakega protokola kot za barvanje GFAP inzulinskih in IGF-1 receptorjev, le da nismo uporabili detergenta Triton-X.

### 3.3.4 Analiza in statistično ovrednotenje podatkov

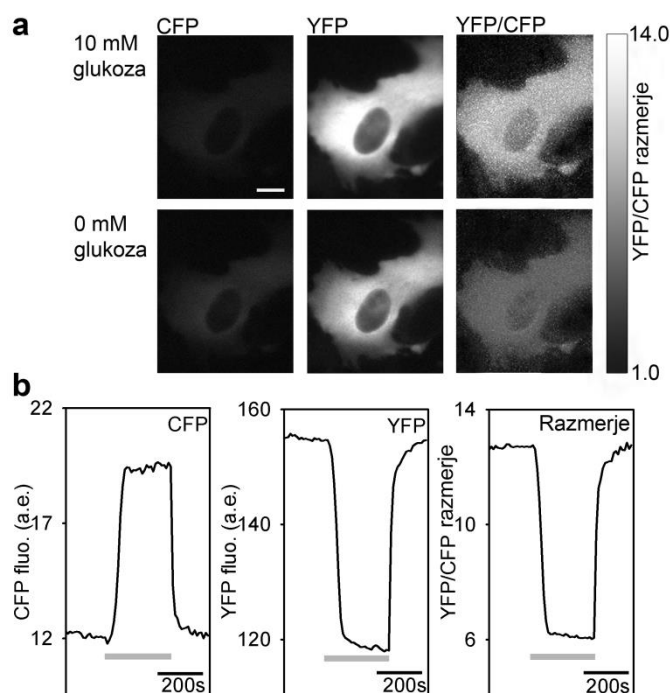
FRET signal, razmerje YFP/CFP, smo pridobili z integracijo razmerja preko celotne površine celice s Till Vision (sistem z Zeiss Axiovert 135 mikroskopom) ali pa programom Life Acquisition (sistem z Zeiss Axio Observer.A1 mikroskopom) (oba programa Till Photonics, Graefelfing, Nemčija). Koncentracija znotrajcelične glukoze je bila izračunana po že opisanem postopku (Prebil in sod., 2011). Časovni interval padanja smo izmerili kot čas padanja od 80 do 20 % maksimalne vrednosti. Podobno smo izmerili tudi časovni interval porasta signala FRET kot čas spremembe med 20 in 80 % maksimalne vrednosti z uporabo lastnega programa napisanega v okolju Matlab (Matworks, Natick, ZDA). Amplituda ( $a$ ) in časovna konstanta ( $\tau$ ) so pri poskusih z inzulinom in IGF-1 ter pri poskusih na mišjih astrocitih izračunane s programom SigmaPlot. Pri ostalih poskusih je amplituda izračunana z odštevanjem maksimalne dosežene vrednosti razmerja FRET (10 zajetih vrednosti) od bazne linije, časovna konstanta pa je izračunan s pomočjo programa SigmaPlot. Podatki so prilegani po naslednji enačbi:  $y_0 + a(1 - \exp(-t/\tau))$ , kjer je  $y_0$  začetna vrednost razmerja YFP/CFP. Maksimalni začetni porasti in padci so izračunani s pomočjo ročnega prileganja premice krivulji. Za analizo podatkov smo uporabljali program MS Excel ter program SigmaPlot. Sheme smo narisali v programu CorelDraw, slike pa sestavili v programu Adobe Photoshop. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  standardna napaka. Pri nekaterih posnetkih je bilo opazno bledenje fluorescentnih proteinov – take posnetke smo izravnali z lastnim programom za meritve, napisanem v okolju Matlab. Normalno porazdelitev podatkov smo preverili z uporabo testa Shapiro-Wilkinson. Za primerjavo dveh vzorcev je bil uporabljen Studentov t-test, razen če je posebej navedeno Mann-Whitney test vsote rangov. Razlike med več vzorci smo preverili s Kruskal-Wallis enosmerno analizo variance rangov ter testirali *post hoc* z Dunnovo metodo. Zvezdice pri izračunih statistične značilnosti so uporabljene na naslednji način:  $P < 0,5$  (\*);  $P < 0,01$  (\*\*);  $P < 0,001$  (\*\*\*)).

## 4 REZULTATI

### 4.1 URAVNAVANJE METABOLIZMA GLUKOZE IN LAKTATA PREKO ADRENERGIČNIH RECEPTORJEV

Z namenom študija metabolizma glukoze v posameznem astrocitu smo uporabili glukozni FLII12Pglu-700 $\mu\Delta$ 6 (Takanaga in sod., 2008) in laktatni nanosenzor Laconic (San Martin in sod., 2013). Prikazani rezultati vloge adrenergičnih receptorjev pri presnovi glukoze in laktata so del širše raziskave v sodelovanju z doc. dr. Nino Vardjan z Inštituta za patofiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Z uporabo CCD kamere in razdelilca slike smo simultano posneli emisijo CFP (ali mTFP) in YFP (ali Venus) signalov. Metodologija meritev D-glukoze in delovanje glukoznega nanosenzorja sta prikazana na Sliki 11. Celice smo najprej namestili v medij z 10 mM D-glukozo. Po spiranju s perfuzijo z 0 mM D-glukozo se intenziteta CFP signala zviša, YFP pa zniža. Znižanje razmerja YFP/CFP nakazuje na znižanje citosolne koncentracije glukoze. Zamenjava medija brez glukoze z 10 mM D-glukoze je privedlo do zvišanja razmerja FRET. Sklepamo, da glukoza vstopi v celico v manj kot 1 min (Slika 5).



**Slika 5. FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 razmerje FRET v izoliranem astrocitu**

(a) CFP in YFP emisijske slike prikazujejo ekspresijo FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 fluorescentnega nanosenzorja v astrocitu. Zgornja vrsta slik prikazuje astrocit v mediju z 10 mM D-glukozo, spodnja vrstica pa prikazuje isto celico po oblišanju z 0 mM D-glukozo. Merilo: 10  $\mu$ m. (b) Integracija razmerja preko celotne celice je bila uporabljena za opredelitev spremembe razmerja FRET. Celice so bile sprva oblite z 10 mM D-glukozo, nato pa so jih obličevali z 0 mM D-glukozo (sive črte). Sprememba koncentracije zunajcelične raztopine D-glukoze z 10 na 0 mM je povzročila povečanje intenzitete fluorescence CFP (leva slika) in znižanje

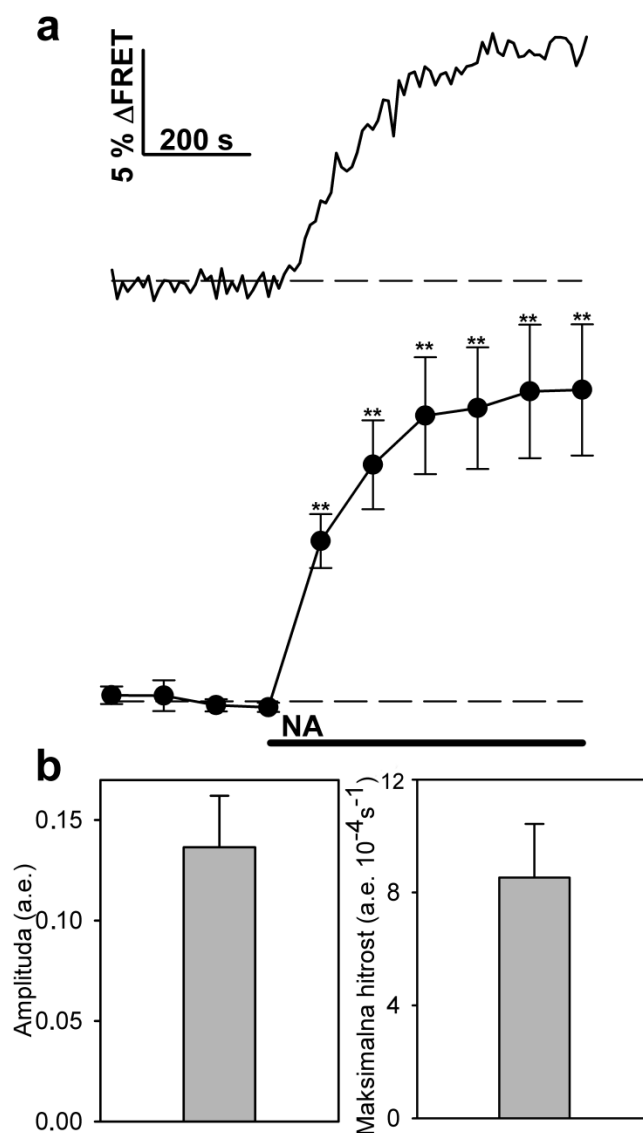
fluorecence YFP (srednja slika), posledično pa se je zmanjšalo tudi znižanje razmerja YFP/CFP (desna slika). Znižanje razmerja YFP/CFP pomeni tudi znižanje citosolne koncentracije glukoze. Nadaljnje oblikanje z 10 mM D-glukozo je povzročilo porast razmerja FRET zaradi zvišanja znotrajcelične D-glukoze zaradi vstopa glukoze v celico.

**Figure 5. FLII12GLU-700 $\mu$  $\Delta$ 6 FRET ratio in a cultured astrocyte**

(a) CFP and YFP emission images show the expression of the FLII12GLU-700 $\mu$  $\Delta$ 6 fluorescent nanosensor in an astrocyte. The upper panels show an astrocyte in the medium containing 10 mM D-glucose, the lower panels show the same cell after superfusion with 0 mM D-glucose. Scale bar: 10  $\mu$ m. (b) Integration of the ratio over the entire cell was used to quantify the change in the ratio. Superfusion of cells initially bathed in high-glucose medium (10 mM) with the medium containing 0 mM glucose (grey lines) induced an increase in the CFP fluorescence intensity (left panel) and a decrease in the YFP intensity (middle panel), which decreased the YFP/CFP ratio (right panel), indicating a decrease in the cytosolic glucose levels. Subsequent superfusion with 10 mM D-glucose induced an increase in the FRET ratio, indicating an increase of intracellular D-glucose due to glucose entry into the cell.

#### 4.1.1 Noradrenalin zviša znotrajcelično koncentracijo glukoze

Potrdili smo že objavljene rezultate, ki so bili pridobljeni z uporabo glukoznega nanosenzorja in stimulacijo celic z noradrenalinom (Prebil in sod., 2011). Amplituda odziva na noradrenalin je bila  $0,14 \pm 0,02$  a.e., časovna konstanta  $\tau = 253,1 \pm 59,8$  s, maksimalna hitrost porasta pa  $8,50 \cdot 10^{-4} \pm 1,67 \cdot 10^{-4}$  a.e.  $s^{-1}$ , vsi podatki so izračunani na podlagi odzivov  $9/21 = 42,9$  % odzivnih astrocitov (Slika 6).



**Slika 6. Noradrenalin zviša koncentracijo proste glukoze v astrocitu, ki izraža FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 FRET nanosenzor**

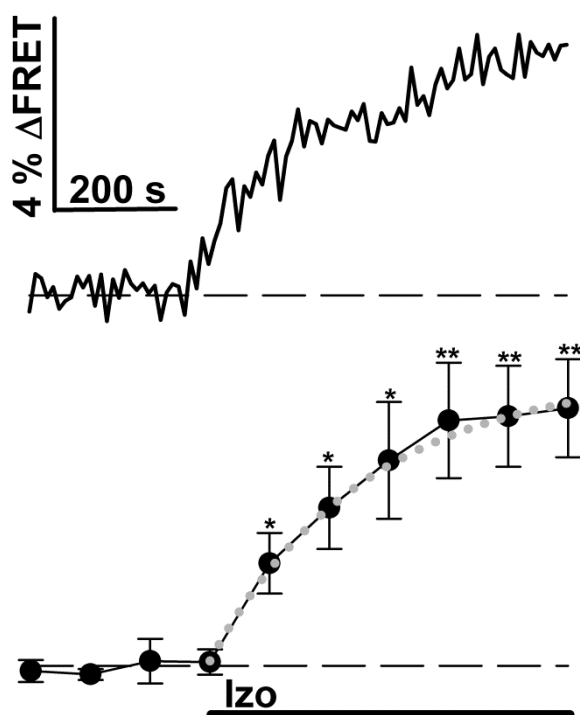
(a) Prikazan je reprezentativni posnetek stimulacije z noradrenalinom (NA, zgoraj) in povprečje odzivov 9 astrocitov (spodaj, 200  $\mu$ M, odzivnost 9/21 = 42,9 %). (\*\*P=0,01).  $\Delta FRET$  pomeni spremembo normaliziranega EYFP/ECFP razmerja. (b) Prikazana sta amplituda in maksimalna hitrost porasta pri stimulaciji z noradrenalinom.

**Figure 5. Noradrenaline stimulation increases cytosolic glucose concentration in astrocytes expressing FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 FRET based glucose nanosensor**

(a) Upper pannel shows representative signals and lower pannel shows mean response upon noradrenaline stimulation (NA) from 9 cells (200  $\mu$ M, responivenss 9/21 = 42.9 %). (\*\*P=0.01).  $\Delta FRET$  is change in normalized EYFP/ECFP ratio. (b) Amplitude and maximal rise rate after noradrenaline stimulation.

#### 4.1.2 Uravnavanje koncentracije glukoze in laktata preko adrenergičnih receptorjev $\alpha$ in $\beta$ v posameznem astrocitu

Celice smo stimulirali z izoprenalinom (200  $\mu\text{M}$ ) (Slika 7), agonistom za receptorje  $\beta$ . Raziskati smo želeli kinetiko presnove glukoze v astrocitu ob stimulacijo receptorjev  $\beta$ . Na stimulacijo z izoprenalinom se je odzvalo 18,8 % astrocitov (9/48). Povprečna amplituda odziva je bila  $0,055 \pm 0,011$  a.e., časovna konstanta, pridobljena s prileganjem eksponentne krivulje je bila  $\tau = 251,7 \pm 81,3$  s., maksimalna hitrost porasta pa je znašala  $6,24 \cdot 10^{-4} \pm 1,36 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ . Amplituda FRET odziva izoprenalina je manjša in se statistično razlikuje od amplitude noradrenalina ( $P=0,005$ ). Amplituda razmerja FRET z izoprenalinom predstavlja 40 % spremembe razmerja FRET z noradrenalinom.



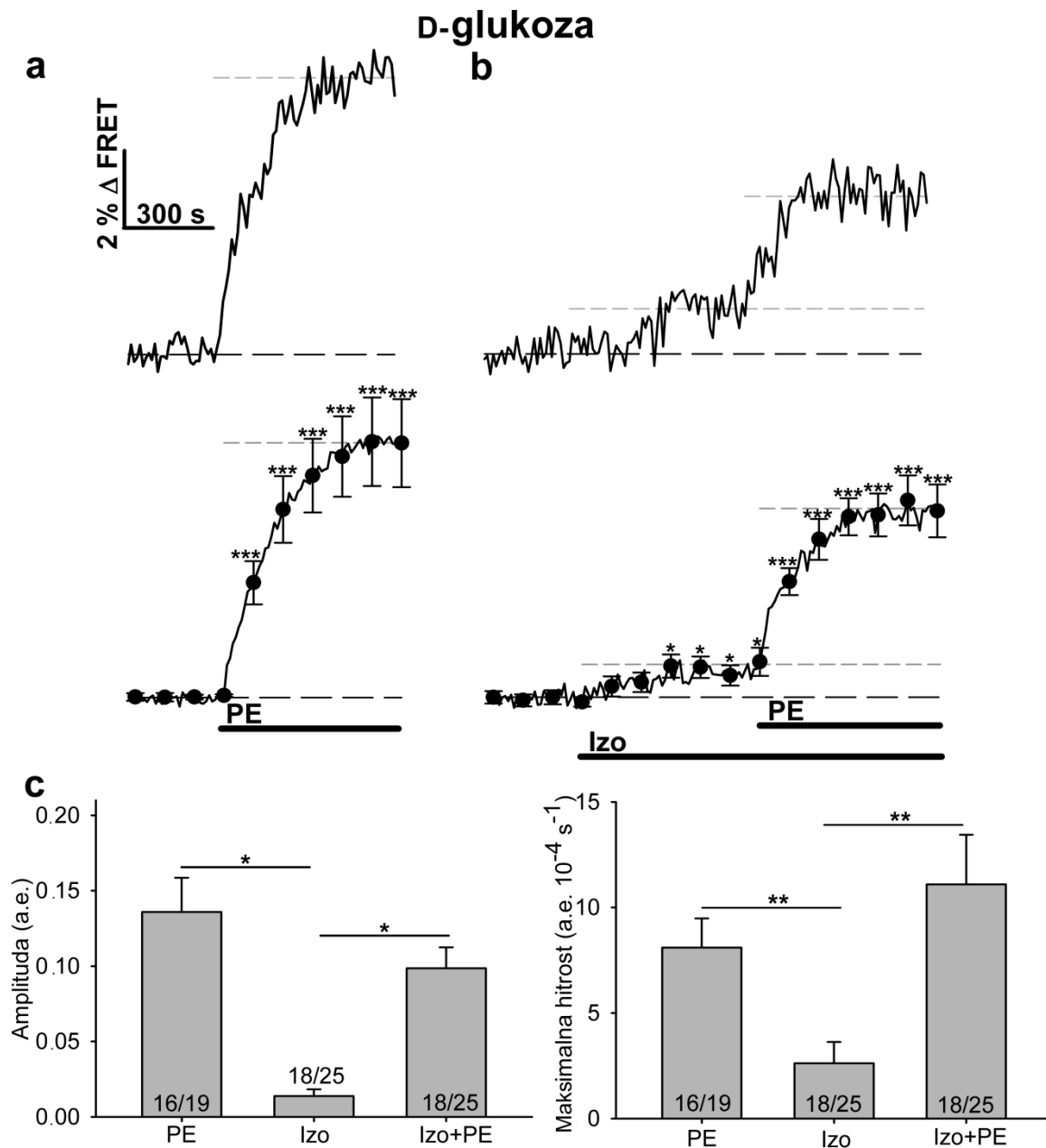
**Slika 7. Spremembe FLII12GLU-700 $\mu\text{A}6$  razmerja FRET v izoliranem astrocitu ob stimulaciji z izoprenalinom (200  $\mu\text{M}$ ), ki zviša koncentracijo citosolne glukoze**

Zgornja slika prikazuje reprezentativni posnetek odziva astrocita na izoprenalin. Spodnja slika prikazuje povprečje odzivov 9 celic (odzivnost 9/48 = 18,8 % astrocitov). Astroцитom smo po 300 s v zunajcelični raztopini s 3 mM D-glukozo dodali 200  $\mu\text{M}$  izoprenalin (Izo, črna črta), \* $P=0,05$ , \*\* $P=0,01$ . Siva prekinjena črta predstavlja eksponentno krivuljo, ki se prilega povprečju odzivov na izoprenalin.  $\Delta\text{FRET}$  pomeni spremembo normaliziranega EYFP/ECFP razmerja.

