

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Viktorija RADOTIĆ

**TEMPERATURNNA ODVISNOST METABOLIZMA
GLUKOZE V PODGANJIH ASTROCITIH**

MAGISTRSKO DELO

(Magistrski študij – 2. stopnja)

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Viktorija RADOTIĆ

**TEMPERATURN A ODVISNOST METABOLIZMA GLUKOZE V
PODGANJIH ASTROCITIH**

MAGISTRSKO DELO

(Magistrski študij – 2. stopnja)

**THE TEMPERATURE DEPENDENCE OF GLUCOSE METABOLISM
IN RAT ASTROCYTES**

M. SC. THESIS

(Master Study Programmes)

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju Celica d.o.o., Tehnološki park 24, Ljubljana ter na Inštitutu za patološko fiziologijo, Zaloška 4, Ljubljana, v Laboratoriju za nevroendokrinologijo-molekularno celično fiziologijo.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje in Senat oddelka sta za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Marka Krefta, za somentorja pa akad. prof. dr. Roberta Zorca ter za recenzentko prof. dr. Jasno Štrus.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Kristina SEPČIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: akad. prof. dr. Robert ZOREC

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Članica: prof. dr. Jasna ŠTRUS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 11.11.2014

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Viktorija Radotić

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)

- ŠD Du2
- DK UDK 612 (043.2) = 163.6
- KG metabolizem/astrociti/glukoza/temperatura/noradrenalin/FRET
- AV RADOTIĆ, Viktorija, diplomirana biologinja
- SA KREFT, Marko (mentor)/ZOREC, Robert (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2014
- IN TEMPERATURNA ODVISNOST METABOLIZMA GLUKOZE V PODGANJIH ASTROCITIH
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij-2. stopnja)
- OP X, 48 str., 10 sl., 56 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Glavni energijski substrat možganov je glukoza. Astrociti so najbolj pogoste celice glije centralnega živčnega sistema, ki pomembno sodelujejo pri presnovi glukoze. Znotrajcelična oziroma citosolna koncentracija glukoze v astrocitih je posledica ravnovesja med prenosom glukoze preko membrane in presnovo glukoze. S fluorescenčnimi tehnikami kot je tehnika FRET (angl. »fluorescence resonance energy transfer«-prenos energije z resonanco fluorescence, mikroskopska tehnika s katero se meri znotrajcelično koncentracijo glukoze) je možno natančno določiti znotrajcelično koncentracijo glukoze v astrocitih. Pri našem delu smo uporabili glukozni nanosenzor FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 za merjenje sprememb citosolne koncentracije glukoze, ki smo ga v astrocite vnesli s pomočjo lipofekcije. Namen našega dela je bil izmeriti razmerje intenzitet dveh fluorescenčnih proteinov (YFP/CFP) po dodatku raztopin z različnimi koncentracijami zunajcelične glukoze in s tem ugotoviti, kako se znotrajcelična koncentracija glukoze pri temperaturi 37 °C odziva na spremembe v zunajcelični koncentraciji glukoze. Namen je bil tudi ugotoviti vpliv temperature na od noradrenalina odvisne spremembe v znotrajcelični koncentraciji glukoze. Ugotovili smo, da pri višji temperaturi znotrajcelična koncentracija glukoze doseže nižje stacionarne koncentracije, kar je verjetno posledica pospešene presnove glukoze. Pri 37 °C noradrenalin sproži glikogenolizo, ki je hitrejša kot pri 24 °C, zato nastane več znotrajcelične glukoze, ki pa se pri višji temperaturi tudi hitreje porablja.

Key words documentation (KWD)

- DN Du2
- DC UDK 612 (043.2) = 163.6
- CX metabolism/astrocytes/glucose/temperature/noradrenaline/FRET
- AU RADOTIĆ, Viktorija, graduate biologist
- AA KREFT, Marko (supervisor)/ZOREC, Robert (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of biology
- PY 2014
- TI THE TEMPERATURE DEPENDENCE OF GLUCOSE METABOLISM IN RAT ASTROCYTES
- DT M. SC. Thesis (Master study programmes)
- NO X, 48 p., 10 fig., 56 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The main energy substrate of the brain is glucose. Astrocytes are the most abundant glial cells in the central nervous system, which are significantly involved in the metabolism of glucose. Intracellular or cytosolic concentration of glucose in astrocytes is dependent on a balance between the influx of glucose across the plasmalema and glucose metabolism. With fluorescent technique FRET (fluorescence resonance energy transfer, microscopy technique which measures intracellular concentration of glucose) it is possible to accurately determine the intracellular concentration of glucose in astrocytes. In our work we used the glucose nanosensor FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 for measuring changes in cytosolic glucose concentration, which was introduced into astrocytes by lipofection. The aim of our work was to measure the ratio of two fluorescent proteins (YFP/CFP) in order to determine intracellular concentration of glucose after the addition of the solutions with increasing concentrations of extracellular glucose. Our aim was also to determine the temperature dependency of intracellular concentration of glucose and the effect of noradrenaline stimulation. We conclude that the ratio YFP/CFP increases with increasing concentration of extracellular glucose. We have found that at higher temperatures, glucose concentration increase was lower, which is probably due to a faster consumption of glucose in glycolysis. At the temperature of 37 °C noradrenaline stimulates glycogenolysis, which is faster than at 24 °C and therefore enables prominent rise in intracellular glucose, followed by glucose concentration decay due to glucose consumption in metabolic pathways.

KAZALO

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
KAZALO	V
KAZALO SLIK	VIII
SLOVARČEK	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ASTROCITI.....	3
2.1.1 Vloge astrocitov	3
2.2 METABOLIZEM MOŽGANOV	4
2.2.1 Centralni model metabolizma možganov	4
2.2.2 Glukozno-laktatna pot v možganih	5
2.2.3 Model multiplih kompartmentov energijskega metabolizma možganov	5
2.2.4 Metabolizem glukoze v možganih	5
2.2.4.1 Glikoliza.....	7
2.2.4.2 Pentoza-fosfatna pot.....	7
2.2.4.3 Glikogeneza.....	7
2.3 METABOLIZEM ASTROCITOV	7
2.3.1 Metabolizem glukoze v astrocitih	7
2.3.2 Metabolizem glikogena v astrocitih	8
2.3.3 Vpliv nevrotitrmiterja noradrenalina na metabolizem glukoze v astrocitih	9
2.3.4 Glukoneogeneza v astrocitih	10
2.4 FRET (ang. »fluorescence resonance energy transfer«)-prenos energije z resonanco fluorescence.....	10
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 MATERIAL	12

3.1.1	Uporabljene kemikalije	12
3.1.2	Laboratorijska oprema	13
3.1.3	Droben laboratorijski material in ostale potrebščine	13
3.1.4	Priprava bakterijskih plazmidov	13
3.1.5	Mediji	14
3.1.6	Raztopine	14
3.1.7	Druge kemikalije	14
3.1.8	Celični material	15
3.2	METODE	16
3.2.1	Razmere dela	16
3.2.2	Priprava medijev	16
3.2.3	Priprava raztopin	16
3.2.4	Izolacija pDNA	16
3.2.5	Priprava krovnikov	17
3.2.6	Priprava celičnega materiala	17
3.2.7	Celice v poskusu	19
3.2.7.1	Fluorescentna mikroskopija.....	19
3.2.7.2	Meritve z različnimi koncentracijami glukoze.....	19
3.2.7.3	Stimulacija z β -escinom.....	23
3.2.7.4	Meritve pri temperaturi 37 °C.....	23
3.2.7.5	Stimulacija z noradrenalinom.....	23
3.2.8	Analiza in statistično ovrednotenje podatkov	23
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	24
4.1	REZULTATI MERITEV SPREMEMBE CITOSOLNE KONCENTRACIJE GLUKOZE V ASTROCITIH Z IZRAŽENIM NANOSENZORJEM FLII12PGLU- 700 $\mu\Delta$ 6.....	24
4.2	CITOSOLNA KONCENTRACIJA GLUKOZE V ASTROCITU V ODVISNOSTI OD ZUNAJCELIČNE KONCENTRACIJE GLUKOZE.....	27
4.3	VPLIV TEMPERATURE NA HITROST PRESNOVE IN ZNOTRAJCELIČNO KONCENTRACIJO GLUKOZE V ASTROCITU.....	30
4.4	VPLIV NORADRENALINA NA RAVEN CITOSOLNE GLUKOZE V ASTROCITU PRI TEMPERATURI 24 °C IN 37 °C.....	33
5	RAZPRAVA	36

5.1	CITOSOLNA KONCENTRACIJA GLUKOZE V ASTROCITIH JE ODVISNA OD ZUNAJCELIČNE KONCENTRACIJE GLUKOZE	36
5.2	TEMPERATURA VPLIVA NA KINETIKO PRIVZEMA GLUKOZE TER NA KOLIČINO ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE GLUKOZE.....	38
5.3	NORADRENALIN VPLIVA NA KONCENTRACIJO GLUKOZE V CITOSOLU PRI TEMPERATURI 24 °C IN 37 °C	39
6	SKLEPI	41
7	POVZETEK	42
8	VIRI	44

ZAHVALA

KAZALO SLIK

Sl. 1: Metabolizem glukoze v možganih.....	6
Sl. 2: Metabolizem glukoze in glikogena v astrocitih.....	9
Sl. 3: Mehanizem FRET.....	11
Sl. 4: Superfuzijski sistem.....	20
Sl. 5: Sprememba dovodnega kanala superfuzije ne povzroča sprememb v razmerju FRET	22
Sl. 6: Spremembe razmerja FRET v celicah z izraženim glukoznim nanosenzorjem FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 v posameznem astrocitu	24
Sl. 7: Vpliv povišane zunajcelične koncentracije glukoze na meritev emisije YFP (angl. »yellow fluorescent protein«-rumeni fluorescenčni protein) in CFP (angl. »cyan fluorescent protein«-modrozeleni fluorescenčni protein) v astrocitu z izraženim glukoznim nanosenzorjem FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6.....	25
Sl. 8: Citosolna koncentracija glukoze v astrocitu z izraženim FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 v odvisnosti od zunajcelične koncentracije glukoze	28
Sl. 9: Citosolna koncentracija glukoze v odvisnosti od zunajcelične koncentracije glukoze pri 24 °C in 37 °C	31
Sl. 10: Vpliv noradrenalina na citosolno koncentracijo glukoze v astrocitih z izraženim FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 pri temperaturi 24 °C in 37 °C.....	34

SLOVARČEK

ANLS	glukozno-laktatna pot iz astrocitov v nevrone (<i>angl.</i> »Astrocyte-neuron-lactate shuttle«)
ATP	adenozin-5'-trifosfat, glavna energijska molekula (<i>angl.</i> »adenosin tri phosphate«)
cAMP	ciklični AMP
CaCl ₂	kalcijev klorid
CCD	<i>angl.</i> : »charge coupled device«; integrirano vezje, svetlobni detektor kamer
CFP	modro-zeleni fluorescentni protein (<i>angl.</i> »cyan fluorescent protein«)
CO ₂	ogljikov dioksid
CŽS	centralni živčni sistem
DMEM	medij za gojenje astrocitov (<i>angl.</i> »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«)
FBS	fetusni serum goveda (<i>angl.</i> »fetal bovine serum«)
FLH12PGLU-700μΔ6	glukozni nanosenzor
FRET	prenos energije z resonanco fluorescence (<i>angl.</i> »fluorescence resonance energy transfer«)
[glc] _e	zunajcelična koncentracija glukoze
[glc] _i	znotrajcelična koncentracija glukoze
GLUT	glukozni prenašalci, molekule, ki prenašajo glukozo (<i>angl.</i> »glucose transporters«)
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HEPES	N-2-hidroksietilpiperazin-N-2-etansulfonska kislina
K _d	konstanta disociacije
KCl	kalijev klorid
LDH	encim laktatna dehidrogenaza, pretvarja piruvat v laktat
MCT	monokarboksilatni prenašalci, prenašalci, ki prenašajo laktat (<i>angl.</i> »monokarboksilate transporters«)
MgCl ₂	magnezijev klorid

NA	noradrenalin (angl. »noradrenaline, norepinephrine«)
NaCl	natrijev klorid
NADH	β -nikotinamid adenin dinukleotid (reducirana oblika)
NADPH	adenin dinukleotid fosfat
NaHCO ₃	natrijev bikarbonat
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	natrijev dihidrogen fosfat monohidrat
NaOH	natrijev hidroksid
PLL	poli-L-lizin (angl. »poly-L-lysine«)
ROI	območje na sliki, ki ga analiziramo (angl. »Region of Interest«)
ΔR	sprememba razmerja YFP/CFP
ΔR_{max}	maksimalna sprememba razmerja YFP/CFP
S	normalizirana sprememba razmerij (ΔR), delež saturacije
TCA	cikel trikarboksilne kisline ali Krebsov cikel
YFP	rumeni fluorescentni protein (angl. »yellow fluorescent protein«)

1 UVOD

Možgani so predvsem zelo dinamičen in energijsko potraten organ. Centralni živčni sistem (CŽS) sestoji iz nevronov in celic glije, ki obdajajo nevrone. Med celice glije se uvrščajo astrociti, oligodendrociti in mikroglia.

Astrociti so celice zvezdaste oblike, ki imajo številne izrastke. Številne raziskave so pokazale, da imajo zaradi svoje lege v CŽS pomembno vlogo pri energijskem metabolizmu možganov. Ležijo namreč med krvnimi kapilarami in terminalnimi končiči nevronov (Prebil in sod., 2011), zato imajo pomembno vlogo pri dovajanju hranil živčnim celicam ter odstranjevanju izrabljenih metabolitov (Kreft in sod., 2012). Poleg tega so odkrili tudi, da se odzovejo na aktivnost živčnih celic ter izločajo prenašalce, ki vplivajo na sinaptični prenos informacij (Kreft in sod., 2012).

Kljub temu, da številne raziskave kažejo, da velike količine energije v možganih proizvedejo tudi metabolni substrati kot so laktat, glutamat in glikogen (Prebil in sod., 2011; Brown in sod., 2001; Dienel in Cruz, 2006) pa je glukoza glavni substrat energijskega metabolizma možganov (Prebil in sod., 2011; Clarke in Sokoloff, 1999).

Z naprednimi fluorescenčnimi sondami je mogoče meriti znotrajcelično koncentracijo glukoze, ki je odvisna od vnosa glukoze skozi prenašalce na plazmalemi in od fosforilacije. FRET-prenos energije z resonanco fluorescence (angl. »fluorescence resonance energy transfer«) je tehnika, ki s pomočjo nanosenzorjev meri spremembe v koncentraciji citosolne glukoze v astrocitih. Kot nanosenzor glukoze se največkrat uporablja FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 (Kreft in sod., 2012). Za ugotavljanje citosolne koncentracije glukoze se vzbudi fluorescenco CFP (angl. »cyan fluorescent protein«)-modrozeleni fluorescenčni protein, meri pa se fluorescenco CFP in YFP (angl. »yellow fluorescent protein«)-rumeni fluorescenčni protein (Kreft in sod., 2012). Spremembe v razmerju YFP/CFP kaže na spremembe citosolne koncentracije glukoze.

Meritve citosolne koncentracije glukoze v astrocitih so pokazale, da je le ta odvisna od zunajcelične koncentracije glukoze (Prebil in sod., 2011). Višja kot je bila koncentracija zunajcelične glukoze, višja je bila koncentracija citosolne glukoze. Od zunajcelične koncentracije glukoze pa je bila odvisna tudi hitrost sprememb koncentracije v celici (Prebil, 2011). Koncentracija citosolne glukoze je odvisna tudi od neurotransmiterjev, katerih receptorji so na plazemski membrani astrocitov ter uravnavajo metabolizem. Noradrenalin poveča citosolno koncentracijo glukoze, kar je posledica aktivacije α - in β -adrenergičnih receptorjev, ki povzročijo razgradnjo glikogena-glikogenolizo v astrocitih (Prebil, 2011) ter tako sprostitev glukoze, ki je vezana v glikogenu.

Predvidevamo, da na metabolizem glukoze vpliva tudi temperatura, več raziskav pa je bilo izvedenih na celicah pri sobni temperaturi (22-25 °C). John in sod. (2008) so za primerjavo rezultatov izvedli poskuse s celično kulturo C2C12 tudi pri temperaturi 35 °C. Ugotovili so, da se koncentracija citosolne glukoze pri višji temperaturi poveča, medtem ko stopnja privzema in hitrost porabe glukoze ostaneta nespremenjena (John in sod., 2008).

To kaže, da porast glukoze ni povezan z večanjem privzema glukoze ali povečanjem hitrosti porabe glukoze, ampak je lahko posledica vzbujene glukoneogeneze ter utišane glikolize (John in sod., 2008).

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bil:

- Z uporabo FRET FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 glukoznega nanosenzorja izmeriti razmerje fluorescenc YFP/CFP, medtem ko bodo astrociti izpostavljeni naraščajočim zunajceličnim koncentracijam glukoze.
- Ugotoviti, kako se citosolna koncentracija glukoze pri astrocitih pri temperaturi 37 °C odziva na spremembe v zunajcelični koncentraciji glukoze ter rezultate primerjati z rezultati dobljenimi pri sobni temperaturi (22-25 °C).
- Ugotoviti kako je koncentracija citosolne glukoze pri temperaturi 37 °C odvisna od stimulacije celic z noradrenalinom ter rezultate primerjati z rezultati meritev pri sobni temperaturi (22-25 °C).

1.2 HIPOTEZE

1. Umeritveno krivuljo fluorescence glukoznega nanosenzorja FRET FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 lahko uporabimo za preračun koncentracije glukoze iz razmerja fluorescenc YFP/CFP.
2. Pri višji temperaturi (37 °C) se bo po dodatku raztopine z visoko zunajcelično koncentracijo glukoze, koncentracija glukoze v citosolu spreminjala z drugačno dinamiko kot pri nižji temperaturi (22-25 °C).
3. Stimulacija astrocitov z noradrenalinom pri temperaturi 37° C povzroči hitrejšo spremembo znotrajcelične koncentracije glukoze, kot stimulacija pri sobni temperaturi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ASTROCITI

Astrociti so celice glije centralnega živčnega sistema, ki so v nekaterih področjih v možganih številčnejši kot nevroni. So podporne celice, ki se povezujejo z različnimi možganskimi elementi, kot so krvne žile, Ranvierjevi zažetki, celična telesa nevronov ter sinapse (Bouzier-Sore in sod., 2002). Zapolnjujejo prazen prostor med temi elementi ter jih povezujejo med seboj, zato so jih poimenovali nevroglia, kar tolmačijo kot »možgansko lepilo« (Bouzier-Sore in sod., 2002), ustrežnejše tolmačenje pa bi bilo »možgansko polnilo«. So v vseh regijah možganov, glede na morfologijo in funkcijo se delijo na številne podtipе (Brown in Ransom, 2007). V belini in sivini so prisotni fibrozni in protoplazemski astrociti, oboji vsebujejo glikogen (Brown in Ransom, 2007; Kong in sod., 2002; Wender in sod., 2000). Glede na funkcijo obstajajo »klasični« astrociti, ki izražajo visoko koncentracijo glutamatnih prenašalcev in presledkovnih stikov ter astrociti, ki nimajo teh lastnosti (Brown in Ransom, 2007; Huang in Bergles, 2004; Matthias in sod., 2003).

