

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Dorian DOLANC

**MERITVE CITOSOLNE KONCENTRACIJE CAMP
IN L-LAKTATA V PODGANJIH ASTROCITIH IN
CELICAH 3T3 V KULTURI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2022

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Dorian DOLANC

**MERITVE CITOSOLNE KONCENTRACIJE CAMP
IN L-LAKTATA V PODGANJIH ASTROCITIH IN CELICAH 3T3 V
KULTURI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**MEASUREMENTS OF CYTOSOLIC CONCENTRATION OF CAMP AND L-
LACTATE IN CULTURED RAT ASTROCYTES AND 3T3 CELLS**

DOCTORAL DISERTATION

Ljubljana, 2022

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 4.2.2020 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje Znanosti o celici. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Robert Zorec. Za somentorico je bila imenovana izr. prof. dr. Helena H. Chowdhury. Poskuse za doktorsko disertacijo sem opravljal na Inštitutu za patološko fiziologijo, Zaloška 4, 1000 Ljubljana, v Laboratoriju za nevroendokrinologijo-molekularna celična fiziologija in v prostorih Celica, biomedicinski center d.o.o., Tehnološki park 24, 1000 Ljubljana.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter VERANIČ

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Član: prof. dr. Toni PETAN

Inštitut "Jožef Stefan", Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti

Datum zagovora:

Dorian Dolanc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dd
DK	577(043.3)
KG	Astrociti, celice 3T3, Laktat, cAMP, GPCR, GPR27, FRET
AV	DOLANC, Dorian, magister mikrobiologije
SA	ZOREC, Robert (mentor), CHOWDHURY H., Helena (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje Znanost o celici
LI	2022
IN	MERITVE CITOSOLNE KONCENTRACIJE CAMP IN L-LAKTATA V PODGANJIH ASTROCITIH IN CELICAH 3T3 V KULTURI
TD	Doktorska disertacija
OP	XI, 90 str., 8 pregl., 22 sl., 87 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Z G-proteini sklopljeni receptorji (GPCR) so transmembranski proteini med katere spada več kot 800 receptorjev. Pri ljudeh je ena tretjina le-teh tarča odobrenih zdravil. V tem delu smo raziskali GPRB, GPCR sirota, ki spada v družino super ohranjenih receptorjev, izraženih v možganih, z neznano funkcijo. Citosolne ravni L-laktata, končnega produkta aerobne glikolize, smo merili z nanosenzorjem Laconic, ki temelji na metodi FRET. V posameznih embrionalnih celicah divjega tipa (WT) 3T3 je uporaba agonistov Smart009 in Smart075, ter molekule 8535 (1 μM), nadomestnega agonista, za katerega je znano, da aktivira GPRB, povzročila povečanje koncentracije L-laktata. Podobno povečanje je bilo zabeleženo v primarnih astrociti podgan, nevroglialnih celic, ki vsebujejo glikogen in izražajo encime aerobne glikolize. Pri celicah 3T3, ki niso izražale GPRB (3T3KOB), je bilo povečanje L-laktata, ki ga povzročata agonista Smart009 in 8535, zmanjšano v primerjavi s kontrolami WT. V celicah 3T3KOB smo povečanje L-laktata po stimulaciji ponovno vzpostavili s pomočjo plazmida, ki nosi GPRB. Ti rezultati kažejo, da stimulacija GPR27 poveča aerobno glikolizo in proizvodnjo L-laktata v celicah 3T3 in astrociti. Spremljali smo tudi podcelično dinamiko L-laktata in cAMP in ugotovili, da stimulacija z agonisti za GPCR izzove prostorsko heterogene spremembe v znotrajcelični porazdelitvi L-laktata in cAMP.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dd

DC 577(043.3)

CX Astrocytes, 3T3 cells, Lactate, cAMP, GPCR, GPR27, FRET

AU DOLANC, Dorian, master of microbiology

AA ZOREC, Robert (supervisor), CHOWDHURY H., Helena (co-advisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific field Cell Sciences

PY 2022

TI MEASUREMENTS OF CYTOSOLIC CONCENTRATION OF CAMP AND L-LACTATE IN CULTURED RAT ASTROCYTES AND 3T3 CELLS

DT Doctoral disertation

NO XI, 90 p., 8 tab., 22 fig., 87 ref.