**Figure 7. FLII12GLU-700 $\mu\text{A}6$  FRET ratio rises in a cultured astrocyte upon isoprenaline (Izo) stimulation**

Astrocytes were stimulated with isoprenaline (Izo, 200  $\mu\text{M}$ , black line), selective  $\beta$  receptor agonist, which led to increase in intracellular glucose concentration. Upper pannel shows representative signal recorded from 1 cell and lower pannel shows mean response from 9 astrocytes (responsivness 9/48 = 18,8 %, \* $P=0,05$ , \*\* $P=0,01$ ). Integration of the ratio over the entire cell was used to quantify the ratio change. Grey dotted line represents exponential curve fitted to the average response of astrocytes.  $\Delta\text{FRET}$  is change in normalized EYFP/ECFP ratio

Astrociti izražajo receptorje  $\alpha$  in  $\beta$  (Hertz in sod., 2004; Hertz in sod., 2010; Sutin in Shao, 1992). Najprej smo želeli preveriti, kako se odzivajo na stimulacijo s fenilefrinom, selektivnim agonistom receptorjev  $\alpha_1$ . Zanimalo nas je tudi ali preinkubacija z izoprenalinom ojača učinke fenilefrina. Celice smo najprej stimulirali s fenilefrinom (Slika 8a). Na fenilefrin je bilo odzivnih  $16/19 = 84,2\%$  astrocitov, dosežena amplituda je bila  $0,14 \pm 0,02$  a.e, časovna konstanta  $\tau = 251,4 \pm 42,7$  s, maksimalna hitrost porasta pa je znašala  $8,10 \cdot 10^{-4} \pm 1,37 \cdot 10^{-4}$  a.e. $\cdot$ s $^{-1}$ . Preinkubacija z izoprenalinom ni vplivala na amplitudo odziva fenilefrina (Slika 8b-c), delež celic, odzivnih na fenilefrin s preinkubacijo v izoprenalinu je bil  $18/25 = 72\%$ . Na izoprenalin se je pri pretretiranju odzvalo  $4/25 = 16\%$  celic, iz česar lahko sklepamo, da imajo adrenergični receptorji  $\beta$  manjšo vlogo pri dvigu citosolne koncentracije glukoze v astrocitu ali pa stimulirajo pretvorbo glukoze v laktat. Amplituda in maksimalni naklon porasta izoprenalina sta znašala  $a = 0,0138 \pm 0,0045$  a.e. ( $18/25$  celic) in  $2,61 \cdot 10^{-4} \pm 1,01 \cdot 10^{-4}$  a.e. $\cdot$ s $^{-1}$  ( $18/25$  celic), fenilefrina s pretretiranjem z izoprenalinom pa  $a = 0,0985 \pm 0,0140$  a.e. in  $11,09 \cdot 10^{-4} \pm 2,36 \cdot 10^{-4}$  a.e. $\cdot$ s $^{-1}$  ( $18/25$  celic).



**Slika 8. Fenilefrin in izoprenalin povišata koncentracijo citosolne glukoze v astrocitu, ki izraža FLII12GLU-700 $\mu$ A6 FRET nanosenzor**

(a-b) Zgornji dve sliki prikazujeta reprezentativna signala, spodnji pa povprečje odzivov na fenilefrin (PE, 100  $\mu$ M, odzivnost 16/19 = 84 %) in pa odziv na PE s preinkubacijo v izoprenalinu (Izo, 200  $\mu$ M, odzivnost na PE 18/25=72 %, odzivnost na Izo 4/25 = 16 %).  $\Delta$ FRET pomeni spremembo normaliziranega EYFP/ECFP razmerja. (a) Astroците smo 600 s inkubirali s fenilefrinom dodanim zunajcelični raztopini s 3 mM D-glukoza. (b) Astroците smo najprej 600 s tretirali z izoprenalinom in nato še 600 s hkrati z izoprenalinom in fenilefrinom v zunajcelični raztopini s 3 mM D-glukoza (c) Amplitude ob stimulaciji z izoprenalinom, fenilefrinom in izoprenalinom + fenilefrinom. Številke v stolpcih predstavljajo število odzivnih celic/število vseh posnetih celic. (\*P=0,05, \*\*P=0,01).

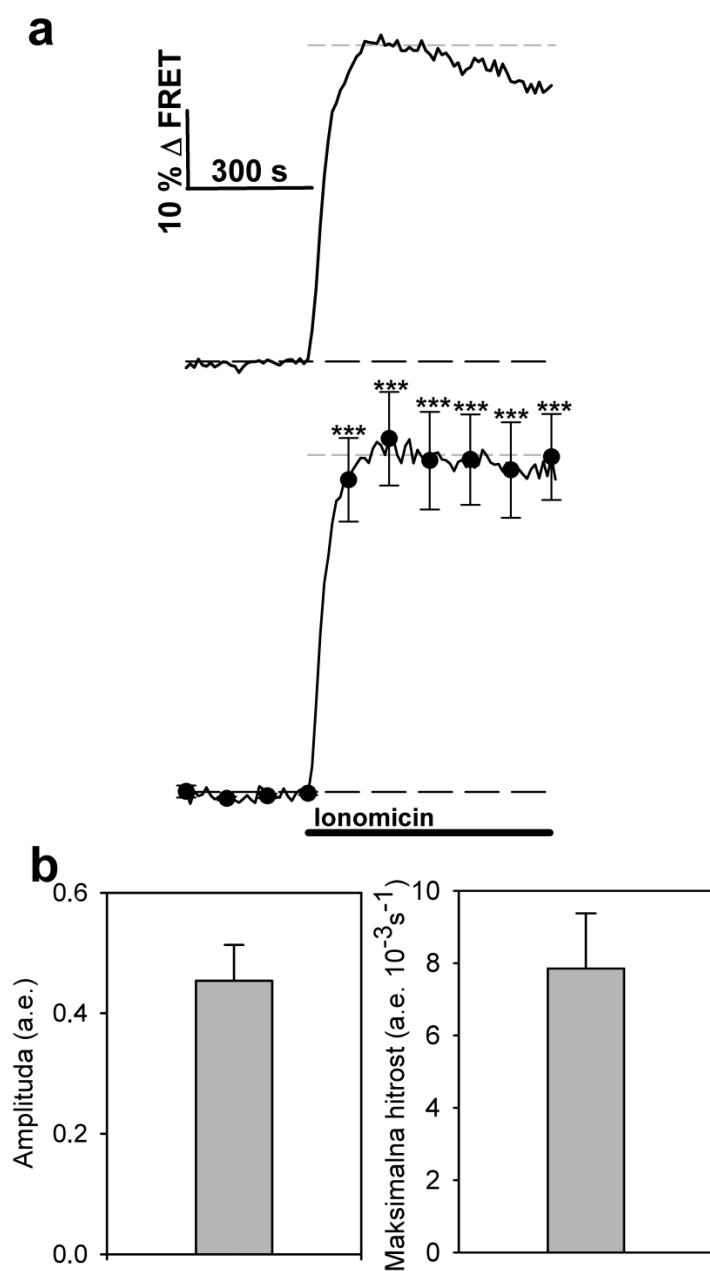
**Figure 8. Phenylephrine and isoprenaline stimulation increase cytosolic glucose concentration in astrocytes expressing FLII12GLU-700 $\mu$ A6 FRET based glucose nanosensor**

(a-b) Upper pannel shows representative signals and lower pannel shows mean response upon phenylephrine stimulation from 16 cells (PE, 100  $\mu$ M, responsiveness 16/19 = 84 %) and response upon phenylephrine stimulation after isoprenaline (Izo, 200  $\mu$ M) incubation from 18 cells (responsiveness to Izo 4/25 = 16 %, PE



18/25 = 72 %).  $\Delta$ FRET is change in normalized EYFP/ECFP ratio (a) Astrocytes were incubated for 600 s with phenylephrine added to 3 mM extracellular D-glucose solution. (b) Astrocytes were first pretreated with isoprenaline for 600 s and then for another 600 s with isoprenaline and phenylephrine added to 3 mM extracellular D-glucose solution. (c) Amplitudes after phenylephrine, isoprenaline and combination of both. Numbers denote recorded cell/all recorded cells.. (\*P=0.05, \*\*P=0.01).

Meritve citosolne glukoze z glukoznim nanosenzorjem so pokazale, da je delež odzivnih celic pri stimulaciji z izoprenalinom (manj kot 20 % odzivov) in fenilefrinom (84 % odzivov) različen. Ker fenilefrin učinkuje preko povišanja znotrajcelične koncentracije kalcija (Muyderman in sod., 2001), smo želeli, s kalcijem posredovan dvig citosolne glukoze v astrocitu, še dodatno potrditi z uporabo ionomicina, ki je v raziskavah pomembno orodje za zvišanje znotrajceličnega kalcija (Muller in sod., 2013). Preverili smo, če dodatek ionomicina (10  $\mu$ M) zviša koncentracijo proste glukoze v astrocitu, v katerem smo izrazili glukozni senzor FLII12GLU-700 $\mu$  $\Delta$ 6 FRET.. Znotrajcelična glukoza je v astrocitu ob stimulaciji z ionomicinom narasla do amplitude  $0,45 \pm 0,06$  a.e., časovna konstanta je znašala  $\tau = 25,5 \pm 4,9$  s, maksimalna hitrost porasta pa  $78,57 \cdot 10^{-4} \pm 15,24 \cdot 10^{-4}$  a.e. $\cdot$ s<sup>-1</sup> (Slika 9). Amplituda, časovna konstanta in maksimalna hitrost porasta razmerja FRET po dodatku ionomicina se statistično razlikuje od vrednosti pri noradrenalinu (Slika 6), izoprenalinu (Slika 7) in fenilefrinu (Slika 8a) (enosmerna ANOVA, analiza rankov, Dunnova metoda, P=0,05).



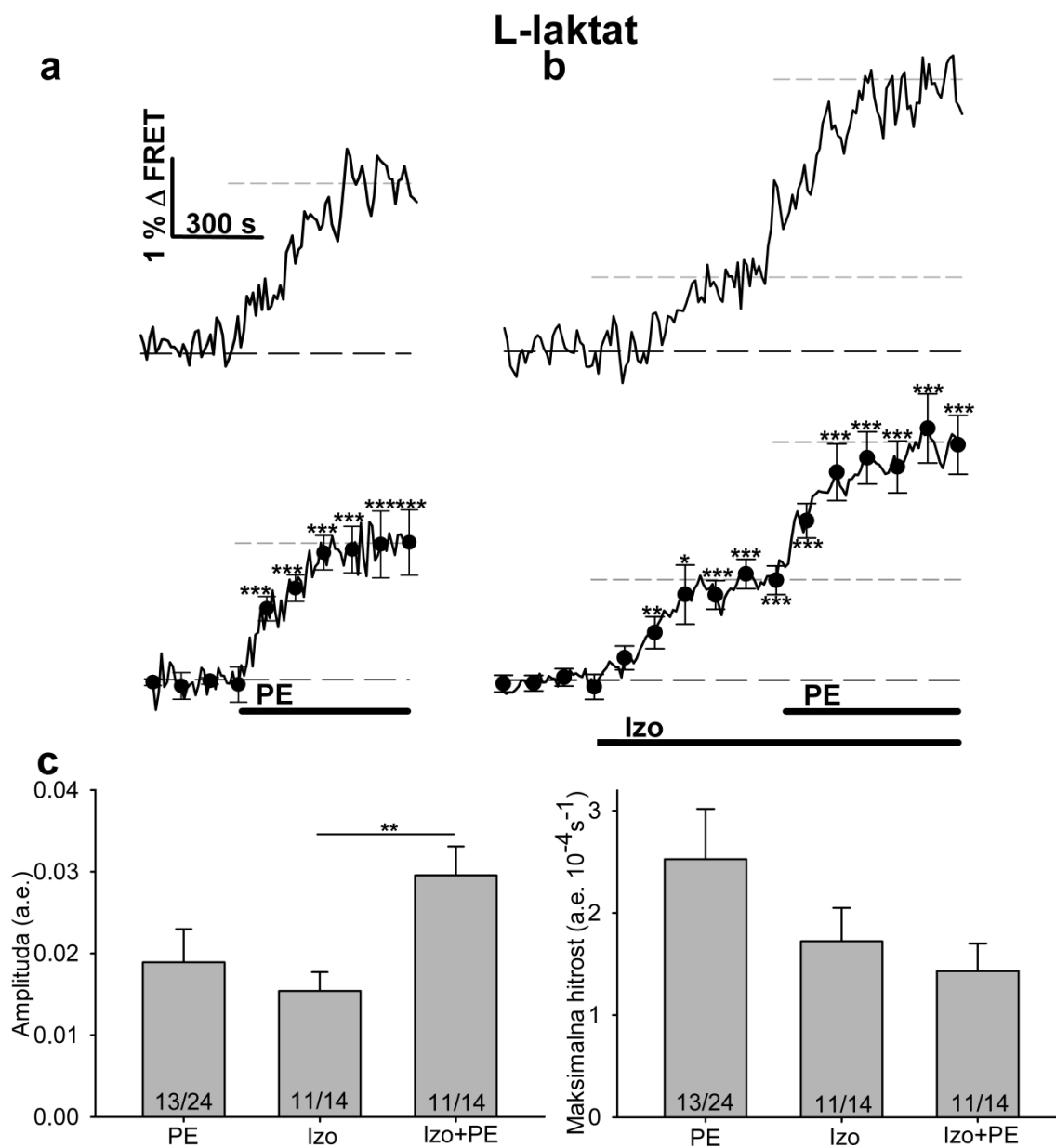
**Slika 9. Ionomycin zviša koncentracijo proste glukoze v astrocitu, ki izraža FLII12GLU-700 $\mu$ A6 FRET nanosenzor**

(a) Prikazan je reprezentativni posnetek stimulacije z ionomicinom (zgoraj) in povprečje odzivov 8 astrocitov (10  $\mu$ M, 100 % odzivnost). Na reprezentativnem posnetku je s sivo prekinjeno črto prikazano prilaganje eksponentne krivulje iz katere je izračunana časovna konstanta. Vse prikazane točke po 300 s na sliki se statistično razlikujejo od bazne linije (\*\*P=0,001).  $\Delta$ FRET pomeni spremembo normaliziranega EYFP/ECFP razmerja. (b) Prikazana sta amplituda in maksimalna hitrost porasta pri stimulaciji z ionomicinom.

**Figure 9. Ionomycin stimulation increase cytosolic glucose concentration in astrocytes expressing FLII12GLU-700 $\mu$ A6 FRET based glucose nanosensor**

(a) Upper panel shows representative signals (grey dotted line represent exponential curve fitted to the recorded signal) and lower panel shows mean response upon ionomycin stimulation from 8 cells (10  $\mu$ M, responsiveness 100 %). All shown points after 300 s baseline are statistically different from the baseline (\*\*P=0.001).  $\Delta$ FRET is change in normalized EYFP/ECFP ratio. (b) Amplitude and maximal rise rate upon ionomycin stimulation.

Metabolizem laktata je tesno povezan z metabolizmom glukoze, zato smo želeli preveriti, kako specifična agonista receptorjev  $\alpha_1$  in  $\beta$  vplivata na citosolne vrednosti laktata v astrocitu. Celice smo najprej stimulirali s fenilefrinom (Slika 10a). Na fenilefrin (PE) je bilo odzivnih  $13/24 = 54,2\%$  astrocitov, dosežena amplituda je bila  $a = 0,0189 \pm 0,0041$  a.e., maksimalna hitrost porasta pa je znašala  $2,53 \cdot 10^{-4} \pm 0,50 \cdot 10^{-4}$  a.e. $\cdot$ s $^{-1}$ . Nato smo izvedli poskus, pri katerem smo astroците najprej pretretirali z izoprenalinom (Izo, 200  $\mu$ M) za 600 s, nato pa raztopini z izoprenalinom s pipeto dodali še fenilefrin (100  $\mu$ M) za dodatnih 600 s (Slika 10b). Na izoprenalin se je odzvalo  $11/14 = 78,6\%$  celic z amplitudo  $a = 0,0154 \pm 0,0023$  a.e. in maksimalno hitrostjo porasta  $1,72 \cdot 10^{-4} \pm 0,33 \cdot 10^{-4}$  a.e. $\cdot$ s $^{-1}$ . Celice, ki so bile pretretirane z izoprenalinom in nato še s fenilefrinom (100  $\mu$ M), so se na slednjega odzvale v enakem odstotku ( $11/14 = 78,6\%$ ) kot na izoprenalin. Vsi astrociti, ki so se odzvali na izoprenalin, so se odzvali tudi na stimulacijo s fenilefrinom. Dosežena amplituda stimulacije z izoprenalinom + fenilefrinom je bila  $0,0296 \pm 0,0035 \cdot 10^{-3}$  a.e., maksimalna hitrost porasta pa je znašala  $1,43 \cdot 10^{-4} \pm 0,27 \cdot 10^{-4}$  a.e. $\cdot$ s $^{-1}$ . Sklepamo, da je signalizacija preko receptorjev  $\beta$  udeležena pri uravnavanju metabolizma laktata iz glukoze, saj se je manjši delež celic odzval na stimulacijo s fenilefrinom (54,2 %). večji delež pa na stimulacijo z izoprenalinom (78,6 %).



**Slika 10. Fenilefrin in izoprenalin povišata koncentracijo citosolnega laktata v astrocitu, ki izraža laktatni nanosenzor Laconic**

(a-b) Zgornji dve sliki prikazujeta reprezentativna signala, spodnji pa povprečje odzivov na fenilefrin (PE, 100  $\mu$ M, odzivnost 13/24 = 54,2 %) in pa odziv na PE s preinkubacijo v izoprenalinu (Izo, 200  $\mu$ M, odzivnost na PE 11/14 = 78,6%, odzivnost na Izo 11/14 = 78,6 %). (a) Astroците smo 600 s inkubirali s fenilefrinom dodanim zunajcelični raztopini s 3 mM D-glukozo. (b) Astroците smo najprej 600 s tretirali z izoprenalinom in nato še 600 s hkrati z izoprenalinom in fenilefrinom v zunajcelični raztopini s 3 mM D-glukozo.  $\Delta$ FRET pomeni spremembo normaliziranega mTFP/Venus razmerja. (c) Amplitude ob stimulaciji z izoprenalinom, fenilefrinom in izoprenalinom + fenilefrinom. Številke v stolpcih predstavljajo število odzivnih celic/število vseh posnetih celic. Maksimalne hitrosti porastov se statistično ne razlikujejo. (\* $P=0,05$ , \*\* $P=0,01$ , \*\*\* $P=0,001$ ). Metoda dodajanja zunajcelične raztopine s pipeto ne vpliva na spremembo razmerja FRET ( $n = 8$ , ni prikazano).