2.1.1 Vloge astrocitov

V centralnem živčnem sistemu imajo astrociti pomembno vlogo v procesih, kot so homeostaza glutamata, ionov in vode, obramba pred oksidativnim stresom, skladiščenje glikogena, tvorba brazgotin, obnova tkiv, prilagajanje sinaptične aktivnosti preko sproščanja gliatransmiterjev ter tvorba in preoblikovanje sinaps (Volterra in Meldolesi, 2005; Belanger in Magistretti, 2009; Belanger in sod., 2011). Dolgo časa so bili astrociti znani kot »možgansko lepilo«, ki možgane oskrbujejo s snovmi potrebnimi za nevrone (Volterra in Meldolesi, 2005). Šele pred nekaj leti so ugotovili, da astrociti uravnavajo tvorbo sinaps in njihovo funkcijo, nevrogenezo ter možganski žilni tonus (Volterra in Meldolesi, 2005). Mnoge raziskave kažejo, da so astrociti pomembni pri vzdrževanju ravnovesja ionov in mikro-homeostaze centralnega živčnega sistema, predvsem koncentracije kalija in uravnavanju pH (Peuchen in sod., 1996). Astrociti izražajo receptorje za neurotransmiterje, kar omogoča komunikacijo med astrociti in nevroni, zato astrociti delujejo tudi na aktivnost nevronov (Peuchen in sod., 1996). Poleg nevronov se astrociti povezujejo tudi s celicami endotelija žil, zato so pomembni pri prenosu hranil in energijskem metabolizmu v centralnem živčnem sistemu (Peuchen in sod., 1996). So del pregrade med popolnoma razvitim centralnim živčnim sistemom in sistemskim pretokom, zato so pomembni pri uravnavanju vstopa metabolnih substratov, metabolitov, toksinov in virusov v centralni živčni sistem (Peuchen in sod., 1996).

Astrociti pomembno sodelujejo pri metabolizmu nevronov in so pomembna komponenta tako imenovane »tripartitne sinapse«, ki vključuje tako presinaptične kot postsinaptične procese v nevronih (Levin in sod., 2011).

Astrociti sprejmejo glutamat, ki ga sprostijo nevroni in ga uporabijo za lastni celični metabolizem, nastali glutamin pa ponovno uporabijo za metabolizem nevronov (Levin in sod., 2011). Sprejemajo tudi glukozo, jo presnovijo in sprostijo v obliki laktata, ali pa jo shranijo v obliki glikogena (Levin in sod., 2011). Nevroni lahko sprejmejo laktat preko monokarboksilatnih transporterjev in ga pretvorijo v piruvat, ki je potreben za oksidativen nastanek ATP (Levin in sod., 2011). Laktat je udeležen v večini regulatornih poti, ki zaznavajo glukozo, zato lahko sprememba produkcije laktata v astrocitih zaradi prenašalcev kot so noradrenalin, dopamin, serotonin, glutamat izniči učinek glukoze v nevronih (Levin in sod., 2011). Najbolj pomembna funkcija nastanka laktata iz glikogena v astrocitih je energijska rezerva za podporo nevronom med hipoglikemijo (Levin in sod., 2011). V astrocitih poteka tudi večina oksidacije maščobnih kislin v možganih (Levin in sod., 2011). Astrociti producirajo tudi ketonska telesa, ki jih monokarboksilatni prenašalci vnesejo v nevrone, kjer služijo kot nadomestni vir energije nevronov (Levin in sod., 2011).

2.2 METABOLIZEM MOŽGANOV

Možgani so večinoma oksidativni organ, ki potrebuje stalno oskrbo s hranili in velike količine zaloga energije (Occhipinti in sod., 2009). Čeprav predstavljajo možgani le 2 % celotne telesne mase človeka, je 20 % O_2 in 25 % glukoze, ki nastane v človeškem telesu namenjeno delovanju možganov (Belanger in sod., 2011). Največ energije potrebujejo možgani za obnovo in vzdrževanje ionskega gradienta, ki se porablja za signalne procese, kot so postsinaptični in akcijski potenciali, kot tudi prevzem in ponovna uporaba nevrottransmitterjev (Attwell in Laughlin, 2001; Alle in sod., 2009; Belanger in sod., 2011).

2.2.1 Centralni model metabolizma možganov

Ta model predvideva, da je glukozo glavni energijski substrat odraslih možganov (Belanger in sod., 2011). Pod določenimi pogoji so možgani sposobni uporabiti tudi druge energijske substrate, ki se prenesejo po krvi, kot so ketonska telesa med razvojem in stradanjem (Nehlig, 2004, Magistretti, 2008, Belanger in sod., 2011) ali pa laktat med obdobjem intenzivne fizične aktivnosti (Van Hall in sod., 2009, Belanger in sod., 2011). Glukoza v možganih se oksidira do CO_2 in H_2O (Clarke in Sokoloff, 1999; Belanger in sod., 2011). Dokazali pa so, da zaradi različnih metabolnih poti, po katerih se glukozo presnavlja, vsaka posamezna celica ne oksidira glukoze do CO_2 in H_2O . Se pa metabolni intermediati, kot so laktat, piruvat, glutamat in acetat, ki nastanejo iz glukoze, oksidirajo za energijsko produkcijo (Zielke in sod., 2009, Belanger in sod., 2011).

2.2.2 Glukozno-laktatna pot v možganih

Poleg glukoze je glavni energijski substrat možganov tudi laktat, ki sodeluje predvsem pri aktivaciji glutamatergičnih nevronov (Occhipinti in sod., 2009). Tako je bil predlagan glukozno-laktatni model iz astrocitov v nevrone oziroma ANLS (angl. »Astrocyte-neuron-lactate shuttle«). Po tem modelu vzbujene sinapse glutamatergičnih nevronov sprostitjo glutamat. Glutamat se prenese v astrocite s kotransportom Na⁺, pri čemer se aktivira Na⁺/K⁺ črpalka, ki je odvisna od ATP (Bouzier-Sore in sod., 2002).

Povečane koncentracije glutamata aktivirajo anaerobno pot glikolize v astrocitih, katere glavni produkt je laktat, ki se s pomočjo monokarboksilatnih prenašalcev MCT1 in MCT4 (Pellerin in sod., 2007) sprosti v zunajcelični prostor od koder ga prevzamejo nevroni s pomočjo prenašalcev MCT2 (Bouzier-Sore in sod., 2002). Laktat se v nevronih pretvori v piruvat in tako uporabi kot energijski substrat (Occhipinti in sod., 2009; Pellerin in Magistretti, 1994).

2.2.3 Model multiplih kompartmentov energijskega metabolizma možganov

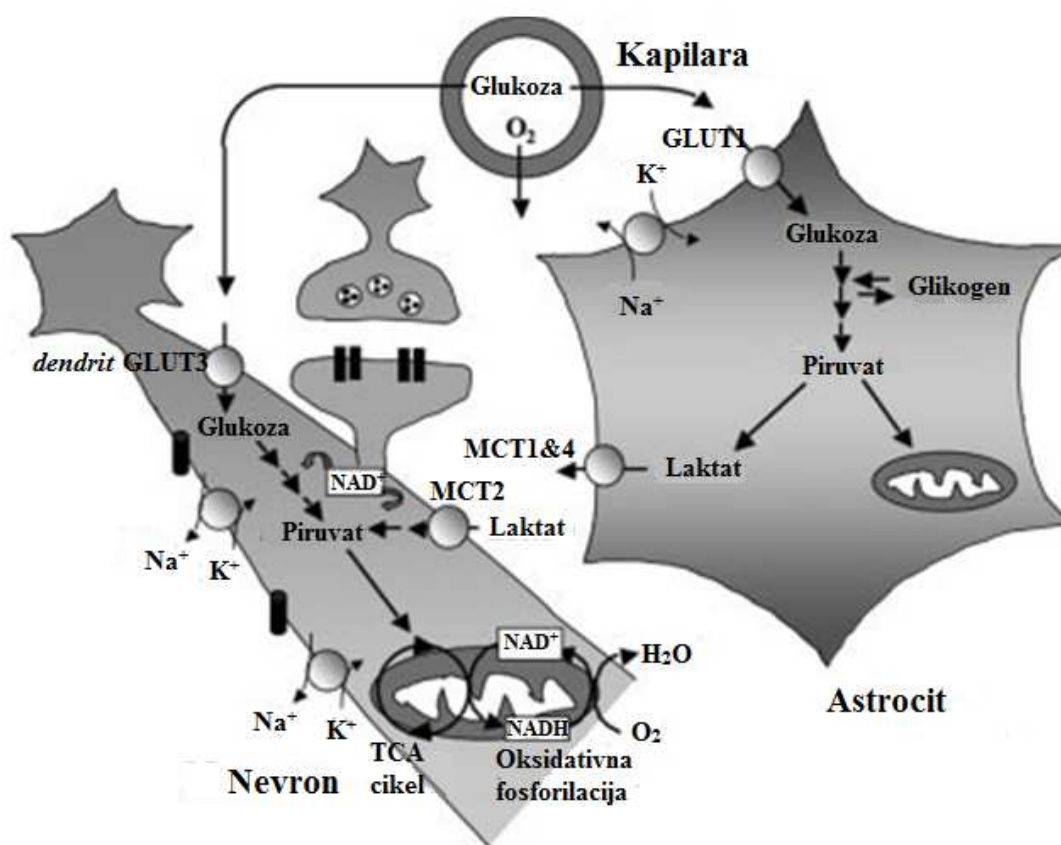
Glede na ta model, ki so ga predlagali Occhipinti in sod. (2009) je energijski metabolizem astrocitov in nevronov povezan z glikolizo v citosolu ter ciklom trikarboksilne kisline (TCA cikel ali Krebsov cikel) in oksidativno fosforilacijo v mitohondriju. Model predvideva, da je pri visoki aktivnosti možganov stopnja prenosa glukoze iz zunajceličnega prostora (krvi) v astrocite 5-krat višja kot stopnja prenosa glukoze iz krvi v nevrone (Occhipinti in sod., 2009). Pri visoki aktivnosti nevronov se laktat, ki nastane anaerobno v astrocitih, prenese v zunajcelični prostor od koder se prevzame v nevrone, kjer se oksidira (Occhipinti in sod., 2009).

2.2.4 Metabolizem glukoze v možganih

V normalnih razmerah je stopnja privzema in porabe glukoze v možganih takšna, da glukoza vsebnost v možganskih tkivih dosega 30 % koncentracije glukoze v plazmi (Zauner in sod., 2002). Glukoza vstopa v možgane preko specifičnih glukoznih prenašalcev GLUT (angl. »glucose transporters«) s pomočjo olajšane difuzije (Prebil, 2011). Prenašalci GLUT omogočajo prehod glukoze vzdolž koncentracijskega gradienta (Prebil, 2011; Zhao in Keating, 2007). V možganih je prisoten prenašalec GLUT1, ki se izraža v dveh izomernih oblikah. Izomer GLUT1 45 kDa se nahaja na astrocitnih končičih, v okolici krvnih žil (Kreft in sod., 2012; Morgello in sod., 1995) ter na astrocitnih telesih in izrastkih (Kreft in sod., 2012; Leino in sod., 1997). V astrocitih so našli tudi glukozni prenašalec GLUT2 (Kreft in sod., 2012; Leloup in sod., 1994; Leino in sod., 1997; Arluisson in sod., 2004).

Izomer GLUT1 55 kDa pa je na endotelijskih celicah, ki tvorijo krvno-možgansko pregrado (Kreft in sod., 2012). Glukoza lahko vstopi v nevrone transcelularno, preko astrocitov oziroma izomera GLUT1 45 kDa ali pa neposredno preko GLUT3, ki je kot glukozni prenašalec na nevronih (Kreft in sod., 2012; Maher in sod., 1994). Po vstopu glukoze v celice, encim heksokinaza fosforilira glukozo do glukoza-6-fosfata, ki se nato presnavlja po različnih metabolnih poteh (Belanger in sod., 2011).

Ena glavnih poti presnove glukoze v možganih je glikoliza, ki vodi do nastanka laktata ali pa oksidacije v mitohondrijih (Belanger in sod., 2011). Poleg glikolize sta pomembni še pentoza fosfatna pot ter glikogeneza-v možganih poteka samo v astrocitech (Belanger in sod., 2011).



Slika 1: Metabolizem glukoze v možganih (Pellerin in sod., 2007: 1252): Glukoza-glavni energijski substrat odraslih možganov in O₂ se preneseta po krvi do parenhimskih celic. V astrocite vstopi glukoza s pomočjo specifičnih glukoznih prenašalcev GLUT1, v nevrone pa glukozo prenesajo GLUT3. Nekaj glukoze se presnovi v ciklu trikarboksilne kisline v mitohondriju, preostala glukoza pa vstopi v anaerobno pot glikolize in se presnovi do laktata. Laktat se s pomočjo monokarboksilatnih prenašalcev MCT1 in MCT4 sprosti v zunajcelični prostor (kri). Sproščeni laktat prevzamejo nevroni s pomočjo MCT2. Piruvat, ki nastane iz glukoze in laktata se oksidira v mitohondriju in služi kot vir energije za nevrone. Večina glukoze se oksidira do CO₂ in H₂O.

2.2.4.1 Glikoliza

Glukoza-6-fosfat se presnovi do dveh molekul piruvata, nastane pa tudi ATP in NADH. Piruvat nato vstopi v mitohondrije, kjer se presnavlja v ciklu trikarboksilne kisline (TCA-cikel) ali pa v ciklu oksidativne fosforilacije, kjer ob porabi O_2 nastaneta ATP in CO_2 (Belanger in sod., 2011). Če nastaja več piruvata, kot se ga porabi v TCA-ciklu, se piruvat s pomočjo encima laktatna dehidrogenaza (LDH) pretvori v laktat (Zauner in sod., 2002), ki se nato s pomočjo monokarboksilatnih prenašalcev (MCT-prenašalci) sprosti v zunajcelični prostor (Belanger in sod., 2011). Izkupiček popolne oksidacije glukoze v mitohondrijih je nastanek velikih količin energije v obliki molekul ATP (30-34 ATP), v primerjavi z glikolizo, kjer nastaneta 2 molekuli ATP (Belanger in sod., 2011).

2.2.4.2 Pentoza-fosfatna pot

Glukoza-6-fosfat se presnovi do substratov potrebnih za sintezo aminokislin ter do NADPH (adenin dinukleotid fosfat), ki je potreben za sintezo lipidov ter za razstrupljanje vodikovega peroksida- H_2O_2 (Hertz in sod., 2007).

2.2.4.3 Glikogeneza

Iz glukoze nastane glikogen v procesu pri katerem sodeluje encim glikogen sintaza in se porablja ATP. Poteka le v astrocitih, saj se le tam nahaja glikogen v možganih kot tudi encim glikogen sintaza (Hertz in sod., 2007).

2.3 METABOLIZEM ASTROCITOV

V astrocitih se glukoza presnavlja v procesu glikolize, po pentoza-fosfatni poti ter v oksidativnem metabolizmu (Hertz in sod., 2007). Astrociti so edine celice v možganih, ki imajo encim glikogen sintazo, ki v procesu glikogeneze v katerem se porablja ATP, pretvori glukozo v glikogen (Hertz in sod., 2007). Stopnja glikogena je stabilna, ko so možgani v mirujočem stanju, takrat je stopnja glikogenolize (razgradnja glikogena) nizka (Hertz in sod., 2007; Watanabe in Passoneau, 1973; Choi in sod., 2003). Glikogenolizo pospeši možganska aktivnost (Hertz in sod., 2007; Swanson in sod., 1992; Cruz in Dienel, 2002).

2.3.1 Metabolizem glukoze v astrocitih

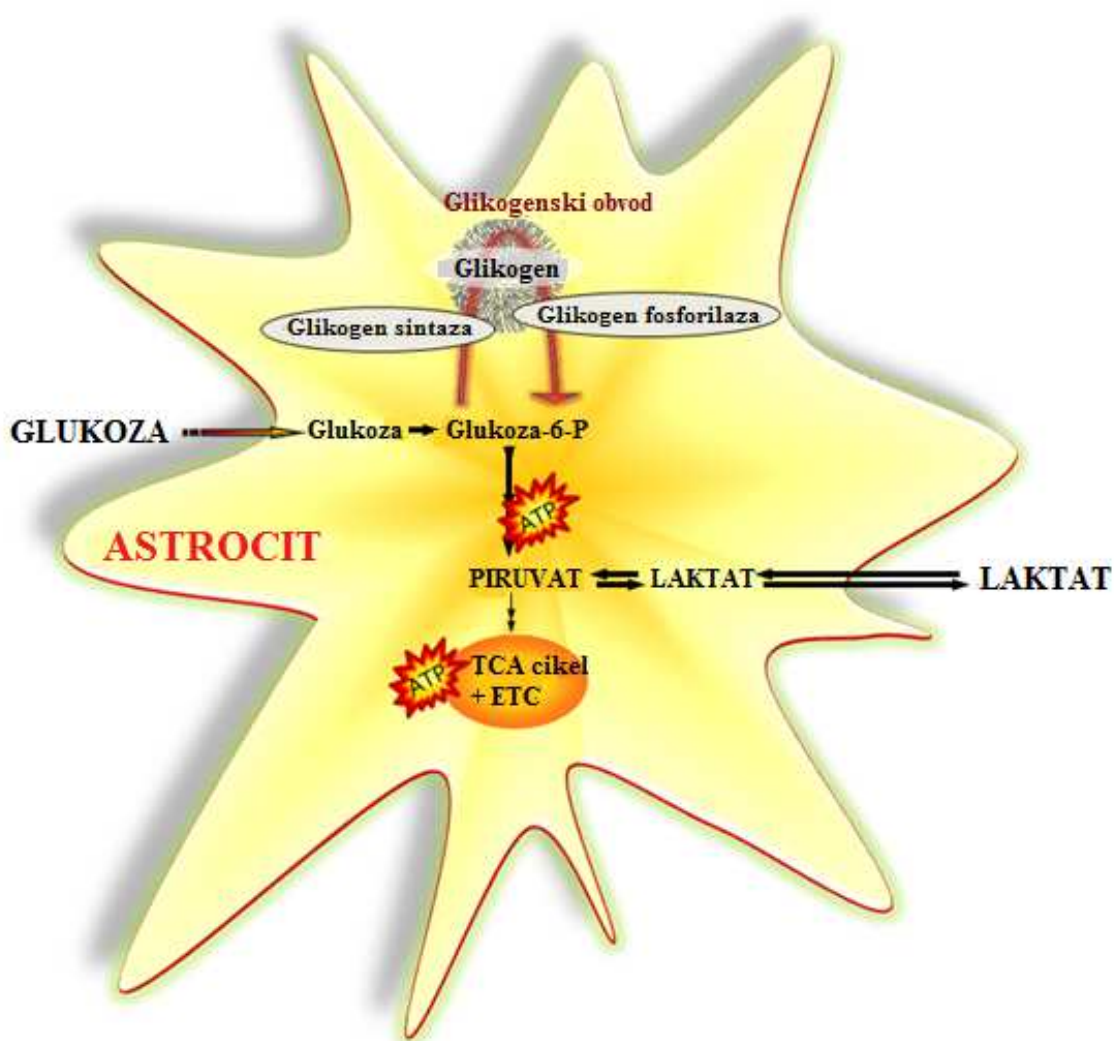
Astrociti izražajo nizko stopnjo oksidativnega metabolizma v primerjavi z nevroni (Belanger in sod., 2011). Namesto tega prevzemajo glukozo in izražajo visoko stopnjo glikolize (Itoh in sod., 2003; Herero-Mendez in sod., 2009; Bittner in sod., 2010; Belanger in sod., 2011).