LA sl

AL sl/en

AB G-protein coupled receptors (GPCRs) are transmembrane proteins that include more than 800 receptors. One third of these are the target of approved drugs in humans. In this work, we investigated GPRB, an orphan GPCR belonging to a family of super-preserved receptors expressed in the brain with unknown function. The cytosolic levels of L-lactate, the end product of aerobic glycolysis, were measured with a Laconic nanosensor based on the FRET method. In individual wild-type (WT) 3T3 embryonic cells, the use of the agonists Smart009 and Smart075, and molecule 8535 (1 μ M), a replacement agonist known to activate GPRB, resulted in an increase in L-lactate concentration. A similar increase was observed in primary rat astrocytes, glycogen-containing neuroglial cells expressing aerobic glycolysis enzymes. In 3T3 cells that did not express GPRB (3T3KOB), the increase in [lactate]_i caused by the Smart009 and 8535i agonists was reduced compared to WT controls. In 3T3KOB cells, the increase in L-lactate was restored after stimulation with a GPRB-expressing plasmid. These results suggest that GPR27 stimulation increases aerobic glycolysis and L-lactate production in 3T3 cells and astrocytes. We also monitored the subcellular dynamics of L-lactate and cAMP and found that stimulation with GPCR agonists induces spatially heterogeneous changes in the intracellular distribution of L-lactate and cAMP.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 cAMP	3
2.2 L-LAKTAT	4
2.3 GPCR	5
2.3.1 G-proteini, ki vplivajo na nastajanje cAMP	6
2.3.2 Laktatni receptor GPR81	6
2.4 NANOSENZORJI FRET	7
2.4.1 Nanosenzor FRET Epac1-camps	8
2.4.2 Nanosenzor FRET Laconic	8
3 MATERIAL IN METODE	9
3.1 MATERIAL	9
3.1.1 Hranilni medij	9
3.1.2 Lipofekcijski medij	9
3.1.3 Zunajcelične raztopine.....	9
3.1.4 Raztopina ligandov Smart075, Smart009 in agonista 8535/8535n	9
3.1.5 Fosfatni pufer z NaCl (PBS).....	10
3.1.6 Raztopina za spiranje celic pri imunohistokemiji.....	10
3.2 METODE	10
3.2.1 Priprava krovnih stekelc za nasajanje astrocitov in celic 3T3.....	10
3.2.2 Priprava in nasajanje celic 3T3	10
3.2.3 Nasaditev podganih astrocitov na krovna stekelca premazana s poli-L-lizinom	10
3.2.4 Namnožitev in izolacija plazmidne DNA FRET-nanosenzorjev in GPR27-FLAG ..	11
3.2.5 Transfekcija celične kulture podganih astrocitov s plazmidno DNA z zapisom za FRET-nanosenzorje in za GPR27-FLAG	11
3.2.6 Meritve [cAMP]_i in [L-laktat]_i v posamezni celici z metodo FRET ter analiza	12