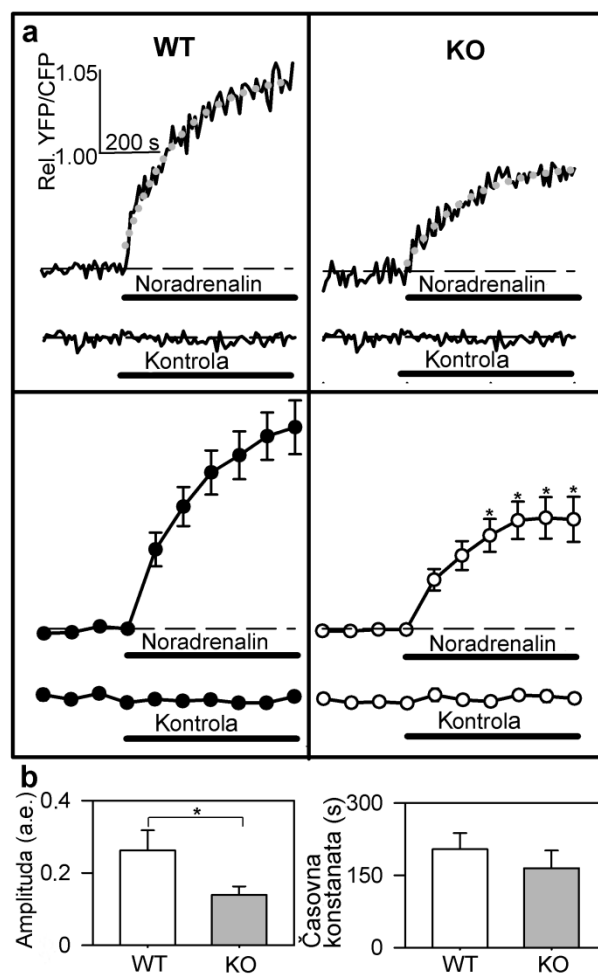
**Figure 10. Phenylephrine and isoprenaline stimulation increase cytosolic lactate concentration in astrocytes expressing Laconic nanosensor**

(a-b) Upper pannel shows representative signals and lower pannel shows mean response upon phenylephrine stimulation from 13 cells (PE, 100  $\mu$ M, responivenss 13/24 = 54.2 %) and response upon phenylephrine stimulation after isoprenaline (Izo, 200  $\mu$ M) incubation from 11 cells (responiveness to Izo 11/14 = 78.6 %, PE 11/14 = 78.6 %). (a) Astrocytes were incubated for 600 s with phenylephrine added to 3 mM extracellular D-glucose solution. (b) Astrocytes were first pretreated with isoprenaline for 600 s and then for another 600 s with isoprenaline and phenylephrine added to 3 mM extracellular D-glucose solution.  $\Delta$ FRET is change in normalized mTFP/Venus ratio. (c) Amplitudes after phenylephrine, isoprenaline and combination of both. Numbers denote recorded cell/all recorded cells. Maximal rise rates do not differ. (\*P=0.05, \*\*P=0.01, \*\*\*P=0.001). Method of addition of extracellular solution with pipette does not affect FRET ratio (n = 8, not shown).

### 4.1.3 Genetsko spremenjeni astrociti imajo spremenjeno presnovo glukoze

Umska manjzmožnost je v populaciji precej pogosta, saj je prisotna pri približno 2 % populacije. Leta 2002 so uspeli z metodami molekularne biologije modificirati miši tako, da so jim izbili gen za Gdi1. Mutanti so bili sposobni razmnoževanja in niso kazali morfoloških ali nevropatoloških sprememb. Odsotnost gena za Gdi1 pa je vplivala na slabši kratkoročni spomin, manjšo agresivnost samcev in spremembo socialnih vzorcev. Miši z izbitim genom za Gdi1 (angl. »Gdi1 knockout«, Gdi1 KO,) so se izkazale kot dober model za študij umske manjzmožnosti, saj imajo težave s kratkoročnim spominom in spremenjene vedenjske vzorce (Bianchi in sod., 2009; D'Adamo in sod., 2002).

V zadnjih letih je v ospredje prišlo zavedanje, da ima glikogen v astrocitih zelo pomembno vlogo pri energijskem metabolizmu in da je verjetno udeležen pri številnih obolenjih in okvarah v možganih. Na mišjih astrocitih z izbitim genom za protein Gdi1 smo zato s pomočjo glukoznega FLII12GLU-700 $\mu$  $\Delta$ 6 nanosenzorja FRET preverili, če se divji tip (angl. »wild type«, WT) in tip z izbitim genom za protein Gdi1 (angl. »Gdi1 knockout«, Gdi1 KO) razlikujeta v odzivnosti na stimulacijo z noradrenalinom (200  $\mu$ M). Celice smo 5 min inkubirali v zunajcelični raztopini s 3 mM D-glukozo nato pa dodali noradrenalin. Amplituda odziva pri WT celicah (odzivnost 14/42 = 33,3 %) je  $0,2625 \pm 0,0552$  a.e. in se statistično razlikuje od amplitude KO celic (odzivnost 20/42 = 47,6 %), ki znaša  $0,1392 \pm 0,0233$  a.e. (\*P=0,05, \*\*P=0,01, \*\*\*P=0,001) (Slika 11b). Razlikujejo se tudi časovne točke po 530 s poskusa, kot je prikazano na Sliki 10a. Časovne konstante se ne razlikujejo,  $\tau_{(WT)} = 204,2 \pm 33,3$  s,  $\tau_{(KO)} = 164,7 \pm 36,8$  s. Pri kontrolnih eksperimentih, kjer smo s pipeto dodajali zunajcelično raztopino s 3 mM D-glukozo, ni bilo statistično značilnih razlik.



**Slika 11. Stimulacija z noradrenalinom dvigne koncentracijo citosolne glukoze pri astrocitih WT (polni krogi) in v astrocitih Gdi1 KO (prazni krogi)**

(a) Astroците smo inkubirali 500 s z noradrenalinom (200 $\mu$ M, črna črta) dodanim zunajcelični raztopini s 3 mM D-glukozo. Zgornja vrsta prikazuje signal ene celice, spodnja vrsta pa prikazuje povprečje odzivov 14 astrocitov za WT in 20 za astroците Gdi1 KO. Povprečni FRET odziv astrocitov WT je bil v primerjavi z astrociti Gdi1 KO statistično različen po 530 s (\* $P=0,05$ ). Kontrolni eksperiment (dodatek 300  $\mu$ L zunajcelične raztopine s 3 mM D-glukozo k celicam) ni pokazal statističnih razlik v razmerju YFP/CFP (23 celic za astroците WT in 20 za Gdi1 KO). Za analizo smo uporabili parni Studentov t test. (b) prikazuje amplitude in časovne konstante astrocitov WT in KO pridobljene s pomočjo prilaganja eksponentne funkcije kot je prikazano s sivo prekinjeno črto na reprezentativnih posnetkih. Amplitude so bile statistično različne (\* $P=0,05$ ).

**Figure 11. Noradrenaline treatment increases cytosolic glucose concentration in wild-type (full circles) and GDI knockout astrocytes (empty circles).**

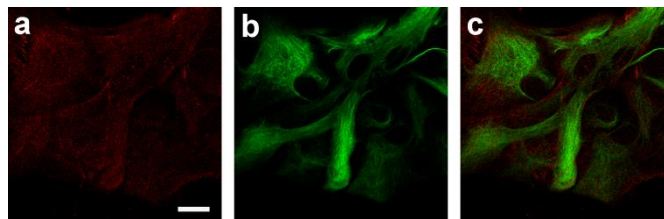
(a) Astrocytes were incubated for 500s with noradrenaline (200 $\mu$ M, black bar), added to the extracellular solution with 3 mM D-glucose. Upper pannel shows FRET ratio signals recorded from single cell, lower pannel shows mean responses recorded in 14 astrocytes for wild-type and 20 for GDI knockout astrocytes. Mean FRET ratio recorded with wild-type astrocytes after noradrenaline treatment was significantly different ( $p<0.05$ ) compared to recordings with GDI knockout astrocytes after 530 s. Control experiments (300  $\mu$ M extracellular solution with 3mM D-glucose added to cells) show no significant change in YFP/CFP ratio (23 experiments for wild type and 20 for GDI knockout astrocytes). Student's t test (b) Grey dotted lines in the top pannels show the exponential fit to the curve. Amplitudes and times constans were calculated based on fitted curves (\* $P=0.05$ ).

## 4.2 INZULIN IN IGF-1 MODULIRATA CITOSOLNO GLUKOZO IN ZALOGE GLIKOGENA V ASTROCITU, NE PA TRANSPORTA GLUKOZE SKOZI MEMBRANO

Z namenom študije citosolne glukoze v astrocitech po stimulaciji z insulinom in IGF-1, smo celice najprej transficirali s plazmidom FLII12Pglu-700 $\mu$  $\Delta$ 6, ki kodira glukozni nanosenzor (Prebil in sod., 2011).

### 4.2.1 Citosolna koncentracija glukoze v astrocitu se zniža ob stimulaciji z insulinom

Znano je, da insulin lahko prehaja preko krvno-možganske pregrade in v možganih povzroča številne učinke, po vsej verjetnosti preko inzulinskih receptorjev (IR) (Laron, 2009). Z namenom pokazati, da astrociti v kulturi izražajo inzulinske receptorje, smo izvedli imunocitokemično barvanje IR. Slika 12 prikazuje, da astrociti v primarni kulturi izražajo IR.



**Slika 12. Izolirani podganji astrociti izražajo inzulinske receptorje**

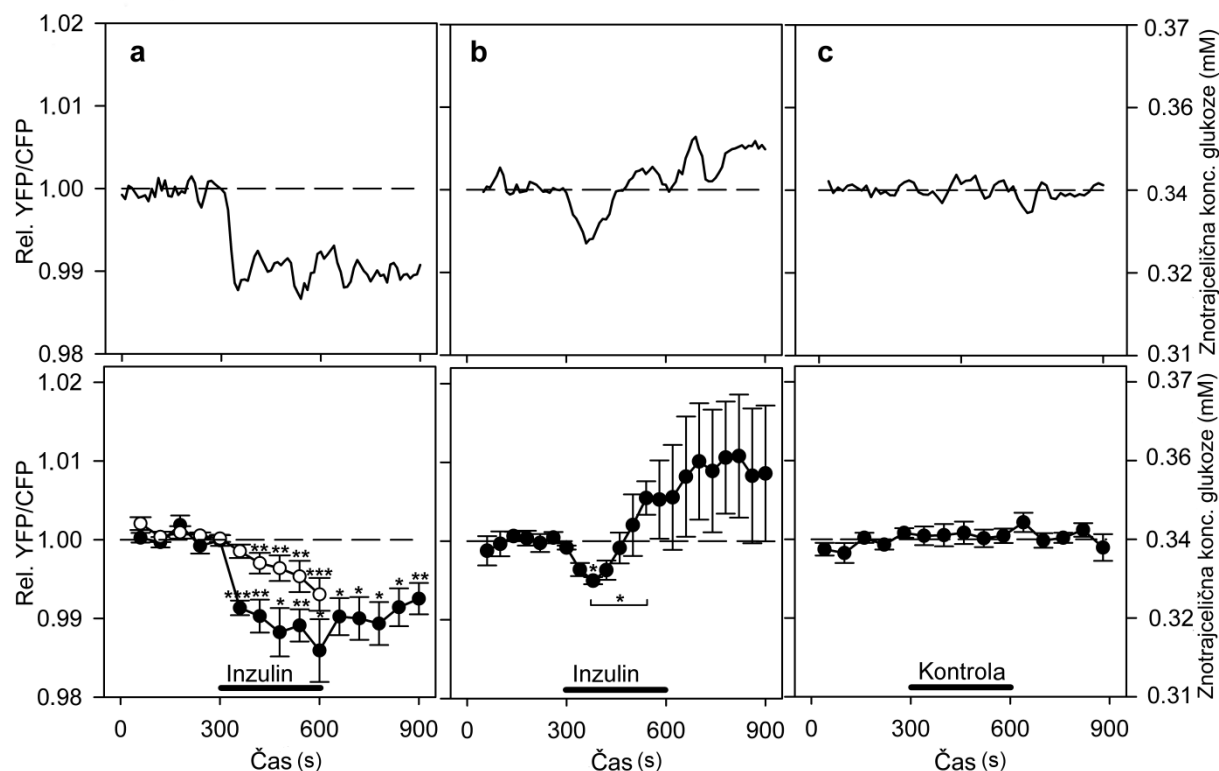
(a) Astrociti imunocitokemično označeni s protitelesi proti inzulinskim receptorjem (IR) in (b) proti astrocitnem markerju GFAP (angl. »glial fibrillary acidic protein«). (c) Združena oba signala. Merilo: 20  $\mu$ m.

**Figure 12. Isolated rat astrocytes express insulin receptors**

(a) Astrocytes immuno-labelled with antibodies against insulin receptors and (b) with astrocytic marker, glial fibrillary acidic protein (GFAP). (c) panel shows merged image signals of a cell. Scale bar: 20  $\mu$ m.

V adipocitih in skeletnih mišicah inzulin stimulira vgraditev transporterja GLUT4v plazemsko membrano in s tem omogoča prenos glukoze preko plazemske membrane (Mueckler, 2001). Predhodne raziskave so potrdile ekspresijo transporterjev GLUT v astrocitih, kljub temu pa ni bilo mogoče z gotovostjo trditi, da je v astrocitih prisoten GLUT4, ki je reguliran z inzulinom (Maher in sod., 1994). Nedavno imunocitokemično barvanje je pokazalo, da astrociti izražajo GLUT4, kar smo potrdili tudi mi (Slika 14a) (Nijland in sod., 2014). Nato smo preverili, ali dodatek inzulina vpliva na dinamiko citosolne glukoze v astrocitu. Astrocite smo 300 s obličali z inzulinom v zunajcelični raztopini s 3 mM D-glukozo. V 48 % posnetkov (10 od 21 celic) je aplikacija 1  $\mu$ M inzulina povzročila znižanje razmerja YFP/CFP, kar nakazuje na znižanje citosolne koncentracije glukoze. Izvedli smo tudi poskus s 100 nM inzulinom, posneli smo 16 celic, ki pa niso bile odzivne (ni prikazano). Opazili smo 2 tipa odzivov na stimulacijo z 1  $\mu$ M inzulinom. V prvem načinu odzivov (Slika 13, 7 od 21 posnetih celic) je bilo znižanje citosolne koncentracije glukoze v astrocitih konstantno in se je nadaljevalo tudi po odstranitvi inzulina iz zunajcelične raztopine, ki je obličala celice. Pri teh poskusih smo opazili 1 % spremembo razmerja FRET s časovno konstanto  $28,2 \pm 5,7$  s in amplitudo  $-0,014 \pm 0,003$  a.e., kar je bilo statistično različno od začetnih vrednost (parni t-test,  $P=0,001$ ). Opaženo znižanje razmerja FRET pomeni 6 % znižanje znotrajcelične koncentracije D-glukoze (Slika 13a). Pri drugem tipu odzivov (Slika 13b, 3 od 21 celic) so se astrociti odzvali na stimulacijo z inzulinom s prehodnim znižanjem glukoze. Po začetnem znižanju citosolne koncentracije glukoze, na kar je kazalo 0,5 % znižanje razmerja FRET 90 s po dodatku inzulina (parni t- test,  $P=0,05$ ), se je koncentracija glukoze dvignila na začetno raven, ki je bila kasneje celo presežena (11/21 = 52,4 % celic je bilo neodzivnih). Pri kontrolnem poskusu, ko smo celice spirali z zunajcelično raztopino (Slika 13c,  $n = 11$ ), ali pa dodali raztopino akutno kot bolus s pipeto ( $n = 25$ , ni prikazano), nismo zaznali spremembe razmerja FRET. Z namenom inhibirati inzulinsko pot (Heni in sod., 2011), smo celice inkubirali z wortmanninom, inhibitorjem IP3K/Akt (Nakanishi in sod., 1995). Celice pretretirane z wortmanninom so se po stimulaciji z inzulinom (Slika 13a, prazni krogi) odzvale z manjšo spremembo razmerja FRET, samo z 1/3 zmanjšanja intracelularne koncentracije glukoze v primerjavi z netretiranimi celicami s konstantnim odzivom (Slika 13a , parni t test,  $P=0,05$  od 330 do 490 s ob stimulaciji z inzulinom). Akutni dodatek wortmannina ni vplival na citosolno koncentracijo glukoze ( $n = 7$ , ni prikazano). Ti rezultati kažejo, da so zaznana znižanja citosolne koncentracije v astrocitih pogojena z inzulinom.





**Slika 13. Stimulacija z insulinom zniža citosolno koncentracijo glukoze v astrocitu**

Opazili smo dva tipa odzivov na insulin, trajen (a) in prehodni (b). (a, b) Astroците smo 300 s obvlivali z insulinom (1  $\mu$ M, črna črta) dodanim zunajcelični raztopini s 3 mM D-glukozo. Zgornja vrsta prikazuje razmerje FRET posneto z eno celico, spodnja vrsta prikazuje povprečno vrednost odzivov 7 astrocitov s trajnim odzivom (a, polni krogi) in 3 astrocitov s prehodnim odzivom (b). Časovna konstanta padca razmerja FRET trajnih dogodkov je bila  $28,2 \pm 5,7$  s ( $n = 7$ ). Z wortmanninom pretretirani astroцитi (100 nM, 15 min preinkubacije) so bili izpostavljeni enakim eksperimentalnim razmeram kot z wortmanninom netretirane celice. Pri astrocitih, pretretiranih z wortmanninom, je bilo povprečje razmerja FRET po stimulaciji z insulinom med 330 s in 490 s bistveno manjše ( $n = 23$  celic, prazni krogi v stolpcu a) kot pri celicah, ki niso bile tretirane z wortmanninom (\* $P=0,05$ ). Pri celicah obvlivanih s kontrolno raztopino (zunajcelična raztopina s 3 mM D-glukozo) ni prišlo do spremembe razmerja YFP/CFP ( $n = 11$ ). Parni Studentov t-test: \* $P=0,05$ , \*\* $P=0,01$ , \*\*\* $P=0,001$ .