Velike količine glukoze, ki vstopijo v pot glikolize v astrocitih, se v zunajcelični prostor sprostijo v obliki laktata (Itoh in sod., 2003; Bouzier-Sore in sod., 2006; Lovatt in sod., 2007; Pellerin in Magistretti, 1994; Serres in sod., 2005; Belanger in sod., 2011). Glikolitska aktivnost celic gojenih v kulturi je večinoma anaerobna (Leo in sod., 1993; Wiesinger in sod., 1997). Laktat, ki nastane iz presnovljene glukoze ali glikogena, je glavni metabolni produkt astrocitov (Wiesinger in sod., 1997).

2.3.2 Metabolizem glikogena v astrocitih

V normalnih, odraslih možganih sesalcev je glikogen predvsem v astrocitih (Wiesinger in sod., 1997). Le majhne količine glikogena so našli v nevronih, horoidnem pleksusu, epitelnih celicah, celicah meninge, endotelnih celicah kapilar in pericitih (Wiesinger in sod., 1997). Nastanek glikogenskih zrn v astrocitih je podoben kot v drugih celicah in tkivih. Iz primarne molekule glikogenina se sintetizira glikogensko zrno preko proglukogena (Wiesinger in sod., 1997). Glikogen je predvsem pomemben kot zaloga energije. Dvig citosolne glukoze povzroči sintezo glikogena, medtem ko pomanjkanje citosolne glukoze povzroči razgradnjo glikogena (Wiesinger in sod., 1997). Astrociti nimajo encima glukoza-6-fosfataza, ki sprosti prosto (nefosforilirano) glukozo iz glikogena (Brown in Ransom, 2007; Dringen in Hamprecht, 1993; Magistretti in sod., 1993). Imajo pa encim laktatno dehidrogenazo, ki pretvori piruvat v laktat (Brown in Ransom, 2007). Raziskave so pokazale, da se ob pomanjkanju glukoze, glikogen razgradi do laktata, ki se sprosti v zunajcelični prostor, od koder ga prevzamejo nevroni. Laktat je tako glavni produkt presnove glikogena v astrocitih (Brown in Ransom, 2007). Razgradnja glikogena je predvsem posledica zmanjšane koncentracije glukoze-6-fosfata.

Podobno tudi 2-deoksiglukoza-6-fosfat zavre glikogen fosforilazo-encim, ki razgrajuje glikogen (Wiesinger in sod., 1997). Z dodajanjem 2-deoksiglukoze astrocitom so zavrli glikogenolizo (Wiesinger in sod., 1997). Dodatek deoksiglukoze v medij za gojenje astrocitov posledično zviša vsebnost glikogena v astrocitih (Wiesinger in sod., 1997). Količina glikogena v astrocitih se poveča tudi po daljši izpostavitvi celic neurotransmitterju noradrenalinu (Wiesinger in sod., 1997). Ta učinek je posledica cAMP in je odvisen od sinteze proteinov (Sorg in Magistretti, 1992; Wiesinger in sod., 1997).



Slika 2: Metabolizem glukoze in glikogena v astrocitech (Kreft in sod., 2012: 189): Glukoza se lahko presnavlja v procesu glikolize ali preko glikogenskega obvoda. Produkta obeh poti sta piruvat in laktat.

2.3.3 Vpliv neurotransmiterja noradrenalina na metabolizem glukoze v astrocitech

Receptorji za različne neurotransmiterje so na plazmalemi astrocitov in uravnavaajo energijski metabolizem (Kreft in sod., 2012, Magistretti 1988). Noradrenalin v astrocitech aktivira α - in β -adrenergične receptorje, ki sprožijo razgradnjo glikogena (Kreft in sod., 2012; Subbarao in Hertz, 1990a, 1991; Pellerin in Magistretti, 1994; Fray in sod., 1996; Gibbs in sod., 2008; Walls in sod., 2009; Obel in sod., 2012). β 2- in β 3-adrenergični receptorji pospešijo prevzem glukoze v mišjih astrocitech (Kreft in sod., 2012; Catus in sod., 2011). Dodatek adrenalina ali noradrenalina poveča koncentracijo citosolne glukoze od 0,3 do 0,5 mM z začetno stopnjo rasti 1,6 μ M/s (Kreft in sod., 2012; Prebil in sod., 2011a).

β -adrenergična stimulacija astrocitov spremeni citosolno koncentracijo glukoze tako, da spremeni raven citosolnega cAMP-ja (Kreft in sod., 2012; Pellerin in sod., 1997). Razgradnja glikogena po dodatku noradrenalina presega izrabo citosolne glukoze v astrocitih (Kreft in sod., 2012; Prebil in sod., 2011a).

2.3.4 Glukoneogeneza v astrocitih

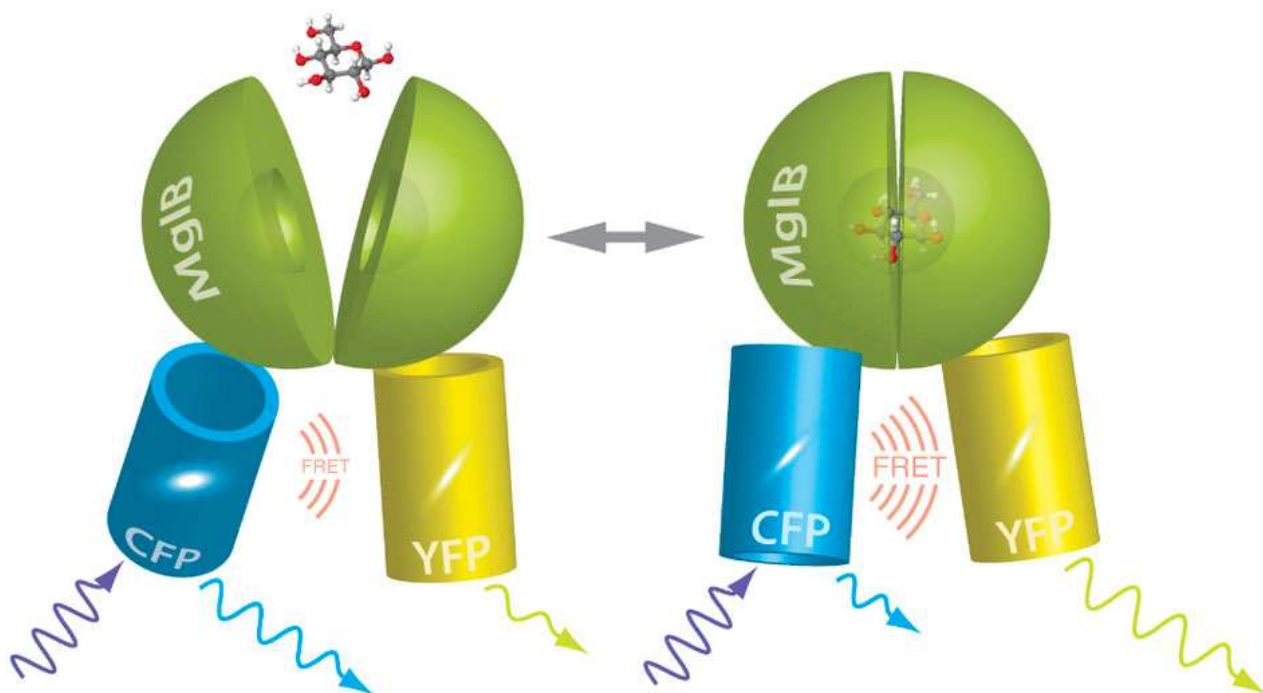
V jetrih in ledvicah se lahko glukoza sintetizira tudi iz glukoneogenih substratov kot so laktat in piruvat ter različnih aminokislin kot so alanin, serin, treonin, aspartat in glutamat (Wiesinger in sod., 1997). Pri tem procesu sodeluje sedem encimov glikolize ter štirje encimi glukoneogeneze: piruvat karboksilaza (PC), fosfoenolpiruvat karbokinaza (PEPCK), fruktoza-1,6-bifosfataza (F1, 6Paza) in glukoza-6-fosfataza (G6Paza, Wiesinger in sod., 1997). Vse encime glukoneogeneze so našli v astrocitih (Wiesinger in sod., 1997). Funkcija glukoneogeneze v astrocitih še ni povsem raziskana. Ena od funkcij naj bi bil hiter prehod med nastankom in porabo laktata, ki je potreben za aktivnost sosednjih celic (Wiesinger in sod., 1997). Po sprostitvi velikih količin laktata iz sosednjih celic, lahko astrociti prevzamejo škodljivi laktat in ga uporabijo v procesu glukoneogeneze (Wiesinger in sod., 1997). Ta proces naj bi imel tri namene: prenos in kontrola osmolarnosti zunajcelične tekočine ter reciklaža laktata, ki ga proizvedejo sosednje celice (Wiesinger in sod., 1997).

2.4 FRET (ang. »fluorescence resonance energy transfer«)-prenos energije z resonanco fluorescence

FRET je mikroskopska tehnika, s katero smo izmerili znotrajcelično koncentracijo glukoze. Pred desetimi leti je Wolf Frommer s sodelavci predstavil prvi FRET glukozni nanosenzor (Barros in sod., 2013; Fehr in sod., 2003). Izboljšana verzija tega senzorja je postala dostopna v letu 2008 (Barros in sod., 2013; Takanaga in sod., 2008). Kasneje je več raziskovalnih skupin razvilo fluorescentne nanosenzorje specifične za ATP (Barros in sod., 2013; Berg in sod., 2009; Imammura in sod., 2009) in NADH (Barros in sod., 2013; Hung in sod., 2011; Zhao in sod., 2011) ter laktat (Barros in sod., 2013; San Martin in sod., 2013). Osnova nanosenzorjev je bakterijski periplazemski protein (PBP), ki je sestavljen iz dveh različic fluorescenčnih proteinov, in sicer cian fluorescenčnega proteina (CFP) ter rumenega fluorescenčnega proteina (YFP, John in sod., 2008). PBP je del velike družine proteinov; glukoza/galaktoza vezavni protein z veliko afiniteto veže glukozo oziroma galaktozo (John in sod., 2008).

Glukozni nanosenzorji temeljijo na resonančnem prenosu energije med CFP in YFP zaradi bližine teh proteinov ter tako zaznavajo konformacijske spremembe, ki jih povzroči vezava sladkorja (Takanaga in sod., 2008). Domena, ki veže glukozo se imenuje glukoza/galaktoza vezavni protein *Escherichie coli* (Takanaga in sod., 2008).

Prvi taki nanosenzorji med katerimi je tudi FLIPglu-600 μ so na glukozo odreagirali z zmanjšanjem signala FRET (Kreft in sod., 2012; Takanaga in sod., 2008). Kasnejši nanosenzorji, kot je FLII12PGLU-700 μ Δ 6 so manj šumni ter imajo izboljšano zaznavo ravni glukoze *in vivo* in sicer od 0,05 do 9,6 mM (Kreft in sod., 2012; Takanaga in sod., 2008). Fosforilirani sladkorji nimajo vpliva na razmerje FRET (Kreft in sod., 2012; Fehr in sod., 2003). Za meritve citosolne koncentracije glukoze [glc]i se vzbudi fluorescenca CFP, meri pa se fluorescenca CFP in YFP (Kreft in sod., 2012). Razmerje YFP in CFP se izmeri na določenih regijah v posnetkih celic (Kreft in sod., 2012). Celice, stimulirane z zunajcelično raztopino, ki vsebuje visoko koncentracijo glukoze, so izražale povišano intenziteto fluorescence CFP in zmanjšano intenziteto YFP fluorescence (Kreft in sod., 2012). Visoko razmerje YFP/CFP kaže na povečano koncentracijo citosolne glukoze (Kreft in sod., 2012).



Slika 3: Mehanizem FRET (Hou in sod., 2011:) Glukoza/galaktoza vezavni protein *E. coli* MgIB veže glukozo ter tako povzroči konformacijske spremembe, ki zbližajo YFP in CFP in s tem prenos resonančne energije med YFP in CFP. To pa se izrazi na zvišanem razmerju intenzitet fluorescence YFP/CFP.

Radotić V. Temperaturna odvisnost metabolizma glukoze v podganjih astrocitih.

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije, 2014

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Uporabljene kemikalije

<i>kemikalija</i>	<i>proizvajalec</i>
70% etanol	Ecolab
Antibiotiki (penicilin in streptomycin)	Sigma Aldrich
CaCl ₂	Sigma Aldrich
D-glukoza	Sigma Aldrich
Dulbecco's Eagle's medium D5671	Sigma Aldrich
Fetusni serum goveda (FBS)	Sigma Aldrich
Fugene 6	Promega
HEPES	Sigma Aldrich
Imerzijsko olje na vodni osnovi	Zeiss
KCl	Sigma Aldrich
L-glutamin	Sigma Aldrich
MgCl ₂	Sigma Aldrich
NaCl	Sigma Aldrich
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Sigma Aldrich
NaHCO ₃	Sigma Aldrich
NaOH	Sigma Aldrich
Na-piruvat	Sigma Aldrich
Noradrenalin	Sigma Aldrich
Pasta za krovnike	Dow Corning
Plazmid FLII12PGLU-700μΔ6	Addgene 17866
Poli-L-lizin	Sigma Aldrich
Redestilirana voda	UKC Ljubljana
β-escin	Sigma Aldrich
Tripsin	Sigma Aldrich
Ultroser G	Biosepra

Radotić V. Temperaturna odvisnost metabolizma glukoze v podganjih astrocitih.

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije, 2014

3.1.2 Laboratorijska oprema

<i>oprema (naprave, pripomočki)</i>	<i>proizvajalec</i>
Avtoklav	Semlab
Avtomatske pipete	Eppendorff
Baterijski pipetor	BRAND
Brezprašna komora za delo s celicami (laminarij)	Heal Force
CCD kamera	ANDOR DV-2-CUBE
Fluorescenčni mikroskop	Zeiss /Axio, Observer 0.1
Hladilnik	Gorenje
Inkubator	New Brunswick Scientific
Magnetno mešalo	Tehtnica
Monokromator Polychrome V	Till Photonics
Osmometer 030	Gonotech GmbH
pH meter	Metler Toledo
Računalnik	Dell
Serološke pipete	Sarstedt
Svetlobni mikroskop	WPI
Tehtnica	Metler Toledo
Vakumska črpalka	KOMVAK
Vorteks mešalo	Tehtnica
Zamrzovalnik	Gorenje

3.1.3 Drobnji laboratorijski material in druge potrebščine

- žličke • spatule • posodice za tehtanje • petrijevke • gojilne posodice • gojilne epruvete
- igle • brizge • sterilni filtri • parafilm • teflonske magnetne palčke • čaše • vodoodporna pisala • centrifugirke • pincete • krovniki • škarje • kontrolni avtoklavirni trak • plastelin
- mikroskopska kamrica • nastavki za avtomatske pipete • vata • papirnate brisače
- lepilni trak • termometer • sušilec za lase • stiroportske posodice

3.1.4 Priprava bakterijskih plazmidov

Pri poskusih smo uporabljali plazmidno DNA (pDNA) FLII12PGLU-700 μ Δ 6 (Addgeneplasmid, 17866), ki kodira nanosenzor za vezavo glukoze. Plazmidno DNA so namnožili in izolirali iz seva bakterije *Escherichia coli* sodelavci v laboratoriju.

3.1.5 Mediji

HRANILNI MEDIJ ZA ASTROCITE

Medij smo pripravili iz DMEM (angl. »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«), ki vsebuje 4500 mg/l glukoze, ki smo mu dodali 10 ml 10% FBS (angl. »Fetal Bovine Serum«), 1 ml 2 mM L-glutamina, 1 ml 1 mM Na-piruvata ter 50 µl 50 mg/l mešanice antibiotikov penicilin/streptomycin.

LIPOFEKCIJSKI MEDIJ ZA ASTROCITE

Medij smo pripravili iz DMEM (angl. »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«), ki vsebuje 4500 mg/l glukoze, ki smo mu dodali 1 ml 2 mM L-glutamina ter 1 ml 1 mM Na-piruvata.

3.1.6 Rastopine

0 mM glukozo smo pripravili iz izračunane količine 136, 8 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0,5 mM NaH₂PO₄*H₂O, 5 mM NaHCO₃ ter 0 mM D-glukoze. 10 mM glukozo smo pripravili iz izračunane količine 131 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0,5 mM NaH₂PO₄*H₂O, 5 mM NaHCO₃ ter 10 mM D-glukoze.

0,5; 1, 2,5; 5; 7,5 mM glukozo smo pripravili tako, da smo zmešali izračunano količino pripravljene 0 mM ter 10 mM glukoze. 3 mM glukozo smo pripravili iz izračunane količine 135,3 mM NaCl, 5 mM KCl, 1, 8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0,5 mM NaH₂PO₄*H₂O, 5 mM NaHCO₃ ter 3 mM D-glukoze.

3.1.7 Dodatne kemikalije

Noradrenalin

Pripravili smo 200 µM noradrenalin, ki smo ga raztopili v 3 mM glukozi.

β-escin

Pripravili smo 50 µM β-escin, ki smo ga raztopili v 2,5 mM glukozi.

3.1.8 Celični material

- možganske celice astrociti izolirani iz podgane (*Rattus sp.*)

Uporabljali smo kulture astrocitov, ki so pod mikroskopom lepo svetile oziroma izražale plazmid in pri katerih v celicah nismo zaznali velikih skupkov. Celice so bile izolirane iz možganske skorje (korteks) 2 dni starih podganjih samic soja Wistar. Izolacijo so opravili sodelavci v laboratoriju. Ravnali so v skladu s Pravilnikom o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (Uradni list RS, št. 88/06) ter Zakonom o zaščiti živali (Uradni list RS, št. 43/07). Poskusi so bili izvedeni na podlagi veljavnega dovoljenja za poskuse na živalih v znanstveno raziskovalne namene, ki ga je izdalo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava Republike Slovenije št. 3440-29/2006 in Priglasitve znanstveno-raziskovalnega dela na izoliranih organih, tkivih in truplih predhodno usmrčenih živali v Laboratoriju za nevroendokrinologijo –molekularna celična fiziologija, Inštitut za patofiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani (datum 22. 4. 2009, št. priglasitve 34401-29/2009/2). Izolacija celic je potekala po uveljavljenem postopku (Schwartz in Wilson, 1992).