3.2.7	Protokol stimulacije celic z agonisti in merjenje sprememb citoplazemske koncentracije cAMP in L-laktata	12
3.2.8	Imunocitokemija	13
3.2.9	Analiza posnetkov porazdelitve [cAMP]_i ali [L-laktat]_i	13
3.2.10	Analiza meritev spremembe [L-laktata]_i v celicah 3T3 po stimulaciji z agonisti	14
3.2.11	Statistična analiza	15
3.2.12	Bioinformatična analiza	16
3.2.13	Transkriptom astrocitov	16
3.2.14	Primerjava sekvenc RNA astrocitov divjega tipa in astrocitov z izbitim genom za GPR81	16
3.2.15	Evklidska razdalja podatkov vezavne energije agonistov GPR81	16
4	REZULTATI	18
4.1	RAZMERJE SIGNALA FRET JE NEODVISNO OD KOLIČINE NANOSENZORJA FRET V CITOSOLU	18
4.2	PODCELIČNA HETEROGENOST PORAZDELITVE [cAMP] _i V ASTROCITIH IN CELICAH 3T3	25
4.3	PODCELIČNA HETEROGENOST PORAZDELITVE KONCENTRACIJE L-LAKTATA ([L-LAKTAT] _i) V ASTROCITIH IN CELICAH 3T3	28
4.4	RAZLIKE V ČASOVNO-ODVISNIH SPREMEMBAH CITOSOLNE KONCENTRACIJE L-LAKTATA ([L-LAKTAT] _i) V CELICAH 3T3, POVZROČENE Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI MOLEKUL SMART075 ALI SMART009	30
4.5	PRIMERJAVA DOZNE ODVISNOSTI SPREMEMB CITOSOLNE KONCENTRACIJE L-LAKTATA ([L-LAKTAT] _i) PO STIMULACIJI S SMART075 ALI SMART009 V CELICAH 3T3WT	32
4.6	KANDIDATI GPCR IN PREGLED ODZIVOV CELIC 3T3KO NA STIMULACIJO S SMART075 ALI SMART009	33
4.7	PRIMERJAVA SPREMEMB CITOSOLNE KONCENTRACIJE L-LAKTATA ([L-LAKTAT] _i) PO STIMULACIJI S 5, 10 IN 50 μM SMART009 NA CELICAH 3T3WT IN TREH RAZLIČNIH KLONIH CELIC 3T3KOB	34
4.8	DODATNA NEODVISNA POTRDITEV VLOGE GPRB PRI URAVNAVANJU SPREMEMB [L-LAKTAT] _i	35
5	RAZPRAVA	41
5.1	PORAZDELITEV [cAMP] _i V ODVISNOSTI OD ODDALJENOSTI OD JEDRA PROTI CELIČNEM OBROBJU	41
5.2	PORAZDELITEV [L-LAKTAT] _i V ODVISNOSTI OD ODDALJENOSTI OD JEDRA PROTI CELIČNEM OBROBJU	42
5.3	ISKANJE NOVEGA RECEPTORJA	43

5.4	SPREMEMBE V [L-LAKTAT] _i , KI JIH POVZROČIJO AGONISTI V CELICAH 3T3KO	44
5.5	PONOVNA VZPOSTAVITEV ODZIVNOSTI V [L-LAKTAT] _i CELIC 3T3KOB, POSREDOVANO Z GPRB, S TRANSFEKCIJO PLAZMIDA GPRB-FLAG.....	44
6	SKLEPI	46
7	POVZETEK	47
8	SUMMARY	51
9	VIRI.....	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz GPCR ob vezavi agonista (Li in sod., 2002).	6
Slika 2: Shematski model nanosenzorja FRET.....	8
Slika 3: Učinek stimulacije celic 3T3 z 8535, agonistom GPR27, na [L-laktat] _i	15
Slika 4: Korelacija med količino fluoroforjev in razmerjem intenzitete fluorescence kanalov CFP in YFP, v astrocitih.	19
Slika 5: Korelacija med količino fluoroforjev in razmerjem intenzitete fluorescence kanalov CFP in YFP, v celicah 3T3.	21
Slika 6: Korelacija med količino fluoroforjev in razmerjem kanalov mTFP in Venus, v astrocitih.	23
Slika 7: Korelacija med količino fluoroforjev in razmerjem kanalov mTFP in Venus, v celicah 3T3.....	24
Slika 8: Analiza majhnih regij cAMP zanimanja v astrocitu.....	26
Slika 9: Analiza majhnih regij cAMP zanimanja v celici 3T3.	27
Slika 10: Podcelična heterogenost cAMP v astrocitih in celicah 3T3.	28
Slika 11: Analiza majhnih krožnih regij zanimanja (premer 2 µm) v astrocitu.	28
Slika 12: Analiza majhnih krožnih regij zanimanja (premer 2µm) v celicah 3T3.	29
Slika 13: Podcelična heterogenost koncentracije L-laktata ([L-laktat] _i) v astrocitih in celicah 3T3.....	30
Slika 14: Časovno-odvisne spremembe znotrajcelilčne koncentracije L-laktata ([L-laktat] _i) v celicah 3T3WT, povzročene s Smart075 ali Smart009.....	31
Slika 15: Dozne odvisnosti sprememb citosolne koncentracije L-laktata ([L-laktat] _i), po stimulaciji z molekulama Smart075 ali Smart009 v celicah 3T3WT.	32
Slika 16: Presejanje kandidatov GPCR.....	34
Slika 17: Zmanjšana sprememba [L-laktat] _i v celicah 3T3KOB in 3T3WT, po stimulaciji s Smart009.	35
Slika 18: Optimizacija sočasne transfekcije plazmidov Laconic in GPRB-FLAG.	36
Slika 19: Rekonstrukcija odzivov v [L-laktat] _i , povzročenih s Smart009 (5 µM), v celicah 3T3KOBIE1, transfeciranih s plazmidom GPRB-FLAG.....	37