**Figure 13. Insulin stimulation decreases cytosolic glucose concentration in astrocytes**

Two types of glucose responses to insulin treatments were observed, persistent (a) and transient (b). (a, b) Astrocytes were superfused for 300 s with insulin (1  $\mu$ M, black bar), added to extracellular solution with 3 mM D-glucose. Upper panel shows FRET ratio signal recorded from a single cell, lower panel shows mean response recorded in 7 astrocytes displaying persistent (a; full circles) and 3 astrocytes displaying transient events (b). The time constant of FRET ratio decline after insulin stimulation for persistent events was  $28.2 \pm 5.7$  s ( $n = 7$ ). Wortmannin pretreated (100 nM, 15 min preincubation) astrocytes were exposed to the same experimental conditions as non-pretreated cells. Mean FRET ratio change from 330 s to 490 s upon insulin stimulation was in wortmannin pretreated cells significantly lower ( $n = 23$  cells; empty circles in panel a) compared to non-pretreated cells ( $P = 0.05$ ). (c) Cells superfused with a control solution (extracellular solution with 3mM D-glucose) showed no significant change in YFP/CFP ratio ( $n = 11$  cells). Student's t-test for paired data: \* $P=0.05$ , \*\* $P=0.01$ , \*\*\* $P=0.001$ .

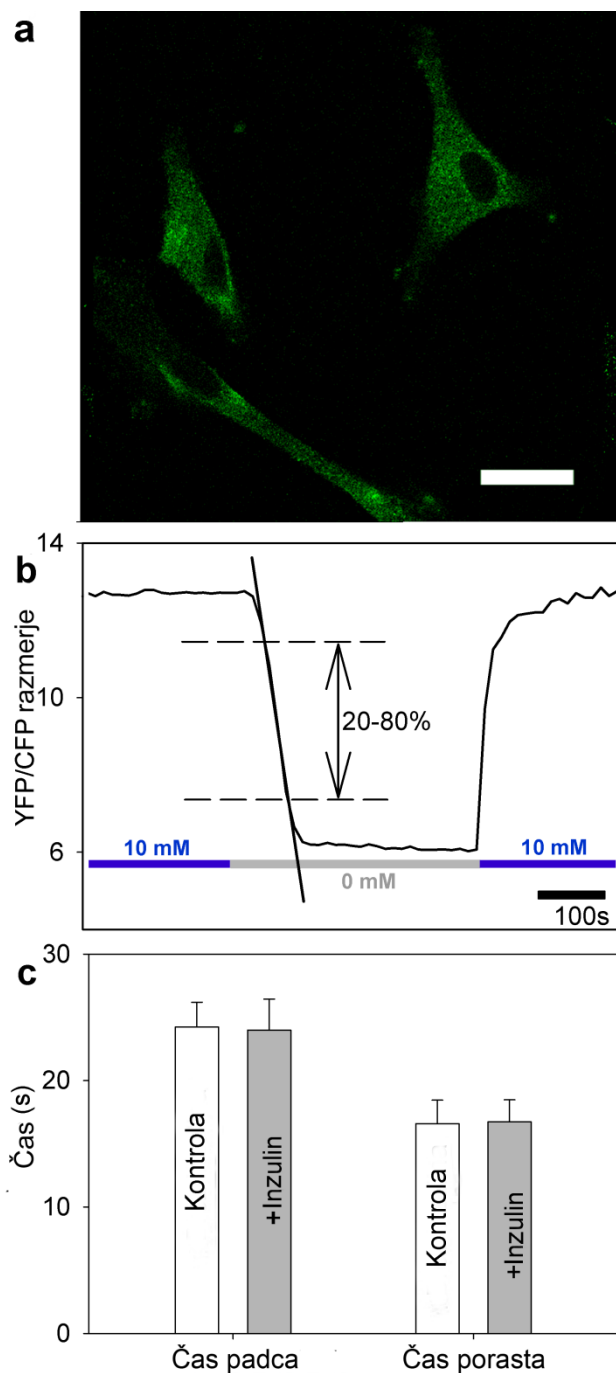
#### 4.2.2 Pretok glukoze skozi membrano astrocita ni odvisen od inzulina

Raziskali smo, ali inzulin vpliva na dinamiko vstopa glukoze v astrocit. Vstop bi bil lahko povezan z na inzulin občutljivim glukoznim transporterjem.

Za opredelitev vpliva inzulina na vstop glukoze v astrocite smo celice izmenično obličali z visoko ali nizko koncentracijo D-glukoze v zunajcelični raztopini, in sicer: z 10 mM D-glukozo 3 min, 0 mM D-glukozo 5 min in 10 mM D-glukozo 3 min. Zvišanje razmerja FRET z obličanjem z raztopino z visoko vsebnostjo glukoze kaže na porast znotrajcelične glukoze zaradi vstopa glukoze skozi celično membrano (Kreft in sod., 2013). V nadaljnjih poskusih je bil raztopinam med snemanjem dodan 1  $\mu$ M inzulin. Razmerje FRET smo izračunali s podatki s cele površine celice, slike smo zajemali s frekvenco 0,1 Hz. Izračunali smo čase porastov in znižanj, da bi preverili morebitne razlike vstopa glukoze (transport preko celične membrane) pri netretiranih in z inzulinom tretiranih celicah. Izmerili smo čase za spremembo signala FRET od 20 do 80 % maksimalne vrednosti amplitude.

Meritve so pokazale, da čas porasta<sub>20-80%</sub> in čas padca<sub>20-80%</sub> razmerja FRET niso različni med kontrolnimi celicami in z inzulinom stimuliranimi celicami (Slika 14c, čas porasta<sub>20-80%</sub>,  $16,6 \pm 0,1$  s ( $n = 10$ ) vs  $16,7 \pm 1,0$  s ( $n = 10$ ),  $P = 0,92$ ; čas padca<sub>20-80%</sub>,  $24,3 \pm 1,2$  s ( $n = 10$ ) vs  $24,0 \pm 1,9$  s ( $n = 10$ ),  $P = 0,91$ ).

V nadaljevanju smo preverili, ali se maksimalni nakloni porasta in padca razmerja FRET razlikujejo med z inzulinom stimuliranimi in nestimuliranimi celicami. Pri analizi nismo opazili nobenih razlik med z inzulinom stimuliranimi in kontrolnimi celicami (nakloni padca so  $0,16 \pm 0,01$  s<sup>-1</sup> pri kontrolnih celicah in  $0,17 \pm 0,02$  s<sup>-1</sup> pri z inzulinom stimuliranih celicah,  $P = 0,65$ ; nakloni porasta so  $0,25 \pm 0,01$  s<sup>-1</sup> pri kontrolnih celicah in  $0,24 \pm 0,03$  s<sup>-1</sup> pri z inzulinom stimuliranih celicah,  $P = 0,69$ ). Najkrajši časi porasta ali padca niso bili omejeni s časovno ločljivostjo perfuzijskega sistema (Prebil in sod., 2011). Pri poskusih, kjer smo astrocite izmenično obličali z visoko koncentracijo D-glukoze in raztopino brez nje, smo izmerili tudi amplitude spremembe citosolne koncentracije glukoze. Amplitude porasta ali padca razmerja FRET se ne razlikujejo ( $P = 0,63$ ,  $P = 0,67$ ). Ti rezultati jasno nakazujejo, da prehod glukoze skozi membrano ni uravnavan z inzulinom, čeprav astrociti izražajo transporter GLUT4.



**Slika 14. Tretiranje z inzulinom ne vpliva na vstop glukoze v astroците**

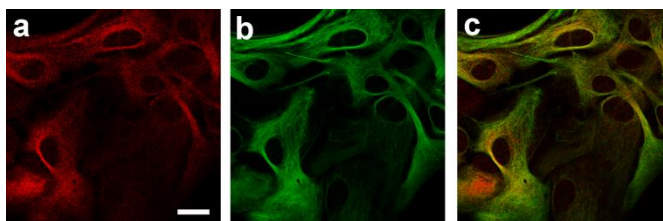
(a) Astroцити imunocitokemično označeni s protitelesi proti GLUT4 (zeleno). Merilo: 20  $\mu\text{m}$ . (b) Celice smo oblikovali z zunajceličnimi raztopinami D-glukoze v naslednjem vrstnem redu: 10 mM D-glukoza za 3 min (modra črta), 0 mM D-glukoza za 5 min (siva črta) in nato 10 mM D-glukoza za 3 min. V ločenem setu poskusov smo celice med snemanjem tretirali z inzulinom (1  $\mu\text{M}$ ). Izračunali smo 20 % in 80 % maksimalne spremembe FRET (prekinjeni črti) in izmerili časovni interval med tema vrednostima (ločeno za čase padca in čase porasta). Izračunali smo tudi maksimalne naklone padca in porasta, kot je pokazano za padec s polno premico na sliki (b). (c) prikazuje čase padca in porasta razmerja FRET pri kontrolnih celicah (beli stolpci, brez inzulina, 10 celic) in z inzulinom tretiranih celicah (sivi stolpci, z inzulinom, 10 celic). Med obema skupinama nismo opazili razlik časov padca in porasta ( $P=0,91$  and  $P=0,91$ ). Stolpci prikazujejo povprečje  $\pm$  standardno napako.

**Figure 14. Insulin treatment does not affect the rate of glucose flux into the astrocyte**(a) Astrocytes immuno-labelled with antibodies GLUT4 (green). Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . (b) We superfused cells with extracellular solution containing D-glucose in the following concentration order: 10 mM D-glucose for 3 min, 0 mM D-glucose for 5 min (grey line) and 10 mM D-glucose for 3 min. In a separate set of experiments, cells were treated with insulin (1  $\mu\text{M}$ ) during recordings. 20 % and 80 % of the maximal FRET ratio change was calculated (dashed lines) and the time interval between these two values was measured (separately for fall time and rise time). Additionally, maximal rates of decline and rise in FRET ratio change were calculated as indicated by the full straight line shown for decline (for details see Materials and methods) (c) Fall- and rise-time of FRET ratio change measured in control cells (white bars, without insulin; 10 cells), and insulin treated cells (grey bars, insulin; 10 experiments). There was no significant difference in fall- or rise-time between the two groups ( $p = 0.91$  and  $p = 0.91$ , respectively). Bars represent mean  $\pm$  SEM.

### 4.2.3 Citosolna koncentracija glukoze v astrocitu se zniža ob stimulaciji z IGF-1

IGF-1 je inzulinu podoben strukturno. Učinke posreduje preko prav tako strukturno podobnih receptorjev IGF-1 in inzulinskih receptorjev, imata pa tudi skupen del signalne poti (Blakesley in sod., 1996; Moule in Denton, 1997). Z imunocitokemičnim barvanjem smo potrdili, da astrociti v primarni kulturi izražajo receptorje IGF1 (IGF1R) (Slika 15). V nadaljevanju smo preverili, kako vpliva dodatek IGF-1 na dinamiko citosolne koncentracije glukoze. Astrocite smo za 600 s izpostavili IGF-1 raztopljenim v 3 mM zunajcelični raztopini D-glukoze. Povprečje odzivov 13 astrocitov (13 neodzivnih od skupno 26 posnetih) je pokazalo 2 % zmanjšanje razmerja FRET 300 s po dodatku IGF-1 ( $-0,022 \pm 0,004$  a.e.), kar je bilo statistično različno od začetnih vrednosti (Slika 16a, polni krogi). Zmanjšanje razmerja FRET ustreza 9 % znižanju znotrajcelične koncentracije D-glukoze. Razmerje FRET se je po 600 s zmanjšalo še za 3 % ( $c_{\text{glu. znotrajcelično ob } 900 \text{ s}} = 0,29 \pm 0,006$  mM). Pri celicah pretretiranih s pikropodofilotoksinom (PPP) (Slika 16a, prazni krogi), IGF-1 kinaznim inhibitorjem (Girnita in sod., 2004), smo opazili manjše znižanje znotrajcelične koncentracije glukoze ob stimulaciji z IGF-1 v primerjavi z netretiranimi celicami ( $P < 0,001$  ob 600 s and  $P < 0,01$  ob 900 s, Studentov t test,  $c_{\text{glu. znotrajcelično ob } 900 \text{ s}} = 0,32 \pm 0,006$  mM). Statistične razlike kažejo, da je bilo znižanje ravni glukoze pogojeno s stimulacijo z IGF-1.

Odzivi na stimulacijo z IGF-1 so specifični. V kontrolnih poskusih, kjer smo akutno dodali na celice zunajcelično raztopino s pipeto, nismo opazili spremembe razmerja FRET ( $n = 15$  celic, Slika 16b;  $n = 20$  za poskus s PPP, ni prikazano).

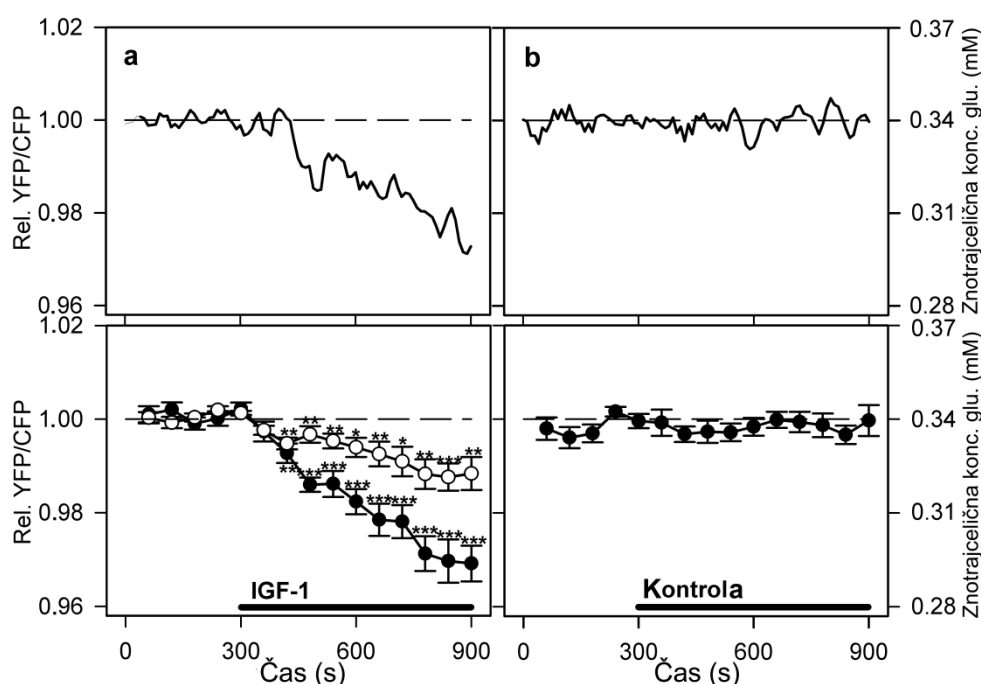


**Slika 15. Izolirani podganji astrociti izražajo IGF-1 receptorje**

(a) Astrociti smo imunocitokemično označili s protitelesi proti receptorjem IGF-1 in (b) proti astrocitnemu markerju GFAP. (c) Združena oba signala celic. Merilo: 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 15. Isolated astrocytes express IGF-1 receptors**

Astrocytes immuno-labelled with antibodies against IGF-1 receptors (left panel, red) and against astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP; middle panel, green). Right panel shows both image signals of a cell. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .



**Slika 16. IGF-1 stimulacija znižuje citosolno koncentracijo glukoze v astrocitu**

Po začetni inkubaciji v zunajcelični raztopini s 3 mM D-glukozo, smo astrocitom dodali IGF-1 (100 nM, črna črta) za 600 s. Zgornja vrsta prikazuje signal razmerja FRET, posnet iz ene celice, spodnja vrstica pa prikazuje povprečje odzivov 13 celic (polni krogi). S pikropodofilotoksinom (PPP, 100 nM, IGF-1 kinazni inhibitor) pretretirane celice smo izpostavili enakim eksperimentalnim razmeram kot netretirane celice. Povprečje razmerja FRET pri s PPP-tretiranih celicah je bilo po stimulaciji z IGF-1 značilno nižje (prazni krogi,  $n = 20$ ) kot pri PPP-netretiranih celicah ( $P = 0,00017$  pri 300 s and  $P = 0,0014$  pri 900 s, Studentov t-test). (b) Kontrolni eksperiment (dodajanje 300  $\mu\text{L}$  zunajcelične raztopine s 3 mM D-glukozo k celicam) ni pokazal sprememb v razmerju YFP/CFP ( $n = 15$ ). Studentov parni t-test: \* $P = 0,05$ , \*\* $P = 0,01$ , \*\*\* $P = 0,001$ .

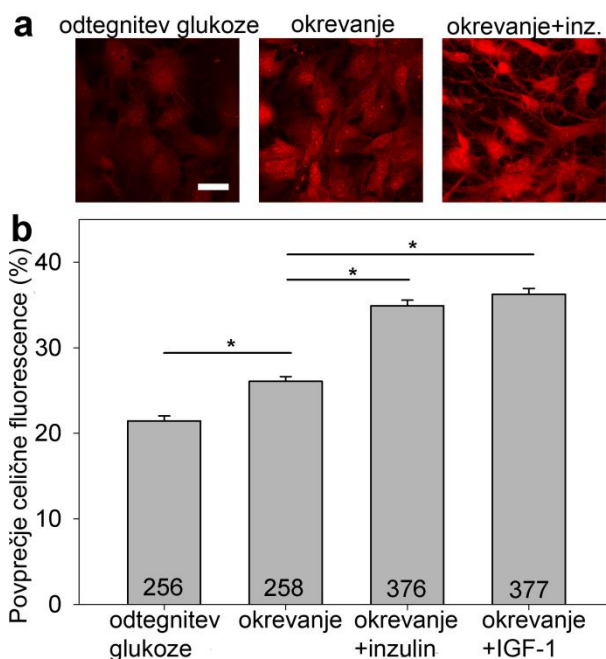
**Figure 16. IGF-1 stimulation decreases cytosolic glucose concentration in astrocytes**

(a) After initial incubation of astrocytes in extracellular solution with 3 mM D-glucose, IGF-1 (100 nM, black line) was added to the bath for 600 s. Upper panel shows FRET ratio signal recorded from a single cell, lower panel shows mean response recorded in 13 astrocytes (full circles). Picropodophyllotoxin (PPP, IGF-1 receptor kinase inhibitor) pretreated cells were exposed to the same experimental conditions as non-pretreated cells. Mean FRET ratio change recorded upon IGF-1 stimulation in PPP-pretreated cells was significantly lower (empty circles;  $n = 20$  cells) than in non-pretreated cells ( $P = 0.00017$  at 300 s and  $P = 0.0014$  at 900 s, Student's t-test). (b) Control experiments (300  $\mu\text{L}$  extracellular solution with 3 mM D-

glucose added to cells) showed no significant change in YFP/CFP ratio (n =15 cells). Student's t test for paired data: \*P=0.05, \*\*P=0.01, \*\*\*P=0.001.