Celice so bile gojene v mediju z visoko koncentracijo glukoze-DMEM («Dulbecco's Modified Eagle's medium»), ki vsebuje 10 % FBS, 1 mM piruvat, 2 mM glutamin in 25 µg/ml penicilin/streptomicin. Gojili smo jih v inkubatorju pri:

- relativni zračni vlažnosti: 95 %
- vsebnosti CO₂: 5 %
- temperaturi: 36,5 °C

Celice smo tripsinizirali z mešanico tripsin-EDTA (etilen diamin tetraacetatna kislina) in nasadili na krovnike premera 22 mm prevlečene s poli-L-lizinom (PLL) ter jih gojili v inkubatorju pri:

- temperaturi: 36,5 °C
- relativni zračni vlažnosti: 95 %
- vsebnosti CO₂: 5 %

3.2 METODE

3.2.1 Razmere okolja

- V aseptični brezprašni komori (laminariju): Delo s celicami je sterilno, zato smo vedno delali v brezprašni sterilni komori. Delovno površino in material smo razkužili s 70 % etanolom, nosili smo zaščitne rokavice, ki smo jih med delom večkrat sprali s 70 % etanolom. Material, ki je bil v stiku z antibiotiki, serumi in celicami smo zavrgli v vreče za avtoklaviranje, ves drugi material pa v vreče za laboratorijski material.
- V laboratoriju: Raztopine različnih koncentracij glukoze smo pripravljali na pultih v laboratoriju na Inštitutu za patološko fiziologijo v Ljubljani, kjer delo ni sterilno. Kljub temu smo nosili zaščitne rokavice in poskrbeli, da smo pred in po končanem delu očistili in razkužili delovno površino s 70 % etanolom.

3.2.2 Priprava medijev

3.2.2.1 Priprava hranilnega in lipofekcijskega medija za astrocite

V čašo smo odpipetirali osnovne sestavine hranilnega medija in s pipeto dobro premešali. V dve gojilni posodici smo s pomočjo brizge in sterilnega filtra prefiltrirali po 100 ml medija. Medij smo do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku (4-6 °C). Na enak način smo pripravili tudi lipofekcijski medij.

3.2.3 Priprava raztopin

V veliko čašo smo natočili 2500 ml deionizirane vode ter vanjo položili magnet za mešanje. V deionizirani vodi smo ob mešanju na magnetnem mešalu dobro raztopili osnovne sestavine. Umerili smo pH vrednost raztopine z dodajanjem NaOH. Ustrezna pH vrednost je bila med 7,2-7,4. Ko so se sestavine raztopile v vodi, smo izmerili še osmolarnost z osmometrom, tako da smo v 50 µl centrifugirko odpipetirali 50 µl raztopine ter odčitali vrednost na osmometru. Ustrezna osmolarnost je bila med 295-305 osmolov.

3.2.4 Izolacija pDNA

pDNA smo od dobavitelja dobili v bakterijah DH5α (laboratorijski sev E. coli). Bakterije DH5α smo nacepili v medij LB, ki smo mu dodali antibiotik ampicilin ter stresali čez noč pri 37 °C.

Plazmidno DNA smo iz bakterij izolirali s komercialno dostopno metodo (Pure field Plasmid Midiprep system). Izolirano DNA smo shranili v 400 μ l deionizirane vode. Koncentracijo in čistost DNA smo določili s spektrofotometrom (Ultrospec 3100 pro, Amersham Bioscience, Švedska) in pripravek shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.5 Priprava krovnikov

Pripravili smo okrogle krovnike s premerom 22 mm na katere smo pozneje nasadili celice astrocite. Željeno število krovnikov smo vzeli iz škatlice in jih najprej za 15 minut namočili v petrijevkah z 70 % etanolom. Nato je sledilo 3-kratno izpiranje v petrijevkah z redestilirano vodo. Izprane krovnike smo nato za 15 minut namočili v petrijevkah, v katere smo predhodno dodali 5 ml redestilirane vode in 50 μ l poli-L-lizina.

Sledilo je ponovno 3-kratno izpiranje z redestilirano vodo. Krovnike smo po zadnjem izpiranju sušili 2-3h prislonjene na manjše petrijevke. Ko so se krovniki osušili smo jih zaprli v petrijevke in jih shranili v hladilniku ($4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.2.6 Priprava celičnega materiala

Kulture podganjih astrocitov so bile pripravljene po že opisanem postopku iz možganske skorje 2 dni starih podgan. Razrasle kulture celic so stresali preko noči na 225 rpm, medij so zamenjali naslednje jutro. Proces so 3-krat ponovili. Po tretjem stresanju so celice tripsinizirali in jih shranili v gojilne epruvete z rastno površino 10 cm^2 . Ko so se celice ponovno razrasle smo jih lahko nasadili na pripravljene okrogle krovnike s premerom 22 mm prevlečene s poli-L-lizinom. Po enem dnevu so bile celice transfecirane s transfekcijskim reagentom Fugene 6.

Nasaditev celic

Pred začetkom dela smo segreli hranilni medij ter krovnike, odtalili smo raztopino s tripsinom. Celice smo najprej sprali z 2-3 ml Dulbecco's Modified Eagle's medium D5671, tekočino smo odstranili in dodali 2 ml mešanice tripsin-EDTA ter gojilno epruveto s celicami za 5 minut položili v inkubator, da se celice odlepijo od podlage. Nato smo tekočino razdelili v 2 centrifugirki, ki smo ju centrifugirali 5 minut na 900 obratov. Po končani centrifugi smo odpipetirali tripsin, usedlina na dnu so bile celice. V vsako centrifugirko smo dodali po 300 μ l hranilnega medija. Tekočino v vsaki centrifugirki smo 5-6-krat potegnili skozi brizgo debeline 0,6 mm, zato, da smo celice resuspendirali. Na vsak krovnik smo z avtomatsko pipeto razmazali po 50 μ l medija s celicami. Krovnike s celicami smo za 30 minut položili v inkubator, da so se celice prilepile na krovnike.

Po tem času smo na vsak krovnik dodali še 2 ml hranilnega medija. Krovnike s celicami smo do nadaljnje uporabe shranili v inkubatorju.

Transfekcija-vnos pDNA v sesalske celice

Dan po nasaditvi smo v celice vnesli pDNA s kationskim transfekcijskim reagentom Fugene 6 z metodo lipofekcije. Pred začetkom smo segreli lipofekcijski medij ter odtalili plazmid. V centrifugirki smo zmešali lipofekcijski medij in transfekcijski reagent Fugene 6. Za vsak krovnik smo vzeli po 100 μ l lipofekcijskega medija ter po 3 μ l reagenta Fugene 6. Centrifugirko smo pustili stati 5 minut na sobni temperaturi. Med tem smo izračunali kolikšen volumen plazmida FLII12PGLU-700 μ Δ 6 določene koncentracije potrebujemo za izbrano število krovnikov. Nato smo v mešanico lipofekcijskega medija in Fugene 6 dodali izračunano količino plazmida, premešali s pipeto ter pustili stati 15 minut na sobni temperaturi, da so se tvorili kompleksi med DNA in reagentom. V tem času smo vse krovnike izprali z 2-3 ml lipofekcijskega medija. Na vsak krovnik smo nanесли po 100 μ l transfekcijske mešanice ter po 900 μ l lipofekcijskega medija. Po 3 urah smo na vsak krovnik dodali še po 30 μ l seruma Ultroser G. Dan po transfekciji smo odstranili transfekcijsko mešanico in celicam dodali po 2 ml hranilnega medija.

3.2.7 Celice v poskusu

3.2.7.1 Fluorescentna mikroskopija

Dva dni po transfekciji smo zajemali slike fluorescentno označenih celic. Uporabili smo fluorescentni mikroskop Zeiss Axio Observer (Zeiss, Oberkochen, Nemčija), ki je opremljen s CCD kamero (angl.: »Charge coupled device«, integrirano vezje, svetlobni detektor kamer) 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 (480/30 nm-modrozelenim in 535/40 nm-rumenim) ter delilcem slike (Optical Insights, Tucson, Arizona, ZDA). Zajemanje slike je potekalo v 10s časovnih intervalih pri sobni temperaturi (22-25 °C) ter pri temperaturi 37 °C. Uporabili smo vodni imerzijski objektiv C-Apochromat 63x (Zeiss, Oberkochen, Nemčija). V vsakem poskusu je bila posneta 1 celica. Celice so bile pritrjene na krovnike v mikroskopski kamrici, pred poskusom smo celicam dodali 300 µl zunajcelične raztopine (2,5 mM glukoze).

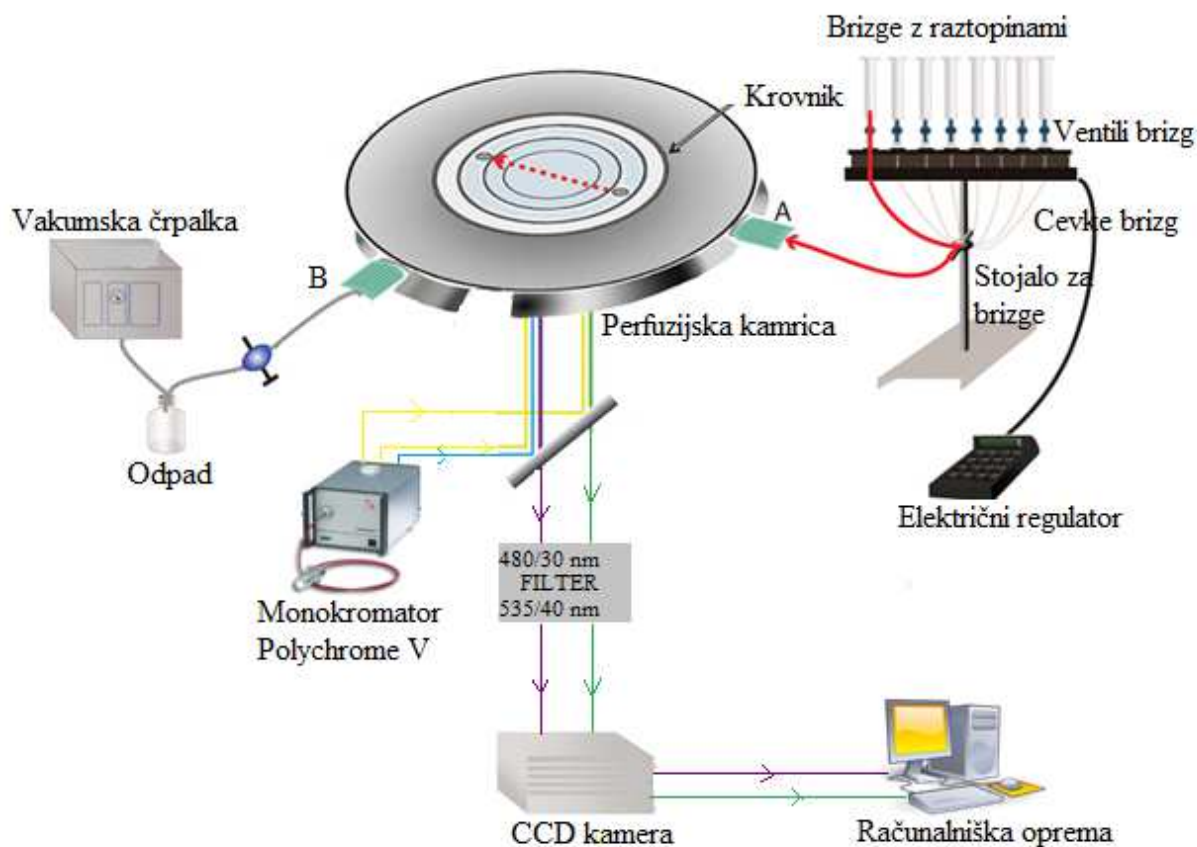
3.2.7.2 Meritve z različnimi koncentracijami glukoze

Dva dni po transfekciji smo izvedli poskus z različnimi koncentracijami glukoze. Za dovajanje tekočin smo uporabili metodo perfuzije (slika 4) katere osnova je superfuzijski sistem VC-8 (Warner Instruments, Hamden, Connecticut, ZDA) V 7 velikih brizg smo nalili raztopine in jih preko cevk dovajali celicam. Za doseganje enakomernega pretoka smo raztopine iz 7 brizg speljali v skupno izvodilo in potem v poskusno kamrico (slika 4)

Hitrost superfuzije raztopin je bila 11-14 ml/min. Celicam smo izmenjavali zunajcelične raztopine naraščajoče koncentracije glukoze (0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM in 10 mM) z zunajcelično raztopino brez glukoze (0 mM glukoza). Vsako zunajcelično raztopino različne koncentracije glukoze smo izmenjavali 3 minute.

Radotić V. Temperaturna odvisnost metabolizma glukoze v podganjih astrocitih.

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije, 2014



Slika 4: Superfuzijski sistem (prirejeno po Hou in sod., 2011): Krovnik z astrociti je bil pritrjen na mikroskopsko kamrico. Na enem koncu kamrice-A je bilo izvodilo 7 velikih brizg, v katerih so bile različne koncentracije zunajcelične glukoze (0 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2,5 mM; 5 mM; 7,5 mM in 10 mM glukoza), ki je celicam dovajal raztopine. Na drugem koncu kamrice-B je bila pritrjena steklena cevka, ki je s pomočjo črpalke odvajala raztopine. Slike fluorescentno označenih celic smo zajemali s pomočjo fluorescentnega mikroskopa, ki je opremljen s CCD kamero in monokromatorjem Polychrome V za monokromatski vir svetlobe z valovno dolžino 436/10 nm.

Izračunali smo razmerje (R) med emisijama YFP in CFP z odšteto fluorescenco ozadja. Visoka vrednost R je pomenila, da je glukoza vezana na glukozni nanosenzor FLII12PGLU-700 $\mu\Delta 6$ in da je prišlo do prenosa energije svetlobe med akceptorjem in donorjem.

Spremembe v razmerju R (ΔR) smo s pomočjo titracijske krivulje preračunali v znotrajcelično koncentracijo glukoze. Največjo spremembo razmerja (ΔR_{\max}) pri saturacijski zunajcelični koncentraciji glukoze smo določili s prileganjem krivulje na podatke za ΔR v odvisnosti od zunajcelične koncentracije glukoze z naslednjo enačbo:

$$\Delta R = [\text{glc}]_e \times (\Delta R_{\max}) / (K_d + [\text{glc}]_e) \quad \dots (1)$$

kjer je $[\text{glc}]_e$ zunajcelična koncentracija glukoze (Fehr in sod., 2004; Kreft in sod., 2013) in K_d disociacijska konstanta.

Rezultate sprememb razmerij smo nato normalizirali z enačbo:

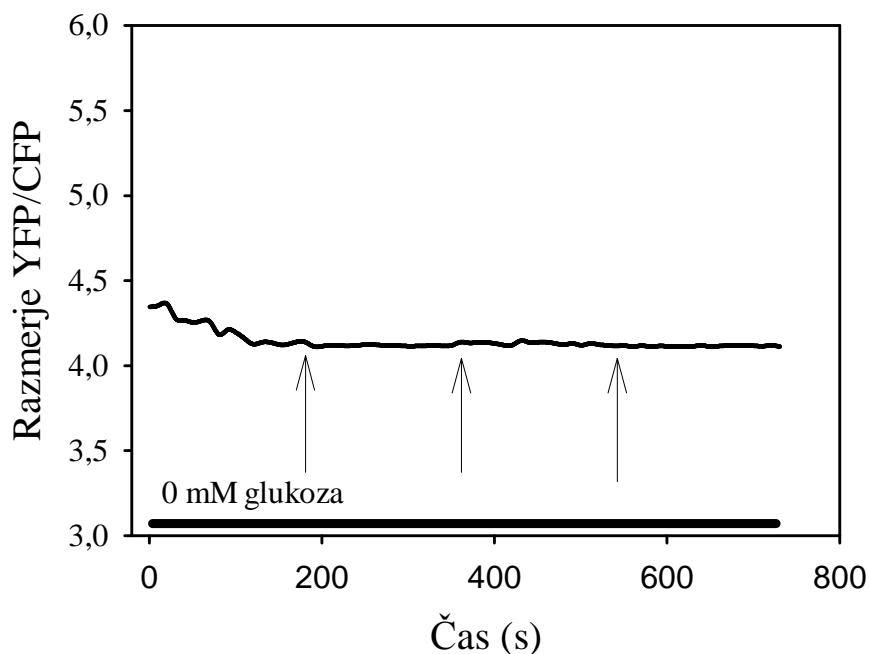
$$S = \Delta R / \Delta R_{\max} \quad \dots (2)$$

kjer je S normalizirana sprememba razmerij ΔR oziroma delež saturacije

Nato smo izračunali citosolno koncentracijo glukoze $[\text{glc}]_i$ z uporabo normalizirane spremembe razmerij:

$$[\text{glc}]_i = (K_d \times S) / (1 - S) \quad \dots (3)$$

Izmerili smo tudi razmerje YFP/CFP na celicah, ki smo jih za kontrolo morebitnih vplivov superfuzije obličali z raztopinami enake sestave (0 mM glukoza) iz različnih dovodnih kanalov (slika 5). S tem smo pokazali, da spremembe v razmerju fluorescenc niso posledica metodologije menjave raztopin ali mehanskega draženja astrocitov (Prebil, 2011), temveč posledica različnih koncentracij glukoze v citosolu (slika 5).



Slika 5: Sprememba dovodnega kanala superfuzije ne povzroča sprememb v razmerju FRET
 Izmenično oblikanje celic z isto zunajcelično raztopino iz dveh različnih dovodnih cevk (zunajcelična raztopina brez glukoze) nima učinka na časovne spremembe razmerja YFP/CFP. Rezultat kaže, da učinek FRET ni posledica metodologije menjave raztopin ali mehanskega draženja astrocitov, temveč posledica spremembe koncentracije glukoze. Puščice kažejo čas menjave raztopine enake sestave.

3.2.7.3 Stimulacija z β -escinom

Za kalibracijo glukoze smo uporabili β -escin, ki permeabilizira membrano in s tem poveča permeabilnost membrane za prenos glukoze. Celice smo za 30 s namočili v 50 μ M raztopino β -escina (John in sod., 2008). Izmerili smo spremembe v razmerju R z dodajanjem raztopin naraščajočih koncentracij glukoze (0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM in 10 mM) in pri vmesnem spiranju z raztopino brez glukoze (0 mM). Vsako raztopino smo dovajali 3 minute.

3.2.7.4 Meritve pri temperaturi 37 °C

Za meritve pri temperaturi 37 °C smo astrocite s pomočjo superfuzijskega sistema izmenično oblikovali s predhodno segretim raztopinama z 0 mM in 10 mM glukozo. Raztopini smo segrevali v večji stiroporski posodi, ki je delovala kot kopel (48-50 °C). Primerna temperatura raztopin je bila 42 °C, zato da so bili astrociti, oblikovani z raztopino, ki je imela 37 °C, saj se je s pretokom skozi cevke temperatura raztopin znižala za 5 °C.

Cevke smo predhodno ovili z vato, ki je služila kot izolacija, da ni prišlo do večjih toplotnih izgub.

Za preverjanje temperature medija, ki so ji bili izpostavljeni astrociti, smo uporabili termometer s sondo, ki smo jo pritrdili na kamrici pri odvodni cevki superfuzijskega sistema in je konstantno meril temperaturo raztopin, s katerimi smo oblikovali astrocite.

Če smo opazili znižanje temperature pod 37 °C smo cevke z raztopinama segreli s sušilcem za lase. Če smo opazili povišanje temperature nad 37 °C smo pustili, da so se raztopine nekoliko ohladile.

3.2.7.5 Stimulacija z noradrenalinom

Pripravili smo noradrenalin v določeni količini raztopine, ki je vsebovala 3 mM glukozo. Celice smo za snemanje pripravili na enak način kot pri meritvah z različnimi koncentracijami glukoze. Najprej smo celice 300s oblikovali z raztopino s 3 mM glukozo brez noradrenalina, nato pa smo celicam 600s dovajali 3 mM glukozo v kateri je bil raztopljen noradrenalin. Celice smo z noradrenalinom stimulirali pri temperaturi 24 °C in 37 °C. Za doseg temperature 37 °C smo zunajcelično raztopino s 3 mM glukozo predhodno segreli na želeno temperaturo, tik pred poskusom pa smo v segreti raztopini raztopili natehtano količino noradrenalina, saj je noradrenalin v raztopini segreti na 37 °C pričel hitreje kemijsko razpadati, kar je bilo vidno kot roza obarvanje raztopine.

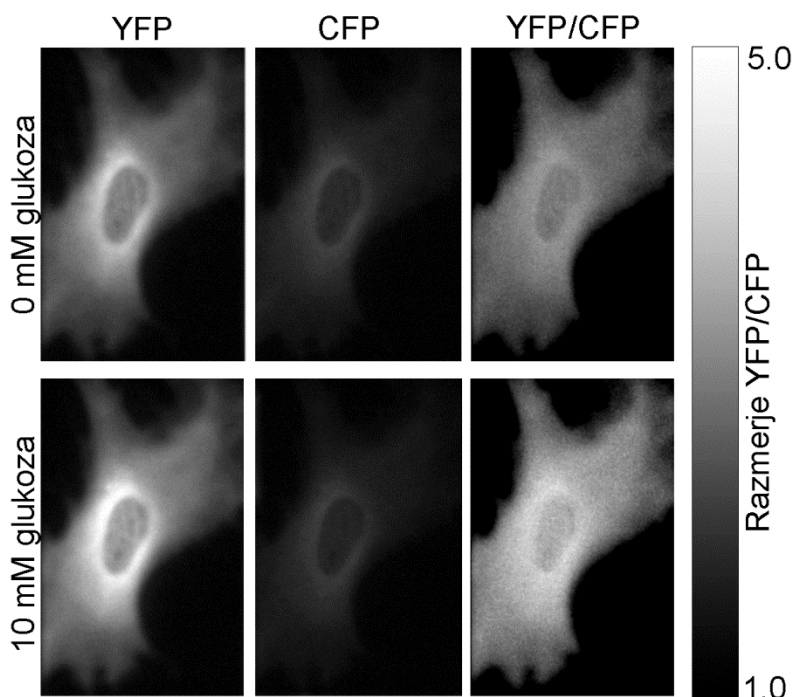
3.2.8 Analiza in statistično ovrednotenje podatkov

Za analizo smo uporabljali MS Excel in lastni program za meritve napisan v okolju Matlab (Mathworks, R2008A, ZDA) ter program SigmaPlot. Rezultati so podani kot povprečje \pm standardna napaka (SE). Za primerjavo dveh vzorcev je bil uporabljen Studentov t-test. Slike smo analizirali s pomočjo programov ImageJ in Photoshop.

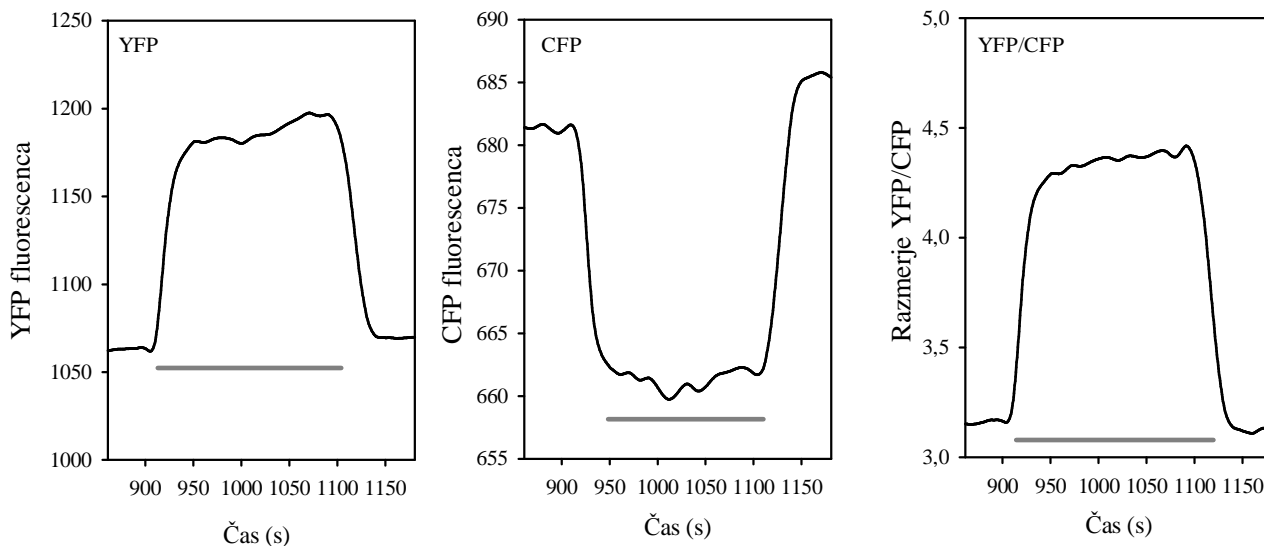
4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 REZULTATI MERITEV SPREMENB CITOSOLNE KONCENTRACIJE GLUKOZE V ASTROCITIH Z IZRAŽENIM NANOSENZORJEM FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6

Glukozni nanosenzor FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 se homogeno izraža v citoplazmi astrocита, kar je razvidno iz slike 6, z nekoliko manjšo intenziteto pa se izraža na periferiji celice, kjer je citoplazma tanjša. Zaradi velike molekulske mase v jedro ne vstopa (Fehr in sod., 2003). Sestavljen je iz glukoza/galaktoza vezavnega proteina (angl. »glucose/galactose binding protein«-GGBP), ki je sestavljen iz dveh različnih fluorescentnih proteinov, CFP in YFP. GGBP veže glukozo in s tem povzroči rezonančni prenos energije med CFP in YFP. Vezava glukoze povzroči večjo intenziteto fluorescence YFP in manjšo intenziteto fluorescence CFP ter tako povečanje razmerja FRET (razmerje YFP/CFP, sliki 6 in 7). V astrocitih z izraženim FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 smo izmerili višjo intenziteto YFP po dodatku zunajcelične raztopine, ki je vsebovala 10 mM glukozo in povišanje razmerja FRET (slika 7a).



Slika 6: Spremembe razmerja FRET v celicah z izraženim glukoznim nanosenzorjem FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 v posameznem astrocitu: Emisiji fluorescence CFP in YFP sta posledici izražanja FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 v astrocitu. Desni del slike označuje razmerje FRET (YFP/CFP) v črno-beli lestvici. Bela barva pomeni najvišje razmerje FRET, črna najnižje. Zgornji del slike je astrociti v raztopini brez glukoze, spodnji del isti astrociti v zunajcelični raztopini z 10 mM glukozo, levi del slike prikazuje emisijo YFP, srednji pa emisijo CFP. Merilce: 25 μ m.

a FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6

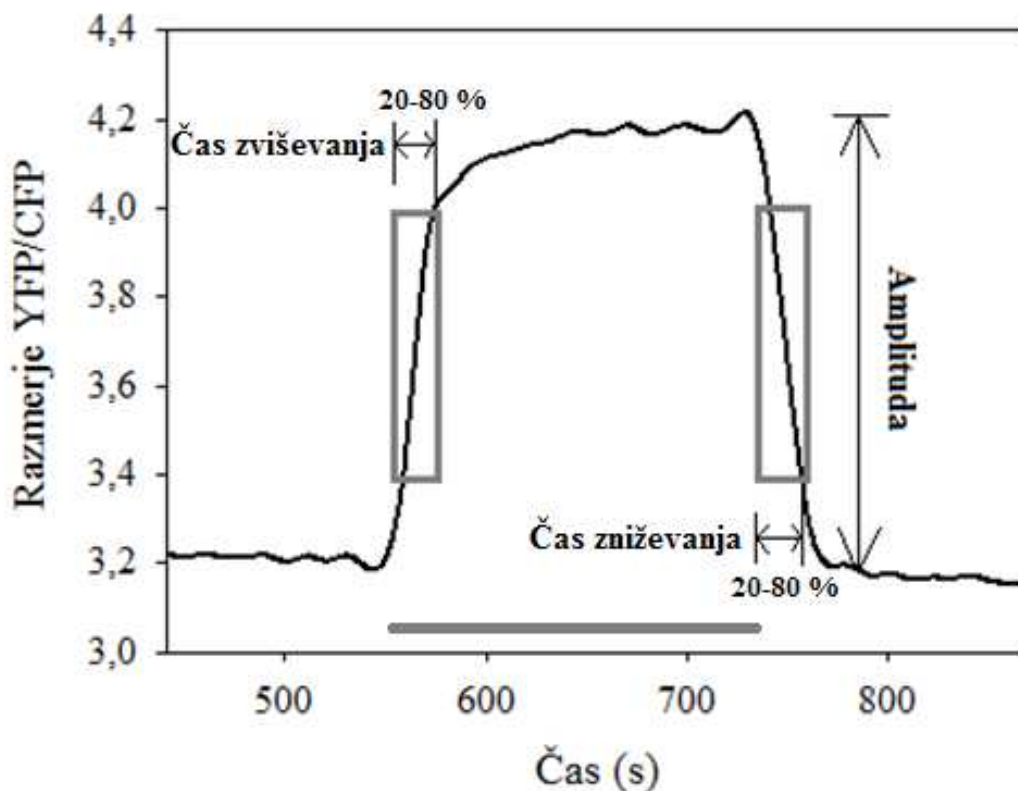
Slika 7: Vpliv povišane zunajcelične koncentracije glukoze na meritev emisije YFP (angl. »yellow fluorescent protein«-rumeni fluorescenčni protein) in CFP (angl. »cyan fluorescent protein«-modrozeleni fluorescenčni protein) v astrocitu z izraženim glukoznim nanosenzorjem FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6

- a) Slika prikazuje zapis spremembe zunajcelične koncentracije glukoze. Celice smo s superfuzijo obličali z zunajcelično raztopino z 10 mM glukozo (siva črta), pred in po tem smo celice obličali z zunajcelično raztopino brez glukoze. Nanosenzor FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 se ob vezavi glukoze spremeni tako, da se fluorescenca YFP zviša, CFP pa zniža, torej se zviša razmerje YFP/CFP.

se nadaljuje

Nadaljevanje slike 7

b



Slika 7: Vpliv povišane zunajcelične koncentracije glukoze na meritev emisije YFP (angl. »yellow fluorescent protein«-rumeni fluorescenčni protein) in CFP (angl. »cyan fluorescent protein«-modrozeleni fluorescenčni protein) v astrocitu z izraženim glukoznim nanosenzorjem FLII12PGLU-700 $\mu\Delta 6$

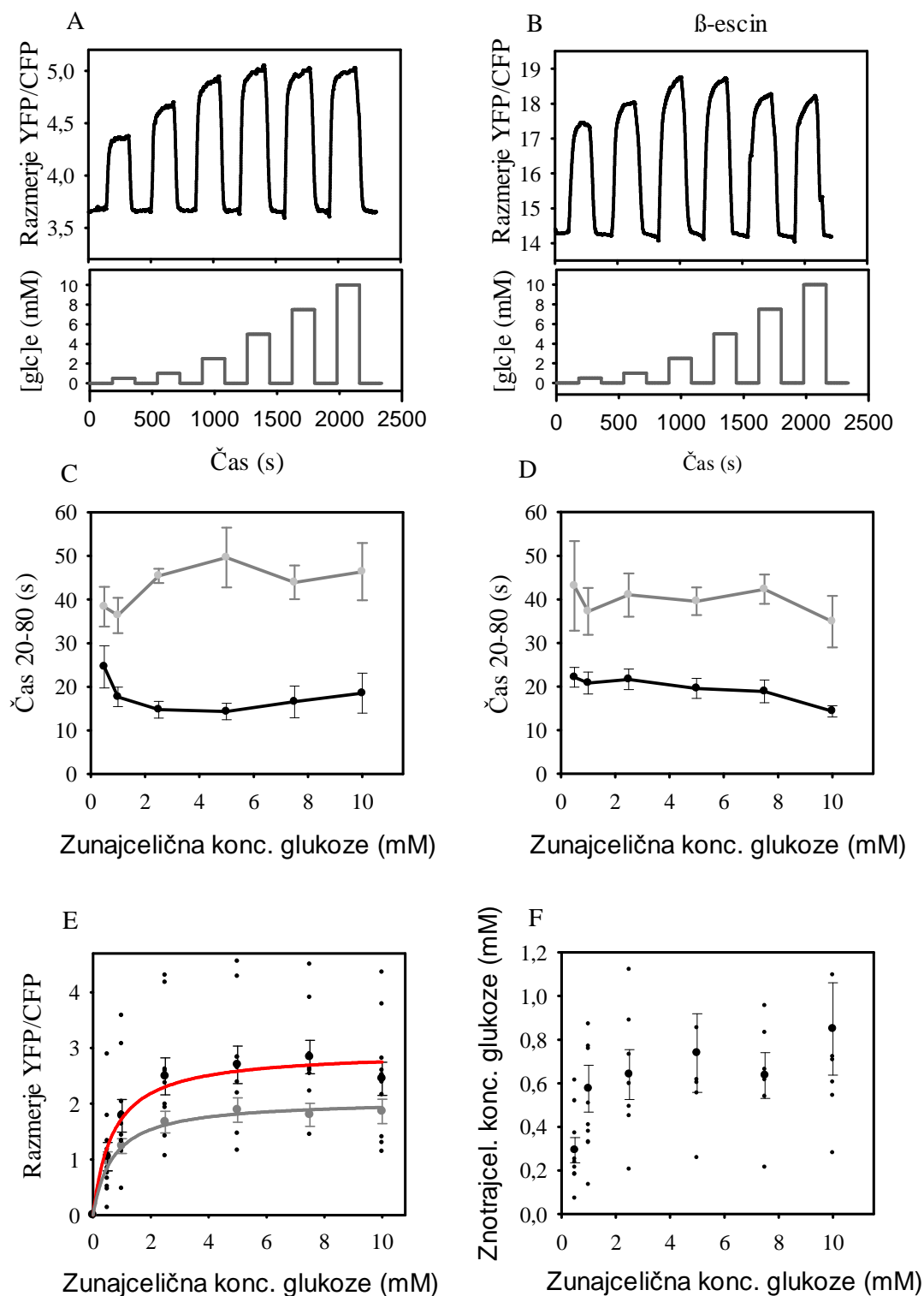
- b) Slika prikazuje zapis spremembe zunajcelične koncentracije glukoze. Celice smo s superfuzijo obličali z zunajcelično raztopino z 10 mM glukozo (siva črta), pred in po tem pa z zunajcelično raztopino brez glukoze. (kot na sliki 7a). Čas, ki preteče ob spremembi amplitude iz 20 % na 80 % glede na najvišjo vrednost, se imenuje čas zviševanja (angl. »rise time«) oziroma čas zniževanja (angl. »fall time«, siva pravokotnika).

4.2 CITOSOLNA KONCENTRACIJA GLUKOZE V ASTROCITU V ODVISNOSTI OD ZUNAJCELIČNE KONCENTRACIJE GLUKOZE

Vpliv zunajcelične koncentracije glukoze na citosolno koncentracijo glukoze v astrocitu so že dokazale različne raziskovalne skupine: -Fehr in sod., 2003; Prebil in sod., 2011. Zanimalo nas je kako hitro se odzove presnova astrocitov na spremembe v zunajceličnem prostoru ter ali imajo optične lastnosti mikroskopa vpliv na hitrost presnove. V ta namen smo s pomočjo superfuzijskega sistema astrocitom dovajali naraščajoče koncentracije zunajcelične glukoze (0,5: 1: 2,5; 5; 7,5; 10 mM glukoza) in jih vmes spirali z zunajcelično raztopino brez glukoze (0 mM glukoza). Fluorescenco YFP in CFP smo zajemali na sliki celotne celice v 10s časovnih intervalih, nato pa smo izračunali razmerje FRET (YFP/CFP). Slika 8A kaže naraščajoče amplitude razmerja YFP/CFP nanosenzorja FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6, kar pomeni naraščajočo koncentracijo znotrajcelične glukoze v astrocitu ob dovajanju naraščajočih koncentracij glukoze v zunajcelični raztopini. Vmesno spiranje z zunajcelično raztopino brez glukoze se na sliki kaže kot vračanje signala FRET na začetno vrednost. Čas, ki preteče ob spremembi amplitude iz 20 % na 80 % glede na najvišjo vrednost, se imenuje čas zviševanja (angl. »rise time«). Čas zviševanja (slika 8C-črna krivulja, n=6-10) se med spremembo zunajcelične koncentracije glukoze iz 0 na 5 mM zniža, nato pa med spremembo zunajcelične koncentracije glukoze med 5 in 10 mM postopno naraste. Čas zniževanja (angl. »fall time«, slika 8C-siva krivulja, n=6-10) se z večanjem zunajcelične koncentracije glukoze med 0 in 0,5 mM nekoliko zniža, med spremembo zunajcelične koncentracije glukoze med 0,5 in 5 mM se poveča ter med spremembo zunajcelične koncentracije glukoze med 5 in 10 mM se ponovno zniža. Nanosenzor FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 smo kalibrirali z 50 μ M β -escinom, ki omogoča permeabilizacijo membrane ter z naraščajočimi koncentracijami zunajcelične glukoze. V permeabiliziranih celicah smo izmerili višje razmerje FRET kot po prvem merjenju (slika 8B, E). V permeabiliziranih celicah smo izmerili tudi nekoliko drugačen čas zviševanja (slika 8D-črna krivulja) in čas zniževanja glede na celice, ki niso bile permeabilizirane z β -escinom (slika 8D-siva krivulja). Krivulja odvisnosti razmerja FRET od zunajcelične koncentracije glukoze (slika 8E, rdeča krivulja-permeabilizirane celice, siva krivulja-nepermeabilizirane celice) določa ΔR_{\max} – največjo spremembo razmerja FRET, ki pomeni mejo nasičenosti nanosenzorja ($\Delta R_{\max} = 2,07$ za nepermeabilizirane celice in $\Delta R_{\max} = 2,94$ za permeabilizirane celice). S prileganjem krivulje smo določili tudi vezavno konstanto nanosenzorja K_d , ki je znašala 0,69 mM (glej Metode dela). S pomočjo normaliziranih sprememb razmerij FRET smo izračunali znotrajcelično koncentracijo glukoze-[glc]_i (slika 8F).

Radotić V. Temperaturna odvisnost metabolizma glukoze v podganjih astrocitech.