#### **4.2.4 Inzulin in IGF-1 povečata zaloge glikogena v astrocitih**

Preverili smo, če na zaloge glikogena v astrocitih vplivata inzulin in IGF-1. Barvanje PAS smo uporabili za vizualizacijo glikogena, konfokalno mikroskopijo pa za analizo količine glikogena v astrocitih, ki so bili izpostavljeni zunajcelični raztopini brez glukoze in raztopini z D-glukozo z dodanim inzulinom ali IGF-1 (Slika 17). Ugotovili smo, da je količina glikogena v astrocitih, ki so bili izpostavljeni odtegnitvi glukoze, bistveno manjša v primerjavi z astrociti, ki smo jim najprej za 2 h odtegnili glukozo, nato pa jim omogočili okrevanje v DMEM z 5,55 mM D-glukozo ( $21,4 \pm 0,6$  % (n = 256) in  $26,1 \pm 0,6$  % (n = 258) Fluorescenca PAS čez celotno površino celice;  $P < 0,05$ ). Stimulacija z inzulinom in IGF-1 po predhodnem stradanju in nato okrevanju ( $34,9 \pm 0,6\%$  (n = 376) in  $36,3 \pm 0,7\%$  (n = 377) ) Fluorescenca PAS čez celotno površino celice) je še povečala zaloge glikogena v primerjavi z nestimuliranimi celicami, saj se je intenziteta barvanja PAS povečala za  $\sim 1,4$  ( $P < 0,001$ ). Iz rezultatov sklepamo, da imata inzulin in IGF-1 podobne učinke na obnovo glikogena v astrocitih (Slika 17b,  $P=0,15$ ). Pri celicah, ki smo jih barvali brez uporabe perjudovne kisline, nismo opazili fluorescence.



**Slika 17. Količina glikogena v astrocitih je uravnana z inzulinom in IGF-1**

Količino glikogena smo opredelili z barvanjem PAS (angl. »periodic acid-Schiff staining«). (a, leva slika) reprezentativna slika celic barvanih s PAS (rdeča fluorescenca) po 2 h izpostavitve zunajcelični raztopini brez glukoze, (a, srednja slika) 2 h odtegnitve glukoze in 2 h okrevanja v raztopini z 5,55 mM glukozo in (a, desna slika) po izpostavitvi enakim eksperimentalnim razmeram kot predhodno opisano z dodanim inzulinom. Intenziteta barvanja PAS posredno predstavlja količino glikogena v celici. Merilo: 20  $\mu\text{m}$ . (b) Povprečna intenziteta barvanja PAS glede na celotno celico. Poskusi so bili izvedeni na celicah, izpostavljenih za 2 h zunajcelični raztopini brez glukoze (odtegnitev glukoze), na celicah, ki smo jim najprej za 2 h odtegnili glukozo in jih nato za 2 h izpostavili okrevanju (DMEM z 5,55 mM glukozo) in na celicah, ki smo jim odtegnili glukozo, nato pa jim omogočili okrevanje z inzulinom (okrevanje + inzulin; 100 nM) ali IGF-1 (okrevanje + IGF-1; 10 nM). Številke v stolpcih predstavljajo število analiziranih celic.  $P < 0,001^{***}$  (Studentov t-test); izvedeni so bili trije neodvisni poskusi.

**Figure 17. Glycogen content in astrocytes is insulin and IGF-1 dependent**

Glycogen content was determined by periodic acid-Schiff (PAS) staining. Representative images of cells positively stained with PAS (red fluorescence) upon 2 h exposure to glucose-free extracellular solution (a; left panel), 2 h glucose deprivation and then 2 h re-feeding in 5.55 mM glucose-rich solution (a; middle panel), and upon exposure to the same experimental procedure as described previously with the addition of insulin (a; right panel). The level of PAS staining intensity resembles the level of cell glycogen content. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . (b) Mean fluorescence intensity of PAS staining per total cell area. Experiments were performed in cells exposed for 2 h to glucose-free extracellular solution (glucose deprivation), in cells, which were first exposed to glucose deprivation and then to 2 h of re-feeding in glucose-rich solution (recovery; DMEM with 5.55 mM glucose), and in cells treated during glucose deprivation and re-feeding with either insulin (recovery + insulin; 100 nM) or IGF-1 (recovery + IGF-1; 10 nM). Numbers denote the number of analysed cells.  $P < 0.001^{***}$  (Student's t test); three independent experiments were performed.

## 5 DISKUSIJA

### 5.1 REGULACIJA GLUKOZE IN LAKTATA PREKO RECEPTORJEV $\alpha$ IN $\beta$ V POSAMEZNEM ASTROCITU

Uporabili smo glukozni FLII12GLU-700 $\mu$  $\Delta$ 6 nanosenzor FRET (Takanaga in sod., 2008) za spremljanje citosolne koncentracije glukoze v posameznem astrocitu ob stimulaciji z noradrenalinom, specifičnim agonistom  $\alpha_1$  (fenilefrin) in adrenergičnih receptorjev  $\beta$  (izoprenalin) ter ionomicinom.

Noradrenalin na astrocitih aktivira adrenergične receptorje  $\alpha$  in  $\beta$  (Hertz in sod., 2010; Northam in sod., 1989), kar povzroči razgradnjo glikogena (Pellerin in Magistretti, 1994). V astrocitih so pokazali bifazni učinek noradrenalina na vsebnost glikogena. Pod vplivom noradrenalina najprej pride do hitre razgradnje, dolgoročno pa vodi stimulacija do dolgotrajne resinteze glikogena (Pellerin in sod., 1997). Noradrenalin inducira tudi kalcijeve valove (Laskey in sod., 1998). Potrdili smo, da aktivacija adrenergičnih receptorjev z noradrenalinom vodi v zvišanje citosolne koncentracije glukoze (Slika 6), kar je v skladu s predhodnim delom opravljenim z enako metodo (Prebil in sod., 2011). Amplitude odziva so primerljive z rezultati Prebil in sod., 2011, medtem ko se časovne konstante razlikujejo, izmerili smo namreč približno 100 s daljšo časovno konstanto ( $\tau = 253,1 \pm 59,8$  s,  $n = 9$ ;  $\tau_{\text{Prebil in sod.}} = 115,9 \pm 8,2$  s,  $n = 8$ ), kar kaže na počasnejšo kinetiko porasta citosolne glukoze v astrocitu. To lahko pojasnimo s tem, da so astrociti izredno heterogena skupina celic z različnimi lastnostmi (Sofroniew in Vinters, 2010).

V nadaljevanju nas je zanimalo, kako posamezna aktivacija receptorjev  $\alpha$  in  $\beta$  vpliva na metabolizem glukoze v astrocitu. Celice smo zato stimulirali z izoprenalinom, specifičnim agonistom receptorjev  $\beta$ . Izoprenalin z vezavo na receptorje  $\beta$  zviša cAMP v celici (Vardjan in sod., 2014; Wallukat, 2002). Na stimulacijo se je odzvalo le 18,8 % astrocitov (Slika 7), kar je bistveno manj kot pri stimulaciji z noradrenalinom (36,4 % odzivov). Amplituda odziva FRET z izoprenalinom je manjša in od amplitude z noradrenalinom. Kot kažejo rezultati (Slika 7, Slika 8b), signaliziranje preko receptorjev  $\beta$  le delno dvigne znotrajcelično koncentracijo proste D-glukoze v astrocitu. Amplituda odziva FRET z izoprenalinom je 2,5-krat manjša od amplitude z noradrenalinom, odzivnih pa je 50 % manj celic kot pri stimulaciji z noradrenalinom. Z namenom opredeliti vlogo  $\alpha$  receptorjev pri metabolizmu glukoze v astrocitu, smo celice stimulirali s specifičnim agonistom  $\alpha_1$ , fenilefrinom (Slika 8a), za katerega so pokazali, da vpliva na porast znotrajcelične koncentracije kalcija (Muyderman in sod., 2001). Na stimulacijo s fenilefrinom se je odzvalo 84,2 % celic, kar je bistveno več kot pri noradrenalinu (36,4 %) in izoprenalinu (18,8 %). Preverili smo, če preinkubacija astrocitov z izoprenalinom in sledeča stimulacija s fenilefrinom vpliva na doseženo amplitudo razmerja FRET (Slika 8b). Na preinkubacijo z izoprenalinom se je na podlagi pričakovanj iz predhodnih poskusov (odzivnost na izoprenalin 18,8 %, Slika 7), odzval podoben delež astrocitov ( $4/25 = 16$  %, Slika 8b), na



fenilefrin pa se je odzvalo 72 % celic, kar je v skladu s poskusom, kjer smo uporabili samo fenilefrin (Slika 8a). Na podlagi teh rezultatov smo domnevali, da so med adrenergičnimi receptorji receptorji  $\alpha_1$  ključni za razgradnjo glikogena in porast znotrajcelične koncentracije proste D-glukoze, medtem ko receptorji  $\beta$  verjetno modulirajo nadaljnji metabolizem glukoze (Slika 10). Prav tako smo pokazali, da ima na porast znotrajcelične koncentracije glukoze večji vpliv signaliziranje preko porasta  $\text{Ca}^{2+}$ , medtem je aktivacija  $\beta$  receptorjev udeležena v manjši meri kot so sprva domnevali (Pellerin in sod., 1997). Ker smo želeli potrditi pomembnost vloge  $\text{Ca}^{2+}$  v metabolizmu glukoze, smo celice stimulirali z ionomicinom (Slika 9), za katerega je znano, da vpliva na porast znotrajcelične koncentracije kalcija (Muller in sod., 2013). Na stimulacijo s tem ionoforom so se odzvale vse celice, kar potrjuje pomembno vlogo kalcija pri dvigu znotrajcelične koncentracije D-glukoze. Amplituda, časovna konstanta in maksimalna hitrost porasta razmerja FRET po dodatku ionomicina se statistično razlikuje od vrednosti pri noradrenalinu, izoprenalinu in fenilefrinu, kar lahko pojasnimo s povsem drugačnim mehanizmom porasta znotrajceličnega kalcija.

Pokazali smo, da ima kalcij ključno vlogo pri dvigu znotrajcelične koncentracije glukoze. Z namenom raziskati, kakšno vlogo ima signalizacija preko receptorjev  $\beta$  pri presnovi laktata, smo uporabili laktatni senzor Laconic (San Martin in sod., 2013), s katerim smo spremljali spremembe znotrajcelične koncentracije laktata ob stimulaciji z izoprenalinom in fenilefrinom (Slika 10). Dvig znotrajcelične koncentracije laktata s fenilefrinom smo izmerili pri 54,3 % astrocitov, dvig znotrajcelične koncentracije glukoze pa smo pri stimulaciji s tem agonistom opazili v 84,2 % astrocitov. Fenilefrin na podlagi teh rezultatov v manjši meri vpliva na dvig laktata, a je pomembnejši pri mobilizaciji glukoze iz glikogena. Na stimulacijo z izoprenalinom (preinkubacija za stimulacijo s fenilefrinom) (Slika 10b) se je odzvalo 78,6 % celic, kar je bistveno več kot pri meritvah glukoze z glukoznim senzorjem, pri katerem se je na stimulacijo z izoprenalinom odzvalo 18,8 % celic (Slika 7). Kot kaže, je signalizacija preko receptorjev  $\beta$  udeležena pri uravnavanju metabolizma laktata iz glukoze, saj se je večji delež celic na stimulacijo z izoprenalinom odzval pri merjenju znotrajceličnega laktata, manjši pa pri meritvah znotrajcelične glukoze z glukoznim senzorjem. Iz rezultatov sklepamo, da zvišanje znotrajcelične koncentracije cAMP vodi v povečano pretvorbo glukoze v laktat. Amplituda razmerja mTFP/Venus kombinirane stimulacije z izoprenalinom in fenilefrinom se statistično razlikuje od amplitude po stimulaciji s samim izoprenalinom (Slika 10b). Ob stimulaciji s fenilefrinom je namreč na voljo več glukoze, ki se po potrebi lahko pretvori v laktat, zato je tudi amplituda odziva višja. Pokazali smo, da ima aktivacija receptorjev  $\alpha_1$  ključno vlogo pri dvigu znotrajcelične koncentracije glukoze preko glikogenolize in povečanega vstopa glukoze preko transporterjev GLUT. Receptorji  $\beta$  imajo pomembno vlogo pri pretvorbi glukoze v laktat v astrocitu. Nastali laktat se lahko porabi v Krebsovem ciklu ali pa se izloči v zunajcelični prostor, kjer je na voljo za privzem nevromom, kar je v skladu s hipotezo o astrocitrno-nevronske laktatni poti (Pellerin in Magistretti, 1994).

Na podlagi poskusov, izvedenih na astrocitih Gdi1 KO (D'Adamo in sod., 2002), lahko sklepamo, da ima metabolizem glukoze izredno pomembno vlogo pri boleznih osrednjega živčevja (Slika 11). Amplituda odzivov na stimulacijo z noradrenalinom astrocitov KO se razlikuje od amplitude celic WT (Slika 11b). Zmožnost hitre mobilizacije glikogena v obdobjih povečane energijske presnove je ključnega pomena za dostavo hitre in zadostne količine glukoze in laktata nevronom. Domnevamo, da je zmanjšan metabolizem glukoze pri miših Gdi1 KO, ki so model umske manjzmožnosti, posledica spremenjenega izražanja presnovnih, transportnih in drugih proteinov.

## 5.2 INZULIN IN IGF-1 MODULIRATA CITOPLAZEMSKO GLUKOZO IN ZALOGE GLIKOGENA V ASTROCITU, NE PA TRANSPORTA ČEZ MEMBRANO CELICE

Vloga inzulina in IGF-1 je v CŽS slabo poznana, bila pa je povezana z metabolizmom glukoze v astrocitih (Hamai in sod., 1999; Shulman in sod., 2001). Pokazali smo, da inzulin in IGF-1 povečata zaloge glikogena v izoliranem astrocitu, kar je v skladu s prejšnjimi raziskavami (Dringen in Hamprecht, 1992; Heni in sod., 2011). Ugotovili smo tudi, da stimulacija z inzulinom in IGF-1 v astrocitih povzroči znižanje citosolne glukoze, kar je verjetno posledica povečane porabe glukoze za sintezo glikogena.

### 5.2.1 Inzulin in IGF-1 povečata zaloge glikogena v astrocitih neodvisno od transporta glukoze preko celične membrane

Pokazali smo, da inzulin in IGF-1 vplivata na dinamiko zalog glikogena v astrocitih. Odtegnitev glukoze je pomembno zmanjšala zaloge glikogena v astrocitu (Slika 17). To je v skladu s prejšnjimi dognanji o zmanjšanju količine glikogena v astrocitih ob odtegnitvi glukoze, kjer so uporabili metodo z radiozotopom glukoze (Dringen in Hamprecht, 1992). Glikogen se je znova sintetiziral, če smo astrocite izpostavili stradanju in nato okrevanju z glukozo. Inzulin in IGF-1 podobno povečata količino glikogena v astrocitu (Dringen in Hamprecht, 1992).

Količina glikogena v astrocitih je povezana z ravnijo znotrajcelične glukoze, ki je lahko povezana s transportom glukoze preko celične membrane. Astroцитi izražajo GLUT1 in GLUT3, a zelo malo GLUT2 in GLUT4 (Heni in sod., 2011). Za GLUT4 so pokazali, da se izraža v hipofizi, hipotalamusu, meduli (Brant in sod., 1993) in cerebelumu (Rayner in sod., 1994), ne pa v korteksu. GLUT4 so našli tudi v mikrovaskularnem endoteliju prednjih možganov in v žilnih strukturah ventromedialnega hipotalamusa (Ngarmukos in sod., 2001). Nedavna študija je pokazala, da astroцитi izražajo GLUT4 (Slika 14a) (Nijland in sod., 2014). Stimulacija astrocitov z inzulinom, pri katerem smo izmenično menjavali zunajcelično raztopino z 10 mM in 0 mM D-glukoze, je pokazala enako dinamiko spremembe znotrajcelične glukoze (Slika 14c). Ti rezultati dokazujejo, da inzulin ne vpliva

na transport glukoze preko celične membrane astrocitov, verjetno zaradi pomanjkanja na inzulin občutljive translokacije GLUT4 transporterja (Manolescu in sod., 2007).

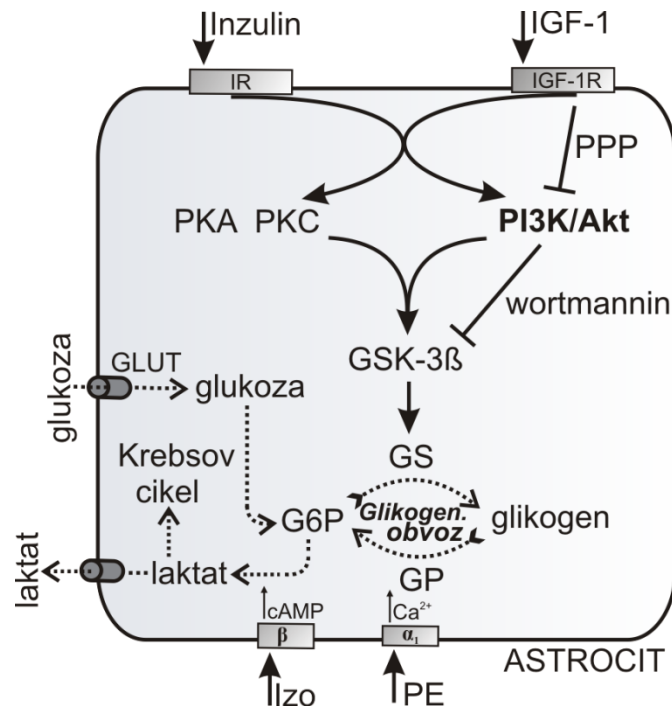
### **5.2.2 Inzulin in IGF-1 znižata koncentracijo citosolne glukoze v astrocitu preko znotrajceličnih signalnih poti**

Mehanizem preko katerega inzulinoidi povzročijo porast glikogena v astrocitu še ni bil povsem pojasnjen (Dent in sod., 1990). Znano je, da imata inzulin in IGF-1 skupno signalno pot IP3K/Akt (Heni in sod., 2011; Werner in sod., 2008). PI3/Akt fosforilira in inaktivira glikogen sintazo kinazo 3 (GSK-3), s tem pa zmanjša fosforilacijo glikogen sintaze (GS) ter poveča njeno aktivnost (Cross in sod., 1995). GS najdemo povsod po možganih, najdemo jo tako v nevronih kot astrocitih (Inoue in sod., 1988; Pellegrini in sod., 1996), večje izražanje pa so zaznali v astrocitih (Pellegrini in sod., 1996). Glikogen fosforilaza (GP) je ključen encim pri razgradnji glikogena v astrocitih (Pfeiffer-Guglielmi in sod., 2003).