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije, 2014



Slika 8: Citosolna koncentracija glukoze v astrocitu z izraženim FLII12PGLU-700 μ Δ 6 v odvisnosti od zunajcelične koncentracije glukoze

se nadaljuje

Nadaljevanje slike 8

Slika 8: Citosolna koncentracija glukoze v astrocitu z izraženim FLII12PGLU-700 μ Δ 6 v odvisnosti od zunajcelične koncentracije glukoze

(A) Časovna odvisnost signala FRET po stimulaciji astrocitov, ki so izražali FLII12PGLU-700 μ Δ 6. Pri različnih koncentracijah zunajcelične glukoze (0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 in 10 mM) in vmesnim spiranjem z 0 mM glukoze. Vrhovi prikazujejo naraščajoče koncentracije zunajcelične glukoze, pri čemer se z zvišanjem koncentracije zunajcelične glukoze, poveča razmerje YFP/CFP.

B) Časovna odvisnost signala FRET po stimulaciji astrocitov stimuliranih z β -escinom, ki so izražali FLII12PGLU-700 μ Δ 6 pri različnih koncentracijah zunajcelične glukoze (0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 in 10 mM) in vmesnim spiranjem z 0 mM glukoze. Vrhovi prikazujejo naraščajoče koncentracije zunajcelične glukoze, pri čemer se z zvišanjem koncentracije zunajcelične glukoze močno poveča razmerje YFP/CFP.

C) Čas zviševanja signala FRET (angl. »rise time«)-črna krivulja nepermeabiliziranih celic se med spremembo zunajcelične koncentracije glukoze iz 0 na 5 mM znižuje, nato pa med spremembo zunajcelične koncentracije glukoze med 5 in 10 mM postopno povečuje. Čas zniževanja signala FRET nepermeabiliziranih celic (angl. »fall time«)-siva krivulja, se z večanjem koncentracije zunajcelične glukoze med 0 in 0,5 mM nekoliko zniža, med spremembo zunajcelične koncentracije glukoze med 0,5 in 5 mM se poveča ter med spremembo zunajcelične koncentracije glukoze med 5 in 10 mM se ponovno zniža.

D) Čas zviševanja signala FRET (črna krivulja) permeabiliziranih celic se z večanjem koncentracije zunajcelične glukoze iz 0 na 2,5 mM nekoliko poveča, nato pa med večanjem zunajcelične koncentracije glukoze med 2,5 in 10 mM postopno znižuje. Čas zniževanja signala FRET (siva krivulja) se z večanjem koncentracije zunajcelične glukoze iz 0 na 1 mM postopno zniža, med spremembo zunajcelične koncentracije glukoze med 1 in 2,5 mM se poveča, med spremembo zunajcelične koncentracije glukoze med 2,5 in 5 mM se zniža, med spremembo koncentracije zunajcelične glukoze iz 5 na 7,5 mM ponovno poveča, nato pa se med spremembo koncentracije zunajcelične glukoze iz 7,5 na 10 mM ponovno zniža.

E) Sprememba amplitude razmerja YFP/CFP v odvisnosti od naraščajoče koncentracije zunajcelične glukoze. Majhne črne pike prikazujejo posamezne vrednosti amplitude razmerja YFP/CFP ($n = 6-10$ za vsako koncentracijo glukoze) pri različnih koncentracijah zunajcelične glukoze (0; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 in 10 mM) za celice permeabilizirane z β -escinom in nepermeabilizirane celice. Rdeča krivulja predstavlja povprečno spremembo amplitude razmerja YFP/CFP permeabiliziranih celic, siva krivulja pa povprečno spremembo amplitude razmerja YFP/CFP nepermeabiliziranih celic. Večje pike s standardno napako (SE) predstavljajo povprečne vrednosti \pm SE. ΔR_{\max} za nepermeabilizirane celice je 2,07, za permeabilizirane celice pa 2,94. Vezavna konstanta K_d je 0,69 mM.

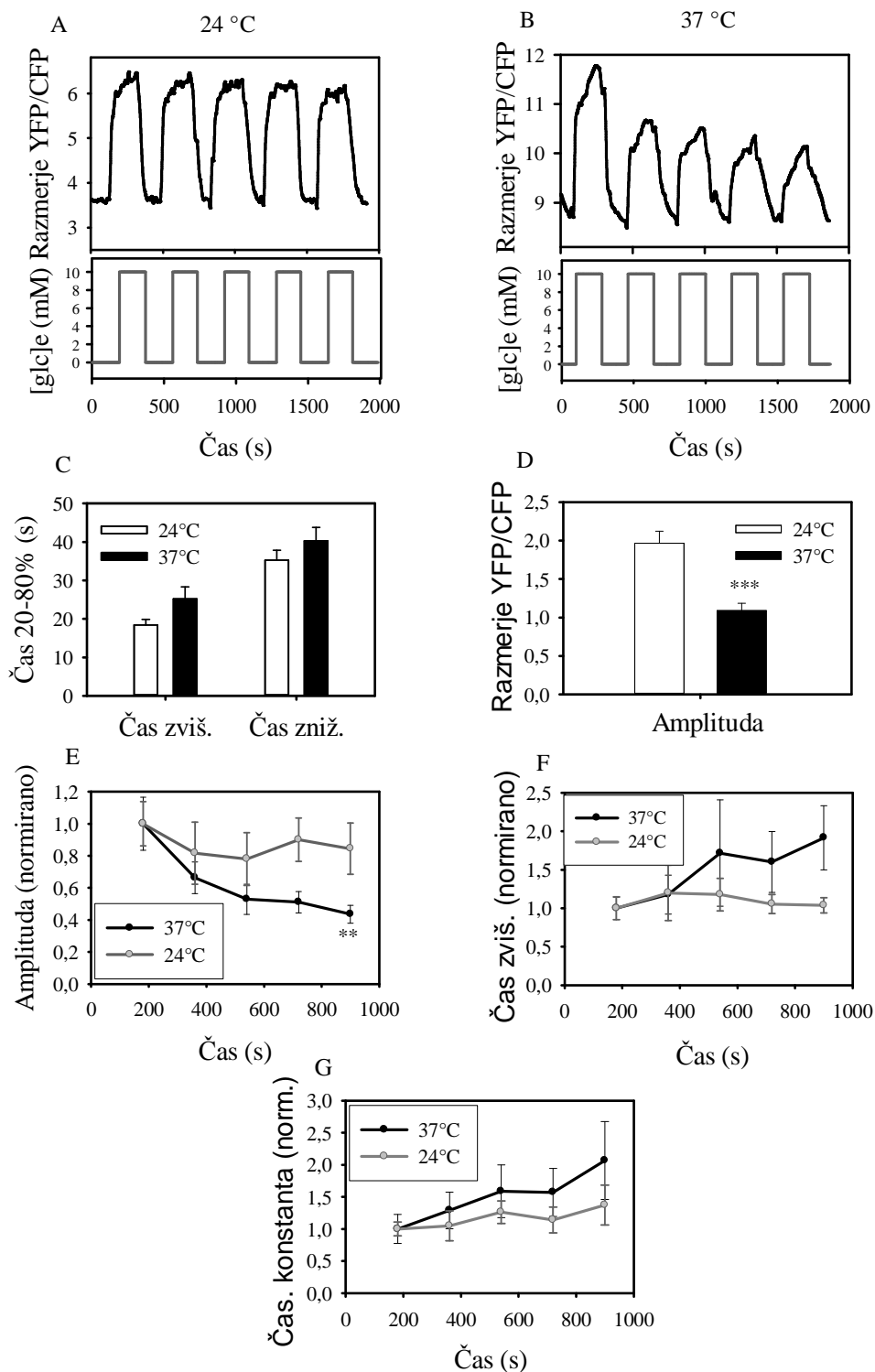
F) Izračunana znotrajcelična koncentracija glukoze na podlagi kalibracije nanosenzorja s pomočjo normaliziranih sprememb razmerij (S): $S = \Delta R / \Delta R_{\max}$; $[glc]_i = (K_d \times S) / (1 - S)$.

4.3 VPLIV TEMPERATURE NA HITROST PRESNOVE IN ZNOTRAJCELIČNO KONCENTRACIJO GLUKOZE V ASTROCITU

Doslej so bili vsi poskusi glede dinamike znotrajcelične glukoze izvedeni pri 22-25 °C, (Fehr in sod., 2003; Prebil in sod., 2011). Naš namen je bil ugotoviti kako hitra je presnova v astrocitu in kakšna je znotrajcelična koncentracija glukoze pri temperaturi 37 °C. V ta namen smo s superfuzijskim sistemom astrocitom izmenično dovajali zunajcelični raztopini z 10 mM glukozo in zunajcelično raztopino brez glukoze, ki sta bili segreti na 37 °C. Fluorescenco YFP in CFP smo zajemali na celotni sliki celice v 10s časovnih intervalih, nato pa smo izračunali razmerje FRET (YFP/CFP). Slika 9A prikazuje vsakokratno naraščanje amplitude signala FRET po dodatku 10 mM glukoze pri temperaturi 24 °C, kar pomeni povečanje citosolne glukoze v astrocitu. Slika 9B prikazuje sprva primerljivo zvišanje amplitude signala FRET po dodatku 10 mM glukoze pri temperaturi 37 °C, podobno kot pri sobni temperaturi. Izračunana znotrajcelična koncentracija glukoze (1.cikel obliivanja z 10 mM glukoze) pri 24 °C znaša 2,32 mM in pri 37 °C 1,77 mM, kar pomeni, da razlike niso statistično pomembne (Studentov t-test: $p = 0,33$). V 5.ciklu obliivanja celic z 10 mM glukoze znaša izračunana znotrajcelična koncentracija glukoze pri 24 °C 1,58 mM in pri 37 °C 0,24 mM, kar kaže, da so razlike statistično pomembne (Studentov t-test: $p = 0,04$). Pri obeh temperaturah smo izmerili primerljiv čas zviševanja in čas zniževanja signala FRET (slika 9C, F), vendar razlike niso statistično pomembne ($p = 0,06$ za čas zviševanja in $p = 0,26$ za čas zniževanja). Sliki 9D in 9E prikazujeta spremembo amplitude pri temperaturi 24 °C in 37 °C. Povprečni amplitudi pri temperaturi 24 °C in 37 °C sta znašali $1,97 \pm 0,15$ ter $1,09 \pm 0,09$ arbitrarnih enot. Razlike v amplitudah pri različnih temperaturah so statistično pomembne (Studentov t-test: $p < 0,001$). Povprečni časovni konstanti signalov FRET pri temperaturi 24 °C in 37 °C sta znašali $18,24 \pm 1,08$ s in $27 \pm 3,18$ s (slika 9G), kar ni statistično značilno pomembno (Studentov t-test: $p = 0,14$).

Radotić V. Temperaturna odvisnost metabolizma glukoze v podganjih astrocitih.

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije, 2014



Slika 9: Citosolna koncentracija glukoze v odvisnosti od zunajcelične koncentracije glukoze pri 24 °C in 37 °C

se nadaljuje

Nadaljevanje slike 9

Slika 9: Citosolna koncentracija glukoze v odvisnosti od zunajcelične koncentracije glukoze pri 24 °C in 37 °C

A) Časovna odvisnost signala FRET po stimulaciji astrocitov z 10 mM zunajcelično glukozo in vmesnim spiranjem z 0 mM glukozo pri temperaturi 24 °C. Vrhovi prikazujejo 10 mM zunajcelično glukozo in povečanje razmerja YFP/CFP.

B) Časovna odvisnost signala FRET po stimulaciji astrocitov z 10 mM zunajcelično glukozo in vmesnim spiranjem z 0 mM glukozo pri temperaturi 37 °C. Vrhovi prikazujejo 10 mM zunajcelično glukozo in večje povišanje razmerja YFP/CFP kot pri sliki A.

C) Čas zviševanja signala FRET (angl. »rise time«) in čas zniževanja (angl. »fall time«) pri temperaturi 24 °C in 37 °C kot sprememba razmerja YFP/CFP v času med 20 % in 80 % maksimalne amplitude. Beli stolpec prikazuje spremembo časa zviševanja in časa zniževanja signala FRET pri temperaturi 24 °C, črni stolpec pa spremembo časa zviševanja in časa zniževanja signala FRET pri temperaturi 37 °C. Povprečje vseh časov zviševanja pri temperaturi 24 °C znaša $18,43 \text{ s} \pm 1,5 \text{ s}$. Povprečje vseh časov zniževanja pri temperaturi 24 °C znaša $35,29 \text{ s} \pm 2,58 \text{ s}$. Povprečje vseh časov zviševanja pri temperaturi 37 °C znaša $25,18 \text{ s} \pm 3,17 \text{ s}$. Povprečje vseh časov zniževanja pri temperaturi 37 °C znaša $40,27 \text{ s} \pm 3,57 \text{ s}$. V času zviševanja in času zniževanja pri različnih temperaturah razlike niso statistično pomembne (Studentov t-test: $p = 0,06$ za čas zviševanja in $p = 0,26$ za čas zniževanja).

D) Sprememba amplitude pri temperaturi 24 °C in 37 °C. Beli stolpec prikazuje spremembo amplitude pri 24 °C, črni stolpec pa spremembo amplitude pri 37 °C. Ugotovili smo, da se pri višji temperaturi amplituda postopno zniža. V amplitudi pri različnih temperaturah so pomembne statistične razlike (Studentov t-test: $p < 0,001$).

E) Normirane vrednosti povprečja amplitude pri temperaturi 24 °C in 37 °C. Pri višji temperaturi amplituda statistično značilno ($p < 0,001$) postopno upada.

F) Normirane vrednosti povprečja časa zviševanja pri temperaturi 24 °C in 37 °C. Pri višji temperaturi se čas zviševanja nekoliko poveča, vendar razlika ni statistično pomembna ($p = 0,06$).

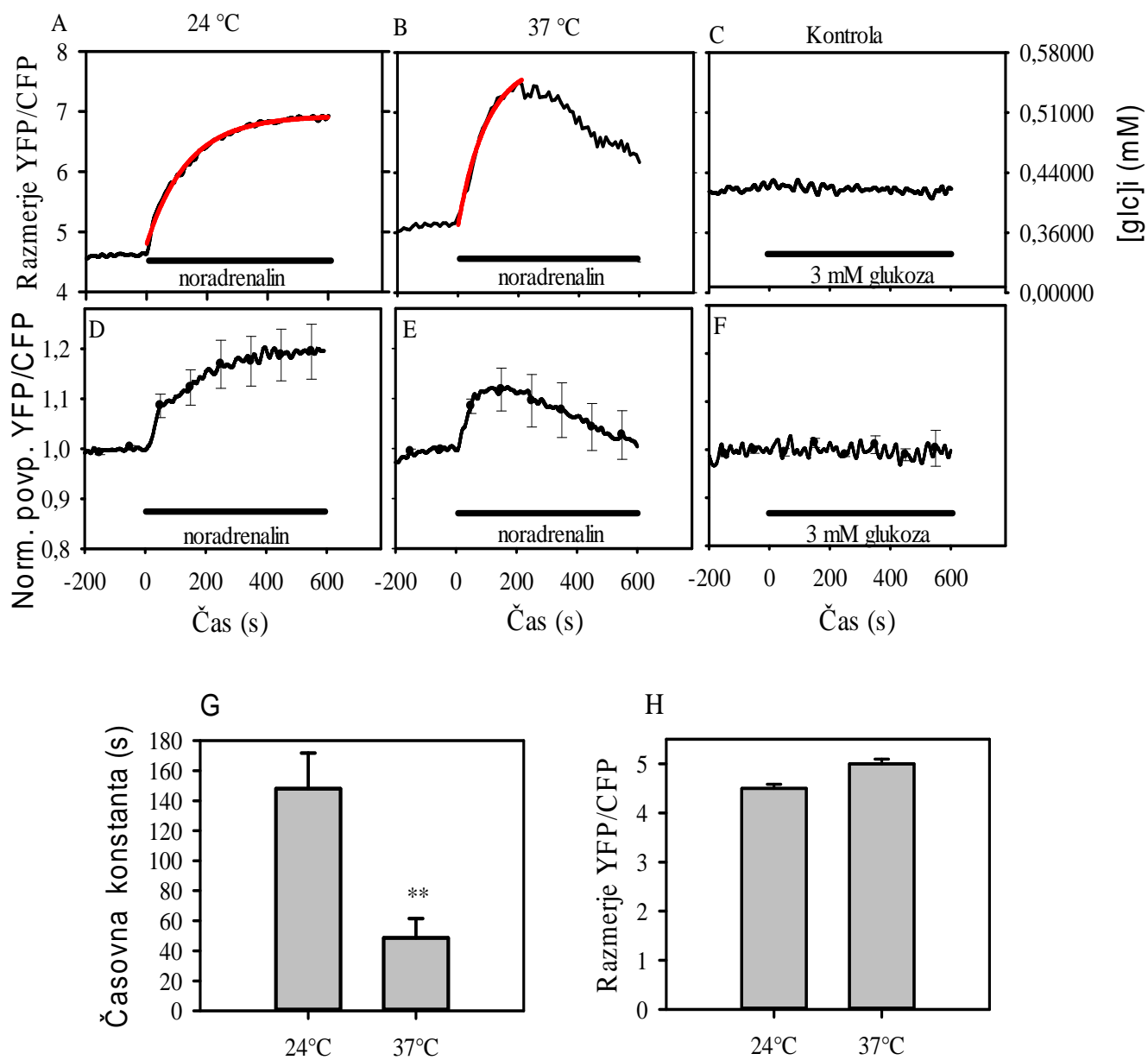
G) Normirane vrednosti povprečja časovne konstante pri temperaturi 24 °C in 37 °C. V časovnih konstantah ni pomembnih statističnih razlik med različnima temperaturama ($p = 0,14$).

4.4 VPLIV NORADRENALINA NA RAVEN CITOSOLNE GLUKOZE V ASTROCITU PRI TEMPERATURI 24 °C IN 37 °C

Astrociti vsebujejo α - in β -adrenergične receptorje, ki sprožijo razgradnjo glikogena in s tem povečajo citosolno koncentracijo glukoze. Zanimalo nas je ali temperatura vpliva na učinek stimulacije astrocitov z noradrenalinom in na citosolno koncentracijo glukoze. V prvem delu poskusov (slika 10A) smo astrocite s pomočjo superfuzijskega sistema 600s oblikovali z zunajcelično raztopino s 3 mM glukozo v kateri je bil raztopljen 200 μ M noradrenalin. Stimulacija z noradrenalinom je povzročila značilno zvišanje razmerja FRET, kar pomeni, da se je povečala citosolna koncentracija glukoze. Na 8 astrocitih smo povprečno izmerili 17,90 % povišanje razmerja FRET 600s po dodatku noradrenalina. V drugem delu poskusov (slika 10B) smo astrocite oblikovali z zunajcelično raztopino s 3 mM, glukozo segreto na 37 °C, v kateri je bil raztopljen 200 μ M noradrenalin. Stimulacija je povzročila značilno zvišanje razmerja FRET, nato pa postopno upadanje razmerja FRET, zaradi prevladujočega porabljanja glukoze v presnovnih procesih v celici, ki jih je povzročil dodatek raztopine z noradrenalinom. Na 8 astrocitih smo povprečno izmerili 14,60 % zvišanje razmerja FRET 600s po dodatku noradrenalina. Tretji del poskusov (slika 10C) smo izvedli tako, da smo celice s pomočjo superfuzijskega sistema 600 sekund oblikovali s kontrolno raztopino s 3 mM glukozo, nato pa nadaljnjih 600 sekund z enako kontrolno raztopino iz druge dovodne cevi za superfuzijo. Pri kontrolnih poskusih nismo opazili značilnih sprememb razmerja FRET. Posameznim signalom FRET smo prilegali eksponentne krivulje takoj po začetku sprememb, ki so se pojavile nekaj sekund po stimulaciji. Časovne konstante eksponentnih krivulj zato ne vključujejo zamika, ki bi ga lahko povzročil sistem za superfuzijo. Povprečni časovni konstanti signalov FRET po stimulaciji z noradrenalinom pri temperaturi 24 °C in 37 °C sta znašali $147,92 \pm 23,83$ s in $47,01 \pm 10,81$ s (slika 10G). V časovnih konstantah pri različnih temperaturah so pomembne statistične razlike (Studentov t-test: $p = 0,0025$). Povprečni amplitudi sta bili $1,1 \pm 0,2$ (22-25 °C) in $0,95 \pm 0,23$ (37 °C) arbitrarnih enot. Zvišanje amplitude signala FRET ustreza zvišanju znotrajcelične koncentracije glukoze iz 0,26 mM na 0,47 mM pri 24 °C in iz 0,36 mM na 0,54 mM pri 37 °C. Začetne hitrosti zvišanja koncentracije znotrajcelične glukoze, določene kot zmnožek obratne vrednosti časovne konstante in amplitude eksponentne krivulje sta bili $2,7 \pm 0,44$ μ M/s in $4,49 \pm 1,26$ μ M/s pri stimulaciji z noradrenalinom pri 24 °C oz. 37° C. V hitrosti zvišanja zunajcelične koncentracije glukoze po dodatku noradrenalina pri različnih temperaturah so razlike statistično pomembne (Studentov t-test: $p < 0,001$). Slika 10H prikazuje razmerje YFP/CFP pri različnih temperaturah pred dodatkom noradrenalina. Pred dodatkom noradrenalina ni pomembnih statističnih razlik v razmerju YFP/CFP pri različnih temperaturah ($p = 0,14$).

Radotić V. Temperaturna odvisnost metabolizma glukoze v podganjih astrocitech.

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije, 2014



Slika 10: Vpliv noradrenalina na citosolno koncentracijo glukoze v astrocitech z izraženim FLII12PGLU-700 μ Δ 6 pri temperaturi 24 °C in 37 °C

se nadaljuje

Nadaljevanje slike 10

Slika 10: Vpliv noradrenalina na citosolno koncentracijo glukoze v astrocitih z izraženim FLII12PGLU-700 μ Δ 6 pri temperaturi 24 °C in 37 °C

A) Astroците smo s pomočjo superfuzijskega sistema 600s stimulirali z noradrenalinom (200 μ M), raztopljenim v 3 mM glukozi pri temperaturi 24 °C. Graf prikazuje posamezni posnetek in naraščanje razmerja FRET po dodatku noradrenalina. Rdeča krivulja prikazuje eksponentno naraščanje razmerja FRET po dodatku noradrenalina.

B) Astroците smo s pomočjo superfuzijskega sistema 600s stimulirali z noradrenalinom (200 μ M), raztopljenim v 3 mM glukozi pri temperaturi 37 °C. Graf prikazuje posamezni posnetek in naraščanje razmerja FRET po dodatku noradrenalina ter nato postopno znižanje razmerja FRET. Rdeča krivulja prikazuje eksponentno naraščanje razmerja FRET po dodatku noradrenalina do točke, ko začne razmerje upadati. Rdeča krivulja prikazuje eksponentno naraščanje razmerja FRET po dodatku noradrenalina.

C) Astroците smo s pomočjo superfuzijskega sistema 600s oblikovali s kontrolno raztopino (zunajcelična raztopina s 3 mM glukozo). Dodatek kontrolne raztopine ni povzročil statistično značilne spremembe.

D) Normirane vrednosti povprečja 8 posnetkov astrocitov po stimulaciji z noradrenalinom pri temperaturi 24 °C. Večje črne pike prikazujejo povprečje vrednosti \pm standardna napaka (SE).

E) Normirane vrednosti povprečja 8 posnetkov astrocitov po stimulaciji z noradrenalinom pri temperaturi 37 °C. Večje črne pike prikazujejo povprečje vrednosti \pm standardna napaka (SE).

F) Normirane vrednosti povprečja 8 posnetkov astrocitov po stimulaciji s kontrolno raztopino s 3 mM glukozo. Večje črne pike prikazujejo povprečje vrednosti \pm standardna napaka (SE).

G) Povprečni časovni konstanti signalov FRET s stimulacijo z noradrenalinom pri različnih temperaturah.. Pri temperaturi 24 °C je časovna konstanta znašala $147,92 \pm 23,83$ s, pri temperaturi 37 °C pa $48,55 \pm 12,83$ s. V časovnih konstantah pri različnih temperaturah so pomembne statistične razlike (Studentov t-test: $p = 0,0025$).

H) Povprečno razmerje YFP/CFP 8 posnetkov astrocitov pri temperaturi 24 °C in 37 °C pred dodatkom noradrenalina. Povprečno razmerje YFP/CFP pri temperaturi 24 °C je znašalo 4,5 pri 37 °C je znašalo povprečno razmerje YFP/CFP 5. Pred dodatkom noradrenalina ni pomembnih statističnih razlik v razmerju YFP/CFP pri različnih temperaturah ($p = 0,14$).

5 RAZPRAVA

5.1 CITOSOLNA KONCENTRACIJA GLUKOZE V ASTROCITIH JE ODVISNA OD ZUNAJCELIČNE KONCENTRACIJE GLUKOZE

V poskusih smo s pomočjo tehnike FRET in glukoznega nanosenzorja FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 določili znotrajcelično koncentracijo glukoze v astrocitih, ki so bili izpostavljeni različnim zunajceličnim koncentracijam glukoze (0 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2,5 mM; 5 mM, 7,5 mM in 10 mM glukoza; slika 8). Glukoza vstopi v možgane sesalcev s pomočjo olajšane difuzije skozi endotelij krvnih žil, ki z možgani tvorijo krvno-možgansko pregrado (Kreft in sod., 2013). Obstajajo tri poti vstopa glukoze v nevrone: 1. Glukoza lahko vstopi v astrocite in se tam preko metabolnih poti pretvori v laktat, ki se sprosti v intersticij in od tam prenese v nevrone, kot to opisuje glukozno-laktatni model transporta iz astrocitov v nevrone oziroma ANLS. 2. Glukoza lahko prečka astrocite in se sprosti v intersticij in od tam prenese v nevrone. 3. Glukoza lahko skozi bazalno lamino vstopi v intersticij, od tam pa gre neposredno v nevrone in astrocite (Kreft in sod., 2013). Različne raziskovalne skupine so potrdile, da vstop glukoze v citosol astrocitov in njen nadaljnji privzem potekata do meje nasičenosti. Pri visoki koncentraciji zunajcelične glukoze je najvišja znotrajcelična koncentracija glukoze omejena pri vrednosti 0,4 mM (Kreft in sod., 2013). Na to omejitev vpliva prepustnost membrane. Pretok glukoze preko plazmaleme prek glavnih glukoznih prenašalcev GLUT1 v astrocitih je v ravnotežju s stopnjo presnove glukoze z encimom heksokinazo (Kreft in sod., 2013). Potrjeno je, da koncentracija D-glukoza 1,6-bifosfata višja od 0,2 mM zavre heksokinazo v astrocitih v odvisnosti od koncentracije; pri vrednosti 1,2 mM je heksokinazna aktivnost skoraj popolnoma inhibirana (Kreft in sod., 2013). To se odraža v prosti nefosforilirani glukozi v citosolu, ki lahko difundira iz mesta privzema do mesta porabe glukoze v astrocitu ali pa se prenese v zunajcelični prostor (Kreft in sod., 2013). Pri našem delu z nanosenzorjem FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 na astrocitih smo ugotovili, da dodatek različnih koncentracij zunajcelične glukoze vpliva na zvišanje razmerja FRET, oziroma kaže na povišanje znotrajcelične glukoze, medtem ko je vmesno spiranje s pomočjo superfuzijskega sistema z zunajcelično raztopino brez glukoze povzročilo upadanje razmerja FRET oziroma upad znotrajcelične koncentracije glukoze.

Čas zviševanja (slika 8C, črna krivulja) se z večanjem koncentracije zunajcelične glukoze med 0 in 5 mM postopno zniža, z večanjem koncentracije zunajcelične glukoze med 5 in 10 mM pa se postopno zviša. Čas zniževanja (slika 8C, siva krivulja) se z večanjem koncentracije zunajcelične glukoze med 0 in 0,5 mM nekoliko zniža, z večanjem koncentracije zunajcelične glukoze med 0,5 in 5 mM poveča in z večanjem koncentracije zunajcelične glukoze med 5 in 10 mM se ponovno zniža. Vezavna konstanta nanosenzorja FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6, katerega območje občutljivosti je med 0,05 in 9,6 mM, je bila 0,69. Ta vezavna konstanta je nekoliko večja kot vezavna konstanta istega nanosenzorja, ki so jo določili v drugih poskusih (Prebil in sod., 2011; 0,42) in primerljiva z vezavno konstanto, ki so jo Fehr in sod. (2003) izmerili pri nanosenzorju FLIPglu-600 μ *in vitro* (0,6). Naši rezultati kažejo, da ima naš nanosenzor podobno afiniteto za vezavo glukoze kot nanosenzor FLIPglu-600 μ , vendar manjšo afiniteto za vezavo glukoze kot jo je imel enak nanosenzor, ki je bil uporabljen v predhodnih raziskavah.

Permeabilizacija plazmaleme z β -escinom (slika 8B) je omogočila zanesljivo kalibracijo nanosenzorja FRET *in situ*. Z izračunom znotrajcelične koncentracije glukoze (slika 8F) smo ugotovili, da je ta odvisna od zunajcelične koncentracije glukoze, ko je le ta nižja od 3 mM. Podoben rezultat so pokazale predhodne raziskave (Prebil in sod., 2011 ter Fehr in sod., 2003). Pri višjih koncentracijah zunajcelične glukoze je znotrajcelična koncentracija glukoze omejena pri vrednosti 0,74 mM, kar je nekoliko več kot vrednost 0,4 mM, ki so jo izmerili Prebil in sod. (2011) ter Bittner in sod. (2010). Fellows in sod. (1992) so s tehniko mikrodialize (minimalno invazivna tehnika s pomočjo katere se v zunajcelično tekočino tkiv vnesejo nevezane molekule, kot so neurotransmiterji, hormoni, glukoza) izmerili znotrajcelično koncentracijo glukoze v možganih podgane 0,47 mM (Kreft in sod., 2013; Prebil in sod., 2011). V primerih ishemijske (prekinjeno oskrbovanje možganov s krvjo) so z mikroelektrodami v možganih podgane izmerili znotrajcelično koncentracijo glukoze 0,05 mM in v primeru hipoglikemije (močno znižana koncentracija glukoze v krvi, pomanjkanje glukoze v možganih) nižjo od 0,19 mM (Kreft in sod., 2013; Prebil in sod., 2011). Po drugi je znotrajcelična koncentracija glukoze v krvni plazmi teščajih živali višja od 5 mM in se poveča z vnosom glukoze (Kreft in sod., 2013). Vrednost znotrajcelične koncentracije glukoze 0,74 mM kaže, da v astrocitih nastane dovolj glukoze za oskrbovanje sosednjih nevronov, zlasti v primeru stimulacije astrocitov z noradrenalinom. 0,74 mM glukoze je dovolj, da se ta razgradi v procesu glikolize, kjer je glavni produkt piruvat, ki se s pomočjo encima laktatna dehidrogenaza pretvori v laktat, ki se prenese do nevronov, kjer služi kot energijski substrat. Toliko znotrajcelične glukoze tudi zadostuje za energijsko oskrbo nevronov po stimulaciji z noradrenalinom, kjer se glikogen razgradi do glukoze-6-fosfata, ta pa do piruvata, ki se s pomočjo encima laktatna dehidrogenaza pretvori v laktat, ki se prenese do nevronov in služi kot vir energije. Vrednost znotrajcelične glukoze (0,74 mM) je podobna kot vrednost vezavne konstante nanosenzorja (0,69), zato lahko z metodo FRET zanesljivo merimo dinamične spremembe znotrajcelične glukoze v astrocitih.

5.2 TEMPERATURA VPLIVA NA KINETIKO PRIVZEMA GLUKOZE TER NA KOLIČINO ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE GLUKOZE

Različne raziskovalne skupine so preučevale dinamiko glukoze v astrocitih večinoma pri sobni temperaturi (22 °C-25 °C). John in sod. (2008) so celice C2C12 (celična linija mišjih mioblastov) izpostavili temperaturi 35 °C. Ugotovili so, da se z naraščanjem temperature zviša tudi znotrajcelična koncentracija glukoze, stopnja privzema glukoze in hitrost porabe glukoze (angl. »clearance«) pa ostaneta skoraj nespremenjena (John in sod., 2008). To kaže, da je pri teh celicah porast koncentracije glukoze posledica glukoneogeneze (John in sod., 2008). Mi smo želeli preučiti dinamiko glukoze v astrocitih pri temperaturi 37 °C ter rezultate primerjati z rezultati, ki smo jih dobili pri sobni temperaturi (22-25 °C). Ugotovili smo, da je pri temperaturi 37 °C razmerje FRET v stacionarnih razmerah višje kot pri sobni temperaturi, kar kaže na povečanje znotrajcelične koncentracije glukoze (slika 9A, B). Izračun znotrajcelične glukoze pri 24 ° in 37 °C kaže, da se znotrajcelična koncentracija glukoze pri višji temperaturi po daljši izpostavitvi zunajcelični raztopini z 10 mM glukozo zmanjša. Izračunana znotrajcelična koncentracija glukoze (1.cikel obliivanja z 10 mM glukozo) pri 24 °C znaša 2,32 mM in pri 37 °C 1,77 mM, kar pomeni, da ni statistično pomembnih razlik (Studentov t-test: $p = 0,33$). V 5.ciklu obliivanja celic z 10 mM glukozo znaša izračunana znotrajcelična koncentracija glukoze pri 24 °C 1,58 mM in pri 37 °C 0,24 mM, kar kaže, da so razlike statistično pomembne (Studentov t-test: $p = 0,04$). Pri višji temperaturi je amplituda statistično značilno manjša ($p < 0,001$, slika 9D, E). Povprečna amplituda pri 24 °C je znašala 1,97 arbitrarnih enot in pri 37 °C 1,09 arbitrarnih enot. Manjša amplituda kaže, da je potrebno manj časa, da se odvije določen proces v celici. V našem primeru je potekal proces glikolize v citosolu astrocita do dveh molekul piruvata pri različnih temperaturah. Statistično značilno zmanjšanje amplitude pri višji temperaturi kaže, da je metabolizem glukoze v astrocitih hitrejši, saj je aktivnost encimov glikolize pri 37 °C višja. Pri nižji temperaturi so encimi nekoliko počasnejši, zato je upočasnjena tudi glikoliza. Pri višji temperaturi se hitrost porabe citosolne glukoze v procesu glikolize in sinteze glikogena poveča, zato se tudi zmanjša koncentracija znotrajcelične glukoze po daljši izpostavitvi višji temperaturi. Izračunali smo časovne konstante (slika 9G), ki pri različnih temperaturah niso bile statistično značilno različne (Studentov t-test: $p = 0,14$). Povprečna časovna konstanta pri temperaturi 24 °C je bila 18,24s in pri 37 °C 27s. Pri višji temperaturi smo izmerili tudi nekoliko višji čas zviševanja in čas zniževanja, vendar razlike niso bile značilno različne ($p = 0,06$ za čas zviševanja in $p = 0,26$ za čas zniževanja, slika 9C, F).

5.3 NORADRENALIN VPLIVA NA KONCENTRACIJO GLUKOZE V CITOSOLU PRI TEMPERATURI 24 °C IN 37 °C

Nevrotransmitorji kot je noradrenalin lahko povzročijo razgradnjo glikogena v astrocitih (Prebil in sod., 2011, Sorg in Magistretti, 1991). Glikogen je v možganih samo v astrocitih in pomembno sodeluje pri normalnem možganskem metabolizmu. Glikogenski obvod predstavlja frakcijo presnovljene glukoze, ki je vezana v glikogenskih molekulah in vstopa v pot glikolize ter lahko znaša kar 40 % celotnega metabolizma glukoze (Kreft in sod., 2013). V razmerah hipoksije, ki je povezana z zmanjšanim pretokom krvi ter tako tudi zmanjšanim privzemom glukoze v astrocitih, nastane glukoza-1-fosfat v procesu glikogenolize (Kreft in sod., 2013). V možganih v delu *Locus coeruleus* so noradrenergični nevroni, ki oživčujejo skoraj celotno možgansko skorjo (Kreft in sod., 2013). Predhodne raziskave so pokazale, da se v astrocitih poviša znotrajcelična koncentracija glukoze po stimulaciji z noradrenalinom oziroma poteka glikogenoliza. To so dokazali s pomočjo zaviralca glikogen fosforilaze (Kreft in sod., 2013).

V astrocitih so dokazali tudi encime glukoneogeneze, kot so piruvat karboksilaza, fosfoenolpiruvat karboksikinaza in fruktoza-1,6-bifosfataza, kar lahko nakazuje na to, da imajo astroцитi zmožnost resinteze glukoze iz laktata ali aminokislin. Vlogo astrocitov v procesu izrabe glukoze je potrebno še raziskati (Kreft in sod., 2013).

Naši rezultati kažejo, da noradrenalin poveča koncentracijo citosolne glukoze v astrocitih tako pri temperaturi 24 °C kot pri temperaturi 37 °C, vendar zvišanje znotrajcelične koncentracije glukoze pri 37 °C ni statistično značilno večje od zvišanja znotrajcelične koncentracije glukoze pri 24 °C (Studentov t-test. $p = 0,89$). Povprečno povečanje citosolne glukoze pri 24 °C je bilo 43,75 % (iz 0,26 mM na 0,47 mM), pri 37 °C pa 50 % (iz 0,36 mM na 0,54 mM). Časovna konstanta zvišanja citosolne glukoze pri 24 °C je bila $147,92 \pm 23,83$ s in pri 37 °C $47,01 \pm 10,81$ s (slika 10G). V časovnih konstantah so razlike statistično značilne (Studentov t-test: $p = 0,002$). Manjša časovna konstanta pri višji temperaturi kaže, da je hitrost povečane dostopnosti citosolne glukoze sprva večja kot pri sobni temperaturi. Slika 10H prikazuje razmerje FRET pred dodatkom noradrenalina pri različnih temperaturah. Ugotovili smo, da pred dodatkom noradrenalina ni pomembnih statističnih razlik v razmerju YFP/CFP pri različnih temperaturah ($p = 0,14$), kar kaže na to, da so naši rezultati odraz povečane aktivnosti noradrenalina pri višji temperaturi.