Pokazali smo, da je dostopnost znotrajcelične glukoze zmanjšana po stimulaciji z inzulinom in IGF-1, kar nakazuje, da je poraba glukoze za sintezo glikogena večja kot pa vstop iz zunajceličnega prostora (Slika 13,16). Po dosedanjih študijah z radioizotopi je maksimalni dražljaj za izgradnjo glikogena dosežen pri 100 nM za inzulin in 10 nM za IGF-1 (Dringen in Hamprecht, 1992). Maksimalno znižanje citosolne koncentracije glukoze je bilo 6 % za inzulin in 9 % za IGF-1 po 300 s stimulacije. Kinetika padca koncentracije glukoze pri IGF-1 je bila bolj konstantna kot pri inzulinu, pri katerem je bila hitrejša na začetku. Razlika v padcu glukoze je statistično značilna 300 s od začetka stimulacije z inzulinom in IGF-1 ( $P = 0,022$ , Slika 13a,16a). Inhibicija sinteze glikogena s preinkubacijo z wortmanninom je zmanjšala z inzulinom posredovano znižanje ravni glukoze (Slika 13a). To je v skladu z dognanji, da inzulin modulira številne celične procese, ki za svoje delovanje potrebujejo glukozo, kar vodi v znižanje znotrajcelične koncentracije glukoze (Saltiel in Kahn, 2001). Poleg tega je GSK-3 $\beta$  negativno reguliran s protein kinazo C (PKC) in od cAMP odvisno protein kinazo A (PKA), za katero je tudi znano, da jo lahko aktivirata inzulin ali IGF-1, kar so pokazali v celicah Rat1, NIH 3T3 in HEK293 (Fang in sod., 2000; Goode in sod., 1992). Inhibicija sinteze glikogena s preinkubacijo v PPP, inhibitorju IGF-1 kinaze, je zmanjšala z IGF-1 posredovano znižanje ravni glukoze (Slika 16a).

Pokazali smo, da se raven citosolne glukoze v astrocitih zmanjša ob stimulaciji z inzulinom in IGF-1, kar nakazuje, da je stimulirana sinteza glikogena in poraba citosolne glukoze večja, kot je dovajanje glukoze v astrocite. Rezultati te študije tudi nakazujejo, da se zaloge glikogena po izpraznitvi lahko obnovijo in da inzulin in IGF-1 še ojačata resintezo glikogena. Domnevajo, da sta inzulin in IGF-1 udeležena pri tvorbi spomina in mišljenju (Benedict in sod., 2007; Craft in sod., 1999; Craft in sod., 2012). Naši izsledki jasno podpirajo idejo, da nepravilno delovanje signalne poti inzulinoidov lahko vodi do

nezadostne resinteze glikogena. Pomanjkanje tega energijskega pufra s kratkim delovanjem ima lahko vpliv na neurodegenerativne bolezni, psihiatrična obolenja in uravnavanje vnosa hrane.



**Slika 18. Inzulin in IGF-1 uravnavata glikogenske zaloge v astrocitu**

Po vezavi inzulina in IGF-1 na pripadajoče receptorje se aktivirajo številne, tudi nekatere skupne signalne poti. PI3/Akt pot je udeležena pri sintezi glikogena. Aktivacija poti PI3K/Akt inaktivira GSK-3 $\beta$ . GSK-3 $\beta$  se inaktivira tudi preko protein kinaze A (PKA) in protein kinaze C (PKC). Inaktivacija GSK-3 $\beta$  vodi v manj fosforilirano in s tem bolj aktivno glikogen sintazo (GS), kar vodi do zmanjšanja zalog znotrajcelične glukoze-6-fosfata (G6P) in koncentracije glukoze. GLUT1 in GLUT3 sta najpomembnejša transporterja v astrocitih, GLUT4 je tudi prisoten. Učinki IGF-1 so inhibirani s selektivnim IGF-1R inhibitorjem pikropodofilotoksinom (PPP) in PI3/Akt pot pa je inhibirana z wortmanninom, selektivnim PI3K inhibitorjem. Izoprenalin (Izo) in fenilerin (PE) uravnavata presnovo glukoze v astrocitu. Izoprenalin preko receptorjev  $\beta$  zviša cAMP, s tem pa poveča pretvorbo glukoze v laktat. Fenilefrin preko receptorjev  $\alpha_1$  zviša znotrajcelični  $\text{Ca}^{2+}$  in vpliva predvsem na glikogenolizo. Nastali laktat iz G6P se lahko izloča v zunajcelični prostor ali pa se porablja v Krebsovem ciklu.

**Figure 18. Modulation of glycogen stores in astrocytes by insulin and IGF-1**

After binding of insulin or IGF-1 to their receptors, several mutual signalling pathways may be activated. The pathway leading to glycogen synthesis is the PI3/Akt pathway. Activation of the PI3K/Akt pathway inactivates GSK-3 $\beta$ . GSK-3 $\beta$  is also inactivated through the protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) pathways. Inactivated GSK-3 $\beta$  results in less phosphorylated and thus more active glycogen synthase (GS) which in turn depletes intracellular glucose 6-phosphate (G6P) and lowers the glucose concentration. GLUT1 and GLUT3 are major glucose transporters in astrocytes; GLUT4 is also present. Glucose is phosphorylated by hexokinase (HK) to produce G6P, which in turn negatively regulates the activity of HK. The effect of IGF-1 is inhibited by a selective IGF-1R inhibitor, picropodophyllotoxin (PPP), and the PI3/Akt pathway is inhibited by wortmannin, a selective PI3K inhibitor. Isoprenaline (Izo) and phenylephrine (PE) regulate glucose metabolism in astrocyte. Isoprenaline via  $\beta$  adrenergic receptors elevates cAMP, which stimulates conversion of glucose to lactate. Phenylephrine via  $\alpha_1$  adrenergic receptors elevates intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , which mainly stimulates glycogenolysis. Lactate produced from G6P can be exported to extracellular space or used in Krebs cycle.

## 6 SKLEPI

Namen doktorske disertacije je bil v astrocitih proučiti dinamiko spreminjanja ravni glukoze z glukoznim senzorjem. Ker so raziskave v preteklih letih nakazale, da je metabolizem glukoze zelo tesno povezan s produkcijo laktata v astrocitih, smo izvedli tudi meritve z laktatnim senzorjem. S pomočjo superfuzijskega sistema in akutnega dodajanja različnih zunajceličnih signalnih molekul in specifičnih agonistov na receptorje smo preučili signalne poti, ki vplivajo na znotrajcelično dinamiko glukoze in laktata.

Rezultate disertacije smo strnili v naslednje sklepe:

- Aktivacija adrenergičnih receptorjev z noradrenalinom zviša koncentracijo citosolne glukoze.
- Aktivacija adrenergičnih receptorjev  $\alpha_1$  je verjetno glavni dražljaj za razgradnjo glikogena. Signaliziranje preko receptorjev  $\beta$  stimulira predvsem pretvorbo glukoze v laktat.
- Miši, ki so model umske manjzmožnosti z izbitim genom za *Gdi1*, imajo spremenjen metabolizem glukoze v astrocitu, kar se kaže v zmanjšanem porastu koncentracije glukoze pri stimulaciji z noradrenalinom.
- Inzulin in IGF-1 znižata koncentracijo citosolne glukoze v astrocitu s pospeševanjem vgradnje glukoze v glikogen.

## 7 POVZETEK

Možgani so energijsko potraten organ. Predstavljajo le 2 % telesne mase, potrošijo pa 20% kisika in 25% glukoze glede na celotno bazalno porabo organizma. Večino energije se porabi za vzpostavljanje mirovnega membranskega potenciala z delovanjem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Glukoza je glavni energijski vir za možgane človeka. Nevroni in celice glije komunicirajo preko kemičnih signalov, kar je ključnega pomena za normalno delovanje živčnega sistema. Astrociti so pomembni tudi za metabolizem možganov. Glukoza iz krvi vstopa v astrocite z transporterji GLUT, v membranah humanih astrocitov sta prisotna GLUT1 in GLUT3, zelo malo je GLUT2 in GLUT4, pri katerem zunaj osrednjega živčevja stimulacija inzulinskih receptorjev aktivira njegovo translokacijo na membrano. Ko glukoza vstopi v astrocit, se lahko presnovi v manjše molekule (npr. laktat), ali pa se skladišči v obliki glikogena. Dognanja o metabolizmu laktata v astrocitu so bila podlaga za postavitev hipoteze o astrocitno nevronski laktatni poti (Pellerin in Magistretti, 1994). Model opisuje produkcijo laktata iz glukoze v astrocitih in njegovo sproščanje ter privzem v nevrone za oksidacijo. Glikogen je zaloga energije in je skoraj izključno prisoten v astrocitih. Pri presnovi glikogena v astrocitih obstaja glikogenski obvoz in poteka s pomočjo encimov glikogen sintaze (GS) in glikogen fosforilaze (GP). Glikogen je še posebej pomemben vir energije v hipoksičnih razmerah. Skoraj polovica vse glukoze, ki vstopi v astrocite, se presnovi posredno, prek vgrajevanja v glikogen. Glijotransmitterji, ki se izločajo iz astrocitov, imajo pomembno vlogo v tripartitni sinapsi, obratno pa imajo tudi neurotransmitterji pomemben vpliv na presnovo v astrocitih. Pri tem sodeluje noradrenalin, ki podobno kot adrenalin v mišicah, v astrocitih povzroči razgradnjo glikogena. V astrocitih noradrenalin sproži tudi valove aktivnosti kalcija. Astrociti so proti pomanjkanju kisika odpornejši od nevronov. Pri hipoksiji se presnova preusmeri od oksidativne fosforilacije k anaerobni glikolizi. Na presnovo glukoze v astrocitih vplivajo številne molekule. Glikogenolizo npr. uravnava noradrenalin, ki aktivira glikogen fosforilazo. Inzulin in IGF1 pa stimulirajo sintezo glikogena preko glikogen sintaze. Večina študij metabolizma glukoze je bila izvedena s pomočjo radioizotopov. Doslej še nobene bolezni pri človeku niso neposredno povezali s presnovo glikogena v astrocitu. Pri našem delu smo v ospredje postavili meritve z glukoznim FLII12Pglu-700 $\mu\Delta$ 6 in laktatnim Laconic nanosenzorjem FRET. Glukozni FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 nanosenzor FRET smo uporabili za spremljanje citosolne koncentracije glukoze v posameznem astrocitu ob stimulaciji z noradrenalinom, specifičnima agonistoma  $\alpha_1$  (fenilefrin) in  $\beta$  (izoprenalin) receptorjev ter ionomicinom, inzulinom in IGF-1.

Pokazali smo, da noradrenalin v astrocitu povzroči glikogenolizo in s tem zviša znotrajcelično koncentracijo D-glukoze, odzivnost pa 42,9 %, kar je v skladu s predhodnim delom. Na stimulacijo z izoprenalinom, agonistom  $\beta$  receptorjev, se je odzvalo 18,8 % (Slika 7) astrocitov. Maksimalna amplituda po stimulaciji z izoprenalinom predstavlja 40 % spremembe razmerja FRET po stimulaciji z noradrenalinom. Kot kažejo rezultati (Slika

7, Slika 8b), signaliziranje preko receptorjev  $\beta$  in cAMP v manjšem deležu astrocitov dvigne znotrajcelično koncentracijo proste D-glukoze v astrocitu. Na stimulacijo s fenilefrinom, agonistom receptorjev  $\alpha_1$ , se je odzvalo 84,2 % astrocitov. Odzivnost celic na selektivni  $\alpha_1$  agonist je večja kot odzivnost na selektivni  $\beta$  agonist, kjer se odziva manj kot 20 % celic. Z namenom potrditi vlogo kalcija pri dvigu znotrajcelične koncentracije glukoze, smo astrocite stimulirali z ionomicinom, ki učinkovito zviša znotrajcelično koncentracijo kalcija. Znotrajcelična glukoza je v astrocitu ob stimulaciji z ionomicinom narasla do amplitude  $0,45 \pm 0,06$  a.e., kar je statistično razlikuje od amplitud po stimulaciji z noradrenalinom, izoprenalinom in fenilefrinom. Metabolizem laktata je tesno povezan z metabolizmom glukoze, zato smo preverili, kako specifična agonista  $\alpha_1$  in  $\beta$  receptorjev vplivata na citosolne vrednosti laktata v astrocitu. Ob uporabi nanosenzorja Laconic je bilo na fenilefrin odzivnih 54,2 % astrocitov. Na izoprenalin se je odzvalo 78,6 % celic. Na podlagi teh rezultatov smo domnevali, da so receptorji  $\alpha_1$  ključni za razgradnjo glikogena in porast znotrajcelične koncentracije proste D-glukoze, medtem ko receptorji  $\beta$  modulirajo nadaljnjo presnovo glukoze v laktat. S tem smo pokazali, da ima na porast znotrajcelične koncentracije glukoze večji vpliv signaliziranje preko porasta  $Ca^{2+}$ , medtem je aktivacija  $\beta$  receptorjev udeležena v manjši meri kot so sprva domnevali. Aktivacija  $\alpha_1$  receptorjev v manjši meri vpliva na dvig koncentracije laktata v astrocitu in je pomembnejša pri mobilizaciji glikogena. Kot kaže, je signalizacija preko  $\beta$  receptorjev udeležena pri uravnavanju metabolizma laktata iz glukoze, saj se je večji delež celic na stimulacijo z izoprenalinom odzval pri merjenju znotrajceličnega laktata (78,6 %), manjši pa pri meritvah znotrajcelične glukoze z glukoznim senzorjem (manj kot 20 %). Iz rezultatov sklepamo, da zvišanje znotrajcelične koncentracije cAMP vodi v povečano pretvorbo glukoze v laktat. Nastali laktat se lahko porabi v Krebsovem ciklu ali pa se izloči v zunajcelični prostor, kjer je na voljo za privzem nevrom, kar je v skladu s hipotezo o astrocitno-nevromski laktatni poti (Pellerin in Magistretti, 1994).

Umska manjzmožnost je prisotna pri približno 2 % populacije. Miši z izbitim genom za Gdi1 (angl. »Gdi1 knockout«, Gdi1 KO) so se izkazale kot dober model za študij umske manjzmožnosti (Bianchi in sod., 2009; D'Adamo in sod., 2002). Na mišjih astrocitih z izbitim genom za protein Gdi1 smo s pomočjo glukoznega FLII12GLU-700 $\mu\Delta 6$  nanosenzorja FRET pokazali, da se divji tip (angl. »wild type«, WT) in tip z izbitim genom za Gdi1 protein razlikujeta v odzivnosti na stimulacijo z noradrenalinom. Amplituda odziva pri WT celicah se statistično razlikuje od amplitude KO celic. Na podlagi poskusov izvedenih na astrocitih Gdi1 KO, lahko sklepamo, da ima metabolizem glukoze izredno pomembno vlogo pri umski manjzmožnosti. Zmožnost hitre mobilizacije glikogena v obdobjih povečane energijske presnove je ključnega pomena za dostavo hitre in zadostne količine glukoze in laktata nevrom. Domnevamo, da je zmanjšan metabolizem glukoze pri miših Gdi1 KO, ki so model umske manjzmožnosti, posledica spremenjenega izražanja presnovnih, transportnih in drugih proteinov.

Pokazali smo tudi, da so na astrocitih inzulinski receptorji in da se citosolna koncentracija glukoze zniža ob stimulaciji z inzulinom. Opazili smo dva tipa odzivov pri stimulaciji z inzulinom, prehodno in neprehodno. Neprehodno znižanje citosolne koncentracije glukoze v astrocitih je konstantno in se je nadaljevalo tudi po odstranitvi inzulina iz zunajcelične raztopine, ki je oblivala celice. Pri prehodnem znižanju se glukoza po začetnem znižanju vrne na začetno raven. Celice, pretretirane z wortmanninom, so se po stimulaciji z inzulinom odzvale z manjšo spremembo razmerja FRET, samo 1/3 zmanjšanja znotrajcelične koncentracije glukoze v primerjavi z netretiranimi celicami s konstantnim odzivom. Znižanje citosolne koncentracije glukoze ob stimulaciji z inzulinom je verjetno posledica povečane porabe glukoze za sintezo glikogena. Za opredelitev vpliva inzulina na vstop glukoze v astrocite smo celice izmenoma oblivali z visoko ali nizko koncentracijo D-glukoze v zunajcelični raztopini z dodanim 1  $\mu$ M inzulinom, in sicer: z 10 mM D-glukozo 3 min, 0 mM D-glukozo 5 min in 10 mM D-glukozo 3 min. Izračunali smo čase porastov in znižanj, ki se niso razlikovali (transport preko celične membrane) pri netretiranih in z inzulinom tretiranih celicah. Prav tako se niso razlikovali maksimalni nakloni porasta in padca razmerja FRET med z inzulinom stimuliranimi in nestimuliranimi celicami. Ta dejstva nakazujejo, da inzulin ne vpliva na transport glukoze preko celične membrane astrocitov, verjetno zaradi pomanjkanja na inzulin občutljive translokacije GLUT4 transporterja. Pokazali smo, da astrociti v primarni kulturi izražajo IGF-1 receptorje in da stimulacija z IGF-1 vpliva na znižanje citosolne koncentracije D-glukoze. Pri celicah pretretiranih s pikropodofilotoksinom (PPP), IGF-1 kinaznim inhibitorjem, smo opazili manjše znižanje znotrajcelične koncentracije glukoze ob stimulaciji z IGF-1 v primerjavi z netretiranimi celicami. Znižanje citosolne koncentracije glukoze ob stimulaciji z IGF-1 je verjetno posledica povečane porabe glukoze za sintezo glikogena. Barvanje PAS smo uporabili za vizualizacijo glikogena, konfokalno mikroskopijo pa za analizo količine glikogena v astrocitih, ki so bili izpostavljeni zunajcelični raztopini brez glukoze in raztopini z D-glukozo ter dodanim inzulinom ali IGF-1. Ugotovili smo, da je količina glikogena v astrocitih, ki so bili izpostavljeni odtegnitvi glukoze bistveno manjša v primerjavi z astrociti, ki smo jim najprej za 2 h odtegnili glukozo, nato pa jim omogočili okrevanje v DMEM s 5,55 mM glukozo. Stimulacija z inzulinom ali IGF-1 po predhodnem stradanju in nato okrevanju je še povečala zaloge glikogena v primerjavi z nestimuliranimi celicami, saj se je intenziteta barvanja PAS povečala za ~1,4-krat. Inzulin in IGF-1 imata podobne učinke na obnovo glikogena v astrocitih. Rezultati te študije kažejo, da se zaloge glikogena po izpraznitvi lahko obnovijo in da inzulin in IGF-1 še ojačata resintezo glikogena. Naši izsledki jasno podpirajo idejo, da nepravilno delovanje signalne poti inzulinoidov lahko vodi do nezadostne resinteze glikogena. Pomanjkanje tega energijskega pufra s kratkim delovanjem ima lahko vpliv na nevrodegenerativne bolezni, psihiatrična obolenja in regulacijo vnosa hrane.