Pri višji temperaturi je začetno povečanje znotrajcelične koncentracije glukoze hitrejše, kar kaže tudi izračun hitrosti zvišanja koncentracije znotrajcelične glukoze, določen kot zmnožek obratne vrednosti časovne konstante in amplitude eksponentne krivulje ($2,7 \pm 0,44 \mu\text{M/s}$ za $24 \text{ }^\circ\text{C}$ in $4,49 \pm 1,26 \mu\text{M/s}$ pri stimulaciji z noradrenalinom pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$), ki je statistično pomembno različno (Studentov t-test: $p < 0,001$). Noradrenalin sproži razgradnjo glikogena v astrocitih-glikogenolizo, zato se poveča znotrajcelična koncentracija glukoze. Pri višji temperaturi je glikogenoliza hitrejša, saj je večja hitrost spremembe koncentracije citosolne glukoze statistično značilna. Glikogenoliza je pri višji temperaturi sprva hitrejša od glikolize, ki pa verjetno po 600s pri višji temperaturi začne prevladovati in koncentracija glukoze začne upadati.

6 SKLEPI

Cilj magistrske naloge je bil z uporabo glukoznega nanosenzorja FRET FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 izmeriti razmerje fluorescenc YFP/CFP, medtem ko smo astrocite izpostavili različnim zunajceličnim koncentracijam glukoze (0; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 in 10 mM glukoza). Raziskave dinamike citosolne koncentracije glukoze v astrocitih so bile doslej izvedene pri sobni temperaturi (22-25 °C), zato smo želeli ugotoviti kako se citosolna koncentracija glukoze v astrocitih pri temperaturi 37°C odziva na spremembe v zunajcelični koncentraciji glukoze. Poleg tega smo želeli preučiti tudi vpliv neurotransmitorja noradrenalina na dinamiko citosolne glukoze v astrocitu pri temperaturi 22-25 °C in 37 °C.

Rezultate magistrske naloge smo strnili v nekaj sklepov:

- Z naraščajočimi koncentracijami zunajcelične glukoze se je po naših pričakovanjih povečalo tudi razmerje YFP/CFP.
- Naraščajoče spremembe razmerja YFP/CFP pri naraščajočih izmeničnih spremembah zunajcelične koncentracije glukoze kažejo na naraščanje citosolne koncentracije glukoze, kar smo uporabili tudi kot umeritveno krivuljo senzorja.
- Hitrost spremembe razmerja YFP/CFP po dodatku raztopine z visoko koncentracijo zunajcelične glukoze ni odvisna od temperature.
- Pri višji temperaturi je hitrost porabe citosolne glukoze večja, zato je sprememba koncentracije znotrajcelične glukoze manjša. .
- Noradrenalin sproži glikogenolizo-razgradnjo glikogena v astrocitih, zato se poveča znotrajcelična koncentracija glukoze.
- Noradrenalin poveča koncentracijo znotrajcelične glukoze tako pri višji kot pri nižji temperaturi, vendar je zvišanje pri višji temperaturi hitrejše.

7 POVZETEK

Astrociti so v možganih sesalcev v večjem številu kot nevroni ter so prepoznavni po zvezdasti obliki. So celice glije, ki se zaradi lege v možganih povezujejo tako z nevroni kot s celicami endotelija krvnih žil ter pomembno prispevajo k izmenjavi metabolitov med kapilarami in živčnimi končiči. Poleg številnih vlog astrocitov je pomembna njihova vloga v energijskem metabolizmu možganov. Glukoza je glavni energijski substrat možganov, poleg tega pa možgani presnavljajo tudi druge metabolne substrate kot so laktat, glutamat in glikogen.

V sklopu naše raziskave smo uporabili glukozni nanosenzor FRET FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 za merjenje razmerja fluorescenc YFP/CFP, medtem ko smo astrocite izpostavili različnim zunajceličnim koncentracijam glukoze. Poleg tega smo želeli preučiti dinamiko citosolne glukoze v astrocitu, potem ko smo astrocite izpostavili različnim zunajceličnim raztopinam glukoze (0 in 10 mM glukoza) segretim na 37 °C. Raziskali smo tudi, kakšen učinek ima neurotransmitor noradrenalin na presnovo glukoze v astrocitu tako pri sobni temperaturi (22-25 °C) kot pri 37 °C.

V raziskavi smo preverili tri glavne hipoteze. Predpostavili smo, da lahko umeritveno krivuljo glukoznega nanosenzorja FRET FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6 uporabimo za preračun koncentracije glukoze iz razmerja fluorescenc YFP/CFP ter da se bo pri višji temperaturi (37 °C) po dodatku raztopine z visoko zunajcelično koncentracijo glukoze, koncentracija glukoze v citosolu spreminjala z drugačno dinamiko kot pri nižji temperaturi (npr. 22-25 °C). Predvidevali smo, da stimulacija astrocitov z noradrenalinom pri telesni temperaturi povzroči hitrejšo spremembo znotrajcelične koncentracije glukoze, kot stimulacija pri sobni temperaturi.

Poskuse smo izvedli na primarni kulturi astrocitov. V prvem delu smo astrocite, ki so izražali glukozni nanosenzor FRET FLII12PGLU-700 $\mu\Delta$ 6, vnešeni z metodo lipofekcije, s pomočjo superfuzijskega sistema obličali z naraščajočimi koncentracijami zunajcelične glukoze (0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 mM glukoza) in jih vmes spirali z zunajcelično raztopino brez glukoze (0 mM glukoza). V drugem delu poskusov smo s pomočjo superfuzijskega sistema astrocitom izmenično dovajali segreti (37 °C) zunajcelični raztopini z 10 mM glukozo in zunajcelično raztopino brez glukoze (0 mM glukoza). V tretjem delu poskusov smo astrocite s pomočjo superfuzijskega sistema 600s obličali z zunajcelično raztopino s 3 mM glukozo v kateri je bil raztopljen 200 μ M noradrenalin ter z zunajcelično raztopino s 3 mM glukozo, segreto na 37 °C, v kateri je bil raztopljen 200 μ M noradrenalin.

Fluorescenco YFP in CFP smo pri vseh poskusih zajemali na celotni celici na fluorescenčnem mikroskopu v 10s časovnih intervalih, nato pa smo izračunali razmerje FRET (YFP/CFP).

Rezultate smo statistično obdelali, določili amplitudo, čas zviševanja in čas zniževanja ter na koncu izračunali znotrajcelično koncentracijo glukoze v astrocitih v različnih poskusih.

Naši rezultati kažejo, da se ob dovajanju naraščajočih koncentracij glukoze zunajceličnih raztopin poveča amplituda razmerja FRET glukoznega nanosenzorja, kar pomeni, da se poveča tudi citosolna koncentracija glukoze v astrocitu. Vmesno spiranje z zunajcelično raztopino brez glukoze se na sliki kaže kot vračanje signala FRET na začetno vrednost (slika 8A). Nanosenzor smo s pomočjo β -escina uspešno kalibrirali (slika 8B). Krivulja odvisnosti razmerja FRET od zunajcelične koncentracije glukoze (slika 8E, rdeča krivulja-permeabilizirane celice, siva krivulja-nepermeabilizirane celice) določa ΔR_{\max} – največjo spremembo razmerja FRET, ki pomeni mejo nasičenosti nanosenzorja ($\Delta R_{\max} = 2,07$ za nepermeabilizirane celice in $\Delta R_{\max} = 2,94$ za permeabilizirane celice). S prileganjem krivulje smo določili tudi vezavno konstanto nanosenzorja K_d , ki je znašala 0,69 mM. S pomočjo normaliziranih sprememb razmerij FRET smo izračunali znotrajcelično koncentracijo glukoze-[glc]_i (slika 8F). Za drugi del poskusov slika 9A prikazuje spremembe razmerja FRET po dodatku 10 mM glukoze pri temperaturi 24 °C. Slika 9B prikazuje spremembe razmerja FRET po dodatku 10 mM glukoze pri temperaturi 37 °C. Ugotovili smo, da se pri višji temperaturi poveča hitrost porabe citosolne glukoze, saj se glukoza hitreje razgrajuje (hitrejša glikoliza), zato je pri višji temperaturi manjši porast znotrajcelične koncentracije glukoze.

V tretjem delu poskusov smo ugotovili, da je stimulacija z noradrenalinom povzročila značilno zvišanje razmerja FRET, kar pomeni, da se je povečala citosolna koncentracija glukoze. Izmerili smo povprečno 17,90 % povišanje razmerja FRET 600s po dodatku noradrenalina. Potem ko smo astrocite obličali z zunajcelično raztopino s 3 mM glukozo, segreto na 37 °C, v kateri je bil raztopljen 200 μ M noradrenalin (slika 10B) smo ugotovili, da je stimulacija povzročila značilno zvišanje razmerja FRET, nato pa postopno upadanje razmerja FRET. Izmerili smo povprečno 14,60 % zvišanje razmerja FRET. Ugotovili smo, da stimulacija astrocitov z noradrenalinom pri višji temperaturi poveča hitrost porasta citosolne koncentracije glukoze, kot pri nižji temperaturi. Razlika je bila statistično značilna. Glikogenoliza je pri višji temperaturi sprva hitrejša kot glikoliza. V raziskavi smo potrdili vse tri delovne hipoteze.

8 VIRI

- Alle, H., A. Roth, J. R. Geiger. 2009. Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science*, 325: 1405-1408
- Arluison, M., M. Quignon, P. Nguyen, B. Thorens, C. Leloup, L. Penicaud. 2004. Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28: 117-136
- Attwell, D., S. B. Laughlin. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21: 1133-1145
- Berg, J., Y. P. Hung, G. Yellen. 2009. A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Natural Methods*, 6: 161-166
- Bittner, C. X., A. Loaliza, I. Ruminot, V. Larenas, T. Sotelo-Hitschfeld, R. Gutiérrez, A. Córdova, R. Valdebenito, W. B. Frommer, L. F. Barros. 2010. High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front Neuroenergetics*, 2, 1-26
- Bouzier-Sore, A. K., M. Merle, P. J. Magistretti, L. Pellerin 2002. Feeding active neurons: (re)emergence of a nursing role for astrocytes. *Journal of Physiology-Paris*, 96: 273-282
- Bouzier-Sore, A. K., P. Voisin, V. Bouchaud, E. Bezancon, J. M. Franconi, L. Pellerin. 2006. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *European Journal of Neuroscience*, 24: 1687-1694
- Brown, A. M., B. R. Ransom. 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55: 1263-1271
- Brown, A. M., R. Wender, B. R. Ransom. 2001. Metabolic substrates other than glucose support axon function in central white matter. *Journal of Neuroscience Research*, 66: 839-843
- Bélangier, M., I. Allaman, P. J. Magistretti. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, 14: 724-738
- Bélangier, M., P. J. Magistretti. 2009. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 11: 281-295
- Dienel, G. A., N. F. Cruz. 2006. Astrocyte activation in working brain: energy supplied by minor substrates. *Neurochemistry International Journal*, 48: 586-595

-
- Dringen, R., B. Hamprecht. 1993. Differences in glycogen metabolism in astroglia-rich primary cultures and sorbitol-selected astroglial cultures derived from mouse brain. *Glia*, 8: 143-149.
- Fehr, M., S. Lalonde, D. Ehrhardt, W. Frommer. 2004. Live imaging of glucose homeostasis in nuclei of COS-7 cells. *Journal of Fluorescence*, 14: 603-609
- Fehr, M., S. Lalonde, I. Lager, M. W. Wolff, W. B. Frommer. 2003. In vivo imaging of the dynamics of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 19127-19133
- Fray, A. E., R. J. Forsyth, M. G. Boutelle, M. Fillenz. 1996. The mechanisms controlling physiologically stimulated changes in rat brain glucose and lactate: a microdialysis study. *Journal of Physiology*, 496: 49-57
- Gibbs, M. E., D. Hutchinson, L. Hertz. 2008. Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32: 927-944
- Herrero-Mendez, A., A. Almeida, E. Fernández, C. Maestre, S. Moncada, J. P. Bolaños. 2009. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature Cell Biology*, 11: 747-752
- Hertz, L., L. Peng, G. A. Dienel. 2007. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27: 219-249
- Hou, B. H., H. Takanaga, G. Grossmann, L. Q. Chen, X. Q. Qu, A. M. Jones, S. Lalonde, O. Schweissgut, W. Wiechert, W. B. Frommer. 2011. Optical sensors for monitoring dynamic changes of intracellular metabolite levels in mammalian cells. *Nature Protocols*, 6: 1818-1833
- Huang, Y. H., D. E. Bergles. 2004. Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Current Opinion in Neurobiology*, 14: 346-352
- Hung, Y. P., J. G. Albeck, M. Tantama, G. Yellen. 2011. Imaging cytosolic NADH-NAD(+) redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metabolism*, 14: 545-554
- Imamura, H., K. P. Nhat, H. Togawa, K. Saito, R. Iino, Y. Kato-Yamada, T. Nagai, H. Noji. 2009. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *PNAS*, 6: 15651-1566

- Itoh, Y., T. Esaki, K. Shimoji, M. Cook, M. J. Law, E. Kaufman, L. Sokoloff. 2003. Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo: PNAS, 100: 4879-1884
- John, S. A., M. Ottolia, J. N. Weiss, B. Ribalet. 2008. Dynamic modulation of intracellular glucose imaged in single cells using a FRET-based glucose nanosensor. Pflügers Archiv, 456: 307-322
- Kong, J., P. N. Shepel, C. P. Holden, M. Mackiewicz, A. I. Pack, J. D. Geiger. 2002. Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. Journal of Neuroscience, 22: 5581-5587
- Kreft, M., L. K. Bak, H. S. Waagepetersen, A. Schousboe. 2012. Aspects of astrocyte energy metabolism, amino acid neurotransmitter homeostasis and metabolic compartmentation. ASN Neuro, 4, 3: 187-199.
- Kreft, M., M. Lukšič, T. M. Zorec, M. Prebil, R. Zorec. 2013. Diffusion of D-glucose measured in the cytosol of a single astrocyte. Cellular and Molecular Life Sciences, 70: 1483-1492
- Leino, R. L., D. Z. Gerhart, A. M. van Bueren, A. L. McCall, L. R. Drewes. 1997. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. Journal of Neuroscience Research, 49: 617-626
- Leloup, C., M. Arluison, N. Lepetit, N. Cartier, P. Marfaing-Jallat, P. Ferré, L. Pénicaud. 1994. Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. Brain Research, 638: 221-226
- Levin, B. E., C. Mangan, A. Dunn-Meynell, C. Le Foll. 2011. Metabolic sensing and the brain: who, what, where and how? Endocrinology, 152: 2552-2557
- Lovatt, D., U. Sonnewald, H. S. Waagepetersen, A. Schousboe, W. He, J. H. Lin, X. Han, T. Takano, S. Wang, F. J. Sim, S. A. Goldman, M. Nedergaard. 2007. The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. Journal of Neuroscience, 27: 12255-12266
- Magistretti, P. J. 1988. Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system. Diabetes & Metabolism, 14: 237-246
- Magistretti, P. J. 2000. Cellular bases of functional brain imaging: insights from neuron-glia metabolic coupling. Brain Research, 886: 108-112
- Maher, F., S. J. Vannucci, I. A. Simpson. 1994. Glucose transporter proteins in brain. FASEB Journal, 8: 1003-1011

- Matthias, K., F. Kirchhoff, G. Seifert, K. Hüttmann, M. Matyash, H. Kettenmann, C. Steinhäuser. 2003. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 23: 1750-1758
- Nehlig, A. 2004. Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70: 265-275
- Obel, L. F., K. M. Andersen, L. K. Bak, A. Schousboe, H. S. Waagepetersen. 2012. Effects of adrenergic agents on intracellular Ca²⁺ homeostasis and metabolism of glucose in astrocytes with an emphasis on pyruvate carboxylation, oxidative decarboxylation and recycling: implications for glutamate neurotransmission and excitotoxicity. *Neurotoxicity Research*, 21: 405-417
- Pellerin, L., A. K. Bouzier-Sore, A. Aubert, S. Serres, M. Merle, R. Costalat, P. J. Magistretti. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*, 55: 1251-1262
- Pellerin, L., P. J. Magistretti. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *PNAS*, 91: 10625-10629
- Peuchen, S., M. R. Duchon, J. B. Clark. 1996. Energy metabolism of adult astrocytes in vitro. *Neuroscience*, 71: 855-870
- Prebil, M., H. H. Chowdhury, R. Zorec, M. Kreft. 2011a. Changes in cytosolic glucose level in ATP stimulated live astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 405: 308-313
- Prebil, M., N. Vardjan, J. Jensen, R. Zorec, M. Kreft. 2011b. Dynamic monitoring of cytosolic glucose in single astrocytes. *Glia*, 59: 903-913
- Schwartz, J., D. Wilson. 1992. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum and striatum. *Glia*, 5: 75-80
- Serres, S., E. Bezancon, J. M. Franconi, M. Merle. 2005. Ex vivo NMR study of lactate metabolism in rat brain under various depressed states. *Journal of Neuroscience Research*, 79: 19-25
- Sorg, O., P. J. Magistretti. 1992. Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition. *Journal of Neuroscience*, 12: 4923-4931
- Subbarao, K. V., L. Hertz. 1990. Effect of adrenergic agonists on glycogenolysis in primary cultures of astrocytes. *Brain Research*, 536: 220-226

- Takanaga, H., B. Chaudhuri, W. B. Frommer. 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
- Van Hall, G., M. Strømstad, P. Rasmussen, O. Jans, M. Zaar, C. Gam, B. Quistorff, N. H. Secher, H. B. Nielsen. 2009. Blood lactate is an important energy source for the human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 29: 1121-1129
- Volterra, A., J. Meldolesi. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, 6: 626-640
- Walls, A. B., C. M. Heimbürger, S. D. Bouman, A. Schousboe, H. S. Waagepetersen. 2009. Robust glycogen shunt activity in astrocytes: Effects of glutamatergic and adrenergic agents. *Neuroscience*, 158: 284-292
- Wender, R., A. M. Brown, R. Fern, R. A. Swanson, K. Farrell, B. R. Ransom. 2000. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *Journal of Neuroscience*, 20: 6804-6810
- Wiesinger, H., B. Hamprecht, R. Dringen. 1997. Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia*, 21: 22-34
- Zauner, A., W. P. Daugherty, M. R. Bullock, D. S. Warner. 2002. Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery*, 51: 289-301
- Zhao, F. Q., A. F. Keating. 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current Genomics*, 8: 113-128
- Zielke, H. R., C. L. Zielke, P. J. Baab. 2009. Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review. *Journal of Neurochemistry*, 109: 124-29

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Marku Kreftu za mentorstvo, usmerjanje, pomoč pri pisanju magistrskega dela in njegovo dostopnost. Zahvaljujem se tudi somentorju akad. prof. dr. Robertu Zorcu, vodji raziskovalne skupine. Za pomoč pri delu v laboratoriju in uvajanju v raziskovalno delo se zahvaljujem dr. Mateji Prebil ter sodelavcu Marku Muhiču. Hvala tudi ekipi Inštituta za patološko fiziologijo za pomoč v laboratoriju in uporabne nasvete.

Zahvaljujem se svoji družini in prijateljem, ki so mi stali ob strani v času nastajanja magistrskega dela. Še posebej hvala partnerju Deanu za izjemno pomoč in podporo v težkih in napornih trenutkih.