## 7.1 SUMMARY

The brain is energy consuming organ. It represents only 2 % of the body mass, but it consumes 20 % of oxygen and 25 % of glucose at basal metabolic level. Most of energy is used for maintenance of resting membrane potential via the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Glucose is the main energy source for human brain. Neurons and glial cells communicate with each other, which is of great importance for functioning of the nervous system. Glucose enters astrocyte through GLUT transporters, human astrocytes express GLUT1 and GLUT3, however very little GLUT2 and GLUT4 is present, in which insulin stimulation outside central nervous system causes translocation of transporter to cell membrane. After entering into the astrocyte, glucose can be metabolised to smaller molecules (lactate) or stored as glycogen. Research on lactate metabolism in astrocytes resulted in establishing astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis (Pellerin in Magistretti, 1994). The model describes lactate production in astrocytes, its release and uptake into the astrocytes. Glycogen in brain is exclusively present in astrocytes. Metabolism of glucose in astrocytes is described as glycogen shunt. Glycogen synthase and glycogen phosphorylase are the main enzymes involved. Glycogen is especially important source of energy in hypoxic conditions. Almost half of glucose that enters into the astrocyte is metabolised via glycogen shunt. Astrocytes release gliatransmitters which have important role in tripartite synapse. Neurotransmitters vice versa have significant impact on astrocyte energy metabolism. Noradrenaline is one of neurotransmitters involved in glycogenolysis which effect is similar to adrenaline in muscle cells. Noradrenaline also induces calcium waves in astrocytes. Astrocytes are more resistant to oxygen deprivation than neurons. Metabolism is shifted from oxidative phosphorylation to anaerobic glycolysis in hypoxia. Glucose metabolism in astrocytes is regulated with numerous signalling molecules. Glycogenolysis is induced for instance with noradrenaline, which activates glycogen phosphorylase. Insulin and IGF-1 stimulate glycogen synthesis via glycogen synthase. Most of the studies involving glycogen metabolism was performed with radioisotopes. There has been yet no disorder directly linked to impaired glycogen metabolism in human. We performed experiments using glucose FLII12Pglu-700 $\mu\Delta$ 6 and lactate Laconic FRET nanosensors. Glucose FLII12GLU-700 $\mu\Delta$ 6 FRET nanosensor was used to measure cytosolic glucose concentration in single astrocyte stimulated with following substances: noradrenaline, specific  $\alpha_1$  agonist (phenylephrine),  $\beta$  agonist (isoprenaline), ionomycin, insulin and IGF-1.

We showed, that noradrenaline induces glycogenolysis and consequently elevates intracellular D-glucose concentration in astrocytes, responsiveness 42.9 %, which is in line with previous work. Astrocytes stimulated with isoprenaline responded in 18.8 % (Figure 7). Maximal amplitude response of isoprenaline represents 40 % change of noradrenaline response. According to results (Figure 7, Figure 8b), signalling via  $\beta$  receptors and cAMP partially elevates intracellular D-glucose concentration. Astrocytes stimulated with phenylephrine responded in 84.2 %. Responsiveness to specific  $\alpha_1$  agonist is higher than

responsiveness to specific  $\beta$  agonist, where astrocytes responded in less than 20 %. In order to confirm the role of intracellular calcium in elevating the cytosolic glucose concentration, we stimulate astrocytes with ionomycin, which effectively elevates intracellular calcium concentration. Cytosolic glucose concentration after ionomycin stimulation raised to  $0.45 \pm 0.06$  a.u., which is statistically different from amplitudes of noradrenaline, isoprenaline and phenylephrine stimulation. Lactate metabolism is closely related to glucose metabolism, therefore we checked how specific  $\alpha_1$  in  $\beta$  agonists effect cytosolic levels of lactate in astrocytes expressing Laconic nanosensor. Astrocytes stimulated with phenylephrine responded in 54.2 % and while stimulated with isoprenaline in 78.6 %. We conclude that  $\alpha_1$  receptors are mainly involved in glycogenolysis and increase of intracellular D-glucose concentration, while  $\beta$  receptors primarily modulate further glucose metabolism to lactate. This means that increase of cytosolic glucose concentration is mainly mediated via increase in intracellular calcium and less by activation of  $\beta$  receptors, which were thought to be the main signalling pathway. Activation of  $\alpha_1$  receptors seems to be more important in glycogen mobilization and less in increase of intracellular lactate concentration in astrocyte. Regulation of lactate metabolism from glucose is probably primarily signalled via  $\beta$  receptors, as higher percentage of cells responded to isoprenaline stimulation in lactate measurements (78.6 %) and lower in glucose measurements (less than 20 %). Results indicate that increase of intracellular concentration of cAMP leads to higher rate of conversion of glucose to lactate. Lactate can then be used in Krebs cycle or exported in extracellular space, where can be imported for energy demand of neurons, which is in line with astrocyte-neuron shuttle hypothesis (Pellerin in Magistretti, 1994).

Intellectual disability is present in approximately 2 % of population. Gdi1 knockout mice are thought to be suitable model for intellectual disability (Bianchi in sod., 2009; D'Adamo in sod., 2002). They have impaired short-term memory and changed behaviour patterns. We expressed glucose nanosensor in wild type and Gdi1 knockout mice astrocytes and stimulated them with noradrenaline. We have shown that wild type astrocytes type responded to noradrenaline stimulation with higher amplitude (WT,  $a = 0.2625 \pm 0.0552$  a.u.; KO,  $a = 0.1392 \pm 0.0233$  a.u.). We propose that glucose metabolism has important role in disorders of central nervous system. The ability of fast glycogen mobilization in the state of high energy demands is of great importance for quick and sufficient delivery of glucose and lactate to neurons. We propose that altered glucose metabolism in Gdi1 knockout mice astrocytes is due to different expression of metabolic, transport and other cell proteins.

We showed that astrocytes express insulin receptors. Moreover, insulin stimulation leads to decrease of cytosolic glucose concentration. We observed two types of responses due to insulin stimulation, persistent and transient responses. Persistent decrease of cytosolic glucose concentration is constant and continued even after insulin removal from extracellular solution. In transient responses glucose rises to basal level after initial drop.

Cells treated with wortmannin responded to insulin treatment with lower FRET ratio, just 1/3 of decrease of intracellular glucose concentration in comparison with untreated cells with persistent response. Cytosolic glucose concentration decrease is probably due to increased glucose utilization for glycogen formation. In order to determine effect of insulin on glucose uptake, we superfused cells with high or low D-glucose extracellular solution with added 1  $\mu$ M insulin in the following order: 10 mM D-glucose for 3 min, 0 mM D-glucose for 5 min and 10 mM D-glucose for 3 min. The measurements revealed that the rise time<sub>20-80%</sub> and fall time<sub>20-80%</sub> of the FRET ratio were not significantly different between control cells and insulin-stimulated cells. We further tested maximal rates (slopes) of the rise and fall times in the FRET ratio, which did not differ in insulin-stimulated cells compared with non-stimulated cells. This provides functional evidence that insulin does not affect glucose transport across the plasma membrane, likely due to lack of insulin-sensitive GLUT4 transporter translocation. We showed that astrocytes express IGF-1 receptors. Moreover, IGF-1 stimulation leads to decrease of cytosolic glucose concentration. We show that the availability of intracellular glucose after insulin or IGF-1 stimulation is decreased, which indicates that the stimulated glycogen synthesis exceeds glucose utilization in astrocytes. PAS staining and confocal microscopy were performed to visualize and analyse the glycogen content in astrocytes exposed to glucose-free and glucose-rich extracellular solution with added insulin or IGF-1. We found that the glycogen content was significantly lower in astrocytes exposed to glucose deprivation for 2 h compared with astrocytes that were first exposed to glucose deprivation for 2 h and then to re-feeding for 2 h in DMEM containing 5.55 mM glucose. We show that after initial starvation astrocyte stimulation with insulin and IGF-1 while recovering further augmented the glycogen levels, because the PAS staining increased by ~1.4-fold. Insulin and IGF-1 alike enhance accumulation of glycogen in astrocytes. The results of the present study demonstrate that, after glucose depletion, glycogen stores are rebuilt where insulin and IGF-1 boost the process of glycogen formation. Our data clearly support the idea that dysfunction of insulinoid signalling may lead to insufficient replenishing of glycogen stores. The lack of a short-term energy buffer may affect processes involved in neurodegenerative disorders, psychiatric disorders and regulation of food intake.

## 8 VIRI

- Abi-Saab WM, Maggs DG, Jones T, Jacob R, Srihari V, Thompson J, Kerr D, Leone P, Krystal JH, Spencer DD, During MJ, Sherwin RS. 2002. Striking differences in glucose and lactate levels between brain extracellular fluid and plasma in conscious human subjects: effects of hyperglycemia and hypoglycemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22: 271-279
- Ahmed K, Tunaru S, Tang C, Muller M, Gille A, Sassmann A, Hanson J, Offermanns S. 2010. An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell metabolism*, 11: 311-319
- Amara SG, Fontana AC. 2002. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry international*, 41: 313-318
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A. 2014. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, 81: 728-739
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, 22: 208-215
- Armstrong CS, Wuarin L, Ishii DN. 2000. Uptake of circulating insulin-like growth factor-I into the cerebrospinal fluid of normal and diabetic rats and normalization of IGF-II mRNA content in diabetic rat brain. *Journal of neuroscience research*, 59: 649-660
- Attwell D, Laughlin SB. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21: 1133-45
- Banks WA. 2004. The source of cerebral insulin. *European journal of pharmacology*, 490: 5-12
- Barber DL, Ganz MB. 1992. Guanine nucleotides regulate beta-adrenergic activation of Na-H exchange independently of receptor coupling to Gs. *The Journal of biological chemistry*, 267: 20607-20612
- Barros LF. 2013. Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends in neurosciences*, 36: 396-404
- Barros LF, Deitmer JW. 2010. Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain research reviews*, 63: 149-159
- Baskin DG, Figlewicz DP, Woods SC, Porte D, Jr., Dorsa DM. 1987. Insulin in the brain. *Annual review of physiology*, 49: 335-347
- Bassil F, Fernagut PO, Bezard E, Meissner WG. 2014. Insulin, IGF-1 and GLP-1 signaling in neurodegenerative disorders: Targets for disease modification? *Progress in neurobiology*, 118, 1-18
- Baura GD, Foster DM, Porte D, Jr., Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW. 1993. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *The Journal of clinical investigation*, 92: 1824-1830
- Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell metabolism*, 14: 724-738
- Ben-Yoseph O, Boxer PA, Ross BD. 1994. Oxidative stress in the central nervous system: monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway. *Developmental neuroscience*, 16: 328-336

- Benedict C, Hallschmid M, Schultes B, Born J, Kern W. 2007. Intranasal insulin to improve memory function in humans. *Neuroendocrinology*, 86: 136-142
- Bergersen LH, Gjedde A. 2012. Is lactate a volume transmitter of metabolic states of the brain? *Frontiers in neuroenergetics*, 4: 5
- Bianchi V, Farisello P, Baldelli P, Meskenaite V, Milanese M, Vecellio M, Muhlemann S, Lipp HP, Bonanno G, Benfenati F, Toniolo D, D'Adamo P. 2009. Cognitive impairment in Gdi1-deficient mice is associated with altered synaptic vesicle pools and short-term synaptic plasticity, and can be corrected by appropriate learning training. *Human molecular genetics*, 18: 105-117
- Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ. 1996. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16: 1079-1089
- Bittner CX, Loaiza A, Ruminot I, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, Gutierrez R, Cordova A, Valdebenito R, Frommer WB, Barros LF. 2010. High resolution measurement of the glycolytic rate. *Frontiers in neuroenergetics*, 2: Article 26, 1-11
- Blakesley VA, Scrimgeour A, Esposito D, Le Roith D. 1996. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine & growth factor reviews*, 7: 153-159
- Blomqvist G, Gjedde A, Gutniak M, Grill V, Widen L, Stone-Elander S, Hellstrand E. 1991. Facilitated transport of glucose from blood to brain in man and the effect of moderate hypoglycaemia on cerebral glucose utilization. *European journal of nuclear medicine*, 18: 834-837
- Bollen M, Keppens S, Stalmans W. 1998. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *The Biochemical journal*, 336 ( Pt 1): 19-31
- Bonkowski D, Katyshev V, Balabanov RD, Borisov A, Dore-Duffy P. 2011. The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids and barriers of the CNS*, 8: 1-12
- Brant AM, Jess TJ, Milligan G, Brown CM, Gould GW. 1993. Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochemical and biophysical research communications*, 192: 1297-1302
- Brown AM. 2004. Brain glycogen re-awakened. *Journal of neurochemistry*, 89: 537-52
- Brown AM, Ransom BR. 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55: 1263-1271
- Brown AM, Tekkok SB, Ransom BR. 2003. Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *The Journal of physiology*, 549: 501-512
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR. 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. 289: 2122-2125
- Callahan DJ, Engle MJ, Volpe JJ. 1990. Hypoxic injury to developing glial cells: protective effect of high glucose. *Pediatric research*, 27: 186-190
- Castro MA, Beltran FA, Brauchi S, Concha, II. 2009. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *Journal of neurochemistry*, 110: 423-440
- Cataldo AM, Broadwell RD. 1986. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II.

- Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *Journal of neurocytology*, 15: 511-524
- Chavez JC, Pichiule P, Boero J, Arregui A. 1995. Reduced mitochondrial respiration in mouse cerebral cortex during chronic hypoxia. *Neuroscience letters*, 193: 169-172
- Cheng CL, Gao TQ, Wang Z, Li DD. 2005. Role of insulin/insulin-like growth factor 1 signaling pathway in longevity. *World journal of gastroenterology*, 11: 1891-1895
- Choi IY, Seaquist ER, Gruetter R. 2003. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *Journal of neuroscience research*, 72: 25-32
- Cooper J, FE. B, Roth R. 1996. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. New York, Oxford University Press: 416 str.
- Cotecchia S, Kobilka BK, Daniel KW, Nolan RD, Lapetina EY, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW. 1990. Multiple second messenger pathways of alpha-adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *The Journal of biological chemistry*, 265: 63-69
- Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC. 1999. Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Archives of general psychiatry*, 56: 1135-1140
- Craft S, Baker LD, Montine TJ, Minoshima S, Watson GS, Claxton A, Arbuckle M, Callaghan M, Tsai E, Plymate SR, Green PS, Leverenz J, Cross D, Gerton B. 2012. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Archives of neurology*, 69: 29-38
- Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte D, Jr. 1998. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology*, 50: 164-168
- Crerar MM, Karlsson O, Fletterick RJ, Hwang PK. 1995. Chimeric muscle and brain glycogen phosphorylases define protein domains governing isozyme-specific responses to allosteric activation. *The Journal of biological chemistry*, 270: 13748-13756
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378: 785-789
- Cruz NF, Diemel GA. 2002. High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22: 1476-1489
- D'Adamo P, Welzl H, Papadimitriou S, Raffaele di Barletta M, Tiveron C, Tatangelo L, Pozzi L, Chapman PF, Knevet SG, Ramsay MF, Valtorta F, Leoni C, Menegon A, Wolfer DP, Lipp HP, Toniolo D. 2002. Deletion of the mental retardation gene *Gdi1* impairs associative memory and alters social behavior in mice. *Human molecular genetics*, 11: 2567-2580
- Dent P, Lavoigne A, Nakielny S, Caudwell FB, Watt P, Cohen P. 1990. The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle. *Nature*, 348: 302-308
- Deuschle K, Okumoto S, Fehr M, Looger LL, Kozhukh L, Frommer WB. 2005. Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite

- sensors by semirational protein engineering. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 14: 2304-2314
- Deutch A, Roth R. 1999. *Fundamental Neuroscience*. San Diego, Academic Press: 1280 str.
- Dienel GA, Ball KK, Cruz NF. 2007. A glycogen phosphorylase inhibitor selectively enhances local rates of glucose utilization in brain during sensory stimulation of conscious rats: implications for glycogen turnover. *Journal of neurochemistry*, 102: 466-478
- Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B. 1993. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain research*, 623: 208-214
- Dringen R, Hamprecht B. 1992. Glucose, insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. *Journal of neurochemistry*, 58: 511-517
- Erecinska M, Silver IA. 1990. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress in neurobiology*, 35: 245-296
- Evans RD, Brown AM, Ransom BR. 2013. Glycogen function in adult central and peripheral nerves. *Journal of neuroscience research*, 91: 1044-1049
- Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC, Jr., Woodgett JR, Mills GB. 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 11960-11965
- Fehr M, Frommer WB, Lalonde S. 2002. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 9846-9851
- Fehr M, Lalonde S, Lager I, Wolff MW, Frommer WB. 2003. In vivo imaging of the dynamics of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors. *The Journal of biological chemistry*, 278: 19127-19133
- Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernandez-Novell JM, Garcia-Rocha M, de la Iglesia N, Cid E, Guinovart JJ. 2003. Control of glycogen deposition. *FEBS letters*, 546: 127-132
- Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Turk A, Hoyer S, Zochling R, Boissl KW, Jellinger K, Riederer P. 1998. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *105: 423-438*
- Gerozissis K. 2003. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cellular and molecular neurobiology*, 23: 1-25
- Gibbs ME, Anderson DG, Hertz L. 2006. Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chickens. *Glia*, 54: 214-222
- Gil-Bea FJ, Solas M, Solomon A, Mugueta C, Winblad B, Kivipelto M, Ramirez MJ, Cedazo-Minguez A. 2010. Insulin levels are decreased in the cerebrospinal fluid of women with prodromal Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 22: 405-413
- Girnita A, Girnita L, del Prete F, Bartolazzi A, Larsson O, Axelson M. 2004. Cyclolignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. *Cancer research*, 64: 236-242
- Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ. 1992. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *The Journal of biological chemistry*, 267: 16878-16882

- Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA. 2008. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*, 456: 745-749
- Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY. 2001. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *The Journal of biological chemistry*, 276: 29188-29194
- Hamai M, Minokoshi Y, Shimazu T. 1999. L-Glutamate and insulin enhance glycogen synthesis in cultured astrocytes from the rat brain through different intracellular mechanisms. *Journal of neurochemistry*, 73: 400-407
- Harvey L AB, Lawrence ZS, Paul M, David B, James D. 2000. *Molecular cell biology*. New York, W. H. Freeman: 1184 str.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein M. 1978. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*, 272: 827-829
- Hawkins RA. 2009. The blood-brain barrier and glutamate. *The American journal of clinical nutrition*, 90: 867S-874S
- Heni M, Hennige AM, Peter A, Siegel-Axel D, Ordelheide AM, Krebs N, Machicao F, Fritsche A, Haring HU, Staiger H. 2011. Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PloS one*, 6: e21594: 8 str.
- Hertz L, Chen Y, Gibbs ME, Zang P, Peng L. 2004. Astrocytic adrenoceptors: a major drug target in neurological and psychiatric disorders? *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, 3: 239-267
- Hertz L, Lovatt D, Goldman SA, Nedergaard M. 2010. Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca(2+)]<sub>i</sub>. *Neurochemistry international*, 57: 411-420
- Hertz L, O'Dowd BS, Ng KT, Gibbs ME. 2003. Reciprocal changes in forebrain contents of glycogen and of glutamate/glutamine during early memory consolidation in the day-old chick. *Brain research*, 994: 226-233
- Hertz L, Peng L, Dienel GA. 2007. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27: 219-249
- Holman GD, Kasuga M. 1997. From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia*, 40: 991-1003
- Hyder F, Patel AB, Gjedde A, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG. 2006. Neuronal-glia glucose oxidation and glutamatergic-GABAergic function. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26: 865-877
- Ibrahim MZ. 1975. Glycogen and its related enzymes of metabolism in the central nervous system. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 52: 3-89
- Inoue N, Matsukado Y, Goto S, Miyamoto E. 1988. Localization of glycogen synthase in brain. *Journal of neurochemistry*, 50: 400-405
- Jakoby P, Schmidt E, Ruminot I, Gutierrez R, Barros LF, Deitmer JW. 2014. Higher transport and metabolism of glucose in astrocytes compared with neurons: a multiphoton study of hippocampal and cerebellar tissue slices. *24: 222-231*
- Jares-Erijman EA, Jovin TM. 2003. FRET imaging. *Nature biotechnology*, 21: 1387-1395



- Jeffery J, Jornvall H. 1983. Enzyme relationships in a sorbitol pathway that bypasses glycolysis and pentose phosphates in glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 901-905
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. 1998. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*, 23: 1-10
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T. 2000. *Principles of Neural Sciences*. 4<sup>th</sup> ed. New York, McGraw Hill: 1414 str.
- Kern W, Peters A, Fruehwald-Schultes B, Deininger E, Born J, Fehm HL. 2001. Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology*, 74: 270-280
- Kimelberg HK. 2007. Supportive or information-processing functions of the mature protoplasmic astrocyte in the mammalian CNS? A critical appraisal. *Neuron glia biology*, 3: 181-189
- Kodl CT, Seaquist ER. 2008. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocrine reviews*, 29: 494-511
- Kong J, Shepel PN, Holden CP, Mackiewicz M, Pack AI, Geiger JD. 2002. Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22: 5581-5587
- Kreft M, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A. 2012. Aspects of astrocyte energy metabolism, amino acid neurotransmitter homeostasis and metabolic compartmentation. *ASN neuro*, 4: 187-199
- Kreft M, Luksic M, Zorec TM, Prebil M, Zorec R. 2013. Diffusion of D-glucose measured in the cytosol of a single astrocyte. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70: 1483-1492
- Kreft M, Stenovec M, Rupnik M, Grilc S, Krzan M, Potokar M, Pangrsic T, Haydon PG, Zorec R. 2004. Properties of Ca(2+)-dependent exocytosis in cultured astrocytes. *Glia*, 46: 437-445
- Kum W, Zhu SQ, Ho SK, Young JD, Cockram CS. 1992. Effect of insulin on glucose and glycogen metabolism and leucine incorporation into protein in cultured mouse astrocytes. *Glia*, 6: 264-268
- Kume H, Hall IP, Washabau RJ, Takagi K, Kotlikoff MI. 1994. Beta-adrenergic agonists regulate KCa channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of clinical investigation*, 93: 371-379
- Laron Z. 2009. Insulin and the brain. *Archives of physiology and biochemistry*, 115: 112-6
- Laskey AD, Roth BJ, Simpson PB, Russell JT. 1998. Images of Ca<sup>2+</sup> flux in astrocytes: evidence for spatially distinct sites of Ca<sup>2+</sup> release and uptake. *Cell calcium*, 23: 423-432
- Lauritzen KH, Morland C, Puchades M, Holm-Hansen S, Hagelin EM, Lauritzen F, Attramadal H, Storm-Mathisen J, Gjedde A, Bergersen LH. 2014. Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Nature*, 24: 2784-2795
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, 487: 443-448

- Leino RL, Gerhart DZ, van Bueren AM, McCall AL, Drewes LR. 1997. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *Journal of neuroscience research*, 49: 617-626
- Lizcano JM, Alessi DR. 2002. The insulin signalling pathway. *Current biology*, 12: R236-R238
- Magistretti PJ. 1988. Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system. *Diabete & metabolisme*, 14: 237-246
- Magistretti PJ. 2006. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *The Journal of experimental biology*, 209: 2304-2311
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. 1999. Energy on demand. 283: 496-497
- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. 1994. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8: 1003-1011
- Mangia S, Simpson IA, Vannucci SJ, Carruthers A. 2009. The in vivo neuron-to-astrocyte lactate shuttle in human brain: evidence from modeling of measured lactate levels during visual stimulation. *Journal of neurochemistry*, 109 Suppl 1: 55-62
- Manolescu AR, Witkowska K, Kinnaird A, Cessford T, Cheeseman C. 2007. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. 22: 234-240
- Marrif H, Juurlink BH. 1999. Astrocytes respond to hypoxia by increasing glycolytic capacity. *Journal of neuroscience research*, 57: 255-260
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. 1977. Glutamine synthetase: glial localization in brain. 195: 1356-1358
- McEwen BS, Magarinos AM, Reagan LP. 2002. Studies of hormone action in the hippocampal formation: possible relevance to depression and diabetes. *Journal of psychosomatic research*, 53: 883-890
- Morgello S, Uson RR, Schwartz EJ, Haber RS. 1995. The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia*, 14: 43-54
- Moule SK, Denton RM. 1997. Multiple signaling pathways involved in the metabolic effects of insulin. *The American journal of cardiology*, 80: 41A-49A
- Mueckler M. 2001. Insulin resistance and the disruption of Glut4 trafficking in skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*, 107: 1211-1213
- Muller MS, Obel LF, Waagepetersen HS, Schousboe A, Bak LK. 2013. Complex actions of ionomycin in cultured cerebellar astrocytes affecting both calcium-induced calcium release and store-operated calcium entry. *Neurochemical research*, 38: 1260-1265
- Mutalik VK, Venkatesh KV. 2005. Quantification of the glycogen cascade system: the ultrasensitive responses of liver glycogen synthase and muscle phosphorylase are due to distinctive regulatory designs. *Theoretical biology & medical modelling*, 2: 19
- Muyderman H, Angehagen M, Sandberg M, Bjorklund U, Olsson T, Hansson E, Nilsson M. 2001. Alpha 1-adrenergic modulation of metabotropic glutamate receptor-induced calcium oscillations and glutamate release in astrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 276: 46504-46514

- Nakanishi S, Catt KJ, Balla T. 1995. A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 5317-5321
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences*, 26: 523-530
- Nestler E, SE. H, RC. M. 2001. *Molecular Neuropharmacology, a foundation for clinical neuroscience*. New York, McGraw-Hill: 516 str.
- Newman LA, Korol DL, Gold PE. 2011. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PloS one*, 6: e28427, 11 str.
- Ngarmukos C, Baur EL, Kumagai AK. 2001. Co-localization of GLUT1 and GLUT4 in the blood-brain barrier of the rat ventromedial hypothalamus. *Brain research*, 900: 1-8
- Niitsu Y, Hori O, Yamaguchi A, Bando Y, Ozawa K, Tamatani M, Ogawa S, Tohyama M. 1999. Exposure of cultured primary rat astrocytes to hypoxia results in intracellular glucose depletion and induction of glycolytic enzymes. *Brain research. Molecular brain research*, 74: 26-34
- Nijland PG, Michailidou I, Witte ME, Mizee MR, van der Pol SM, van Het Hof B, Reijerkerk A, Pellerin L, van der Valk P, de Vries HE, van Horssen J. 2014. Cellular distribution of glucose and monocarboxylate transporters in human brain white matter and multiple sclerosis lesions. *Glia*, 62: 1125-1141
- Northam WJ, Bedoy CA, Mobley PL. 1989. Pharmacological identification of the alpha-adrenergic receptor type which inhibits the beta-adrenergic activated adenylate cyclase system in cultured astrocytes. *Glia*, 2: 129-133
- Ocrant I, Valentino KL, Eng LF, Hintz RL, Wilson DM, Rosenfeld RG. 1988. Structural and immunohistochemical characterization of insulin-like growth factor I and II receptors in the murine central nervous system. *Endocrinology*, 123: 1023-1034
- Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, Yoshida A, Takeuchi M, Marth JD. 2005. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell*, 123: 1307-1321
- Parpura V, Haydon PG. 2009. *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System*. New York, Springer Science+Business Media: 700 str.
- Parpura V, Zorec R. 2010. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain research reviews*, 63: 83-92
- Pellegrini G, Rossier C, Magistretti PJ, Martin JL. 1996. Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase. *Brain research. Molecular brain research*, 38: 191-199
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*, 55: 1251-1262
- Pellerin L, Magistretti PJ. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 10625-10629
- Pellerin L, Magistretti PJ. 2004. *Neuroscience. Let there be (NADH) light*. 305: 50-52
- Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ. 1998. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Developmental neuroscience*, 20: 291-299

- Pellerin L, Stolz M, Sorg O, Martin JL, Deschepper CF, Magistretti PJ. 1997. Regulation of energy metabolism by neurotransmitters in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line. *Glia*, 21: 74-83
- Perez DM, DeYoung MB, Graham RM. 1993. Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Molecular pharmacology*, 44: 784-795
- Pfeiffer-Guglielmi B, Fleckenstein B, Jung G, Hamprecht B. 2003. Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *Journal of neurochemistry*, 85: 73-81
- Pfeiffer B, Elmer K, Roggendorf W, Reinhart PH, Hamprecht B. 1990. Immunohistochemical demonstration of glycogen phosphorylase in rat brain slices. *Histochemistry*, 94: 73-80
- Pfrieger FW, Barres BA. 1997. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. 277: 1684-1687
- Perdan Pirkmajer K, Lipnik Štangelj M, Kržan M. 2009. Impact of Astrocytes in the Clearance of Neurotransmitters by Uptake and Inactivation. Amsterdam, Elsevier: Academic Press: 211-235
- Prebil M. 2011. Dinamika koncentracije glukoze v izoliranem podganjem astrocitu: Ljubljana, doktorsko delo
- Prebil M, Vardjan N, Jensen J, Zorec R, Kreft M. 2011. Dynamic monitoring of cytosolic glucose in single astrocytes. *Glia*, 59: 903-913
- Ransom BR, Fern R. 1997. Does astrocytic glycogen benefit axon function and survival in CNS white matter during glucose deprivation? *Glia*, 21: 134-141
- Rayner DV, Thomas ME, Trayhurn P. 1994. Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 72: 476-479
- Reagan LP. 2007. Insulin signaling effects on memory and mood. *Current opinion in pharmacology*, 7: 633-637
- Rodin J, Wack J, Ferrannini E, DeFronzo RA. 1985. Effect of insulin and glucose on feeding behavior. *Metabolism: clinical and experimental*, 34: 826-831
- Rosenberg PA, Dichter MA. 1985. Glycogen accumulation in rat cerebral cortex in dissociated cell culture. *Journal of neuroscience methods*, 15: 101-112
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-806
- San Martin A, Ceballo S, Ruminot I, Lerchundi R, Frommer WB, Barros LF. 2013. A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. *PloS one*, 8: e57712, 11 str.
- Scemes E, Giaume C. 2006. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*, 54: 716-725
- Schousboe A, Westergaard N, Waagepetersen HS, Larsson OM, Bakken IJ, Sonnewald U. 1997. Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia*, 21: 99-105
- Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF. 2003. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23: 7084-92

- Schwartz J, Wilson D. 1992. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia*, 5: 75-80
- Schwartz MW, Sipols A, Kahn SE, Lattemann DF, Taborsky GJ, Jr., Bergman RN, Woods SC, Porte D, Jr. 1990. Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *The American journal of physiology*, 259: 378-383
- Sekar RB, Periasamy A. 2003. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of cell biology*, 160: 629-33
- Shulman RG, Hyder F, Rothman DL. 2001. Cerebral energetics and the glycogen shunt: neurochemical basis of functional imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 6417-6422
- Siegel G, Albers R, Brady S, Price D. 2006. *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Oxford, Elsevier Academic Press: 1116 str.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119: 7-35
- Somjen GG. 1988. Nervenkit: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia*, 1: 2-9
- Sotelo-Hitschfeld T, Fernandez-Moncada I, Barros LF. 2012. Acute feedback control of astrocytic glycolysis by lactate. *Glia*, 60: 674-680
- Souza DG, Bellaver B, Souza DO, Quincozes-Santos A. 2013. Characterization of adult rat astrocyte cultures. *PloS one*, 8: e60282, 10 str.
- Steffens AB, Scheurink AJ, Porte D, Jr., Woods SC. 1988. Penetration of peripheral glucose and insulin into cerebrospinal fluid in rats. *The American journal of physiology*, 255: R200-R204
- Stobart JL, Anderson CM. 2013. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7: 38
- Stone EA, Ariano MA. 1989. Are glial cells targets of the central noradrenergic system? A review of the evidence. *Brain research. Brain research reviews*, 14: 297-309
- Subbarao KV, Hertz L. 1990. Effect of adrenergic agonists on glycogenolysis in primary cultures of astrocytes. *Brain research*, 536: 220-226
- Subbarao KV, Hertz L. 1991. Stimulation of energy metabolism by alpha-adrenergic agonists in primary cultures of astrocytes. *Journal of neuroscience research*, 28: 399-405
- Suh SW, Bergher JP, Anderson CM, Treadway JL, Fosgerau K, Swanson RA. 2007a. Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R\*,S\*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 321: 45-50
- Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA. 2007b. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *The Journal of clinical investigation*, 117: 910-918
- Sutin J, Shao Y. 1992. Resting and reactive astrocytes express adrenergic receptors in the adult rat brain. *Brain research bulletin*, 29: 277-284
- Swanson RA. 1992. Physiologic coupling of glial glycogen metabolism to neuronal activity in brain. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 70 Suppl: S138-S144
- Swanson RA, Choi DW. 1993. Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* :

- official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 13: 162-169
- Takahashi M, Yamada T, Tooyama I, Moroo I, Kimura H, Yamamoto T, Okada H. 1996. Insulin receptor mRNA in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 204: 201-204
- Takanaga H, Chaudhuri B, Frommer WB. 2008. GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *Biochimica et biophysica acta*, 1778: 1091-1099
- Tsacopoulos M, Evequoz-Mercier V, Perrottet P, Buchner E. 1988. Honeybee retinal glial cells transform glucose and supply the neurons with metabolic substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 8727-8731
- Vardjan N, Kreft M, Zorec R. 2014. Dynamics of beta-adrenergic/cAMP signaling and morphological changes in cultured astrocytes. *Glia*, 62: 566-579
- Vega C, R. Sachleben L J, Gozal D, Gozal E. 2006. Differential metabolic adaptation to acute and long-term hypoxia in rat primary cortical astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 97: 872-883
- Verkhratsky A, Morgan Butt A. 2007. *Glial Neurobiology*. Chichester, Wiley-Interscience: 230 str.
- Vesce S, Bezzi P, Volterra A. 1999. The active role of astrocytes in synaptic transmission. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 56: 991-1000
- Vesce S, Bezzi P, Volterra A. 1999. The highly integrated dialogue between neurons and astrocytes in brain function. *Science progress*, 82: 251-270
- Walls AB, Heimburger CM, Bouman SD, Schousboe A, Waagepetersen HS. 2009. Robust glycogen shunt activity in astrocytes: Effects of glutamatergic and adrenergic agents. *Neuroscience*, 158: 284-292
- Wallukat G. 2002. The beta-adrenergic receptors. *Herz*, 27: 683-690
- Walz W, Mukerji S. 1988. Lactate release from cultured astrocytes and neurons: a comparison. *Glia*, 1: 366-370
- Wang DD, Bordey A. 2008. The astrocyte odyssey. *Progress in neurobiology*, 86: 342-367
- Weindl A, Sofroniew MV. 1981. Relation of neuropeptides to mammalian circumventricular organs. *Advances in biochemical psychopharmacology*, 28: 303-320
- Wender R, Brown AM, Fern R, Swanson RA, Farrell K, Ransom BR. 2000. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20: 6804-6810
- Werner H, Weinstein D, Bentov I. 2008. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways. *Archives of physiology and biochemistry*, 114: 17-22
- Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R. 1997. Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia*, 21: 22-34
- Wilson JE. 1995. Hexokinases. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 126: 65-198
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr. 1979. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*, 282: 503-505

- Woods SC, Seeley RJ, Baskin DG, Schwartz MW. 2003. Insulin and the blood-brain barrier. *Current pharmaceutical design*, 9: 795-800
- Wyss MT, Jolivet R, Buck A, Magistretti PJ, Weber B. 2011. In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31: 7477-7485
- Zhao FQ, Keating AF. 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current genomics*, 8: 113-128
- Zhu SQ, Kum W, Ho SK, Young JD, Cockram CS. 1990. Structure-function relationships of insulin receptor interactions in cultured mouse astrocytes. *Brain research*, 529: 329-332
- Zwingmann C, Leibfritz D. 2003. Regulation of glial metabolism studied by <sup>13</sup>C-NMR. *NMR in biomedicine*, 16: 370-399





## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Marku Kreftu in akad. prof. dr. Robertu Zorcu, za vse strokovne nasvete in pomoč pri raziskovalnem delu in izdelavi doktorske disertacije.

Nadalje se zahvaljujem sodelavcem za uvajanje v eksperimentalno delo ter pomoč pri izvajanju laboratorijskih poskusov. Hvala jim za vso potrpežljivost in prilagodljivost.

Hvala tudi staršem, bratu Andreju, Neji in prijateljem, ki so mi stali ob strani in polepšali čas, takrat ko sem to najbolj potreboval.