Slika 20: Rekonstrukcija odzivov v [L-laktat] _i , povzročenih s Smart009 (5 µM), v celicah 3T3KOBIC5, transfeciranih s plazmidom GPRB-FLAG.	38
Slika 21: Ponovna vzpostavitev odzivov v [L-laktat] _i , povzročenih s 8535, selektivnim agonistom GPRB, v celicah 3T3KOBIE1, transfeciranih s plazmidom GPRB-FLAG.	39
Slika 22: Primerjava odzivov [L-laktat] _i v celicah 3T3WT (WT) in celicah 3T3KOBIE1 (KOBIE1) po stimulaciji z 1 µM 8535 in 8535n.	40

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

3T3KO	celice 3T3 z izbitim genom
α -AR	α -adrenergični receptorji
β -AR	β -adrenergični receptorji
AC	adenilil ciklaza
AMP	adenozin monofosfat
ATP	adenozin trifosfat
ANOVA	analiza variance
ANSL	hipoteza o izmenjavi laktata med astrociti in nevroni (angl. "Astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis")
AUC	površina pod krivuljo (angl. "Area under the curve")
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CFP	cian fluorescenčni protein (angl. "Cyan fluorescent protein")
CREB	cAMP-response-element-binding protein
CRISPR-cas9	gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev (angl. "Clustered regularly interspaced short palindromic repeats")
CŽS	centralni živčni sistem
DG	diacilglicerol
EPAC	exchange protein directly activated by cAMP
Epac1camps	poročevalec sprememb v znotrajcelični koncentraciji cAMP
ER	endoplazemski retikulum
FRET	prenos energije z resonanco fluorescence (angl. fluorescence resonance energy transfer,
GAP	GTP-ase activating protein
GDP	gvanozin difosfat
GFP	zeleni fluorescenčni protein (angl. "Green fluorescent protein")

GPCR	z G-proteini sklopljeni receptorji (angl. "G-protein coupled receptors")
GTP	gvanozin trifosfat
GTPaza	gvanozinska trifosfataza
IP3	inozitoltrifosfat
Laconic	poročevalec sprememb v znotrajcelični koncentraciji laktat (angl. "Lactate optical nano indicator from Cecs")
mTFP	monomerni modrozeleni fluorescenčni protein (angl. "Monomeric teal fluorescent protein")
NA	noradrenalin
PDE	fosfodiesteraza
PKA	protein kinaza A
Rap1	Ras-related protein
SREB	super conserved receptor genes expressed in the brain
tmAC	transmembranska adenilatna ciklaza
Venus	izboljšana verzija YFP
YFP	rumeni fluorescenčni protein (angl. "Yellow fluorescent protein")
ZCR	zunajcelična raztopina

1 UVOD

Astrociti, tip celic nevroglije, so bili poimenovani leta 1895 (Von Lenhossék in Mills, 1895). So ektodermalnega, nevroepitelijskega izvora. Astrociti vzdržujejo homeostazo v centralnem živčnem sistemu (CŽS) (Verkhatsky in Nedergaard, 2018). Skoraj stoletje so bile raziskave teh celic zapostavljene, saj je prevladovalo mnenje iz 19. stoletja, da so celice glije le t.i. "nervenkitt" (Virchow, 1858), "lepilo" v možganih za povezovanje nevronov, ki naj bi bile edine strukture v CŽS sposobne signaliziranja s kemičnimi prenašalci. Danes je znano, da astrociti aktivno sodelujejo pri številnih fizioloških in patoloških procesih CŽS prek izločanja kemičnih snovi iz mešičkov in so zato v zadnjih dveh desetletjih predmet intenzivnih raziskav (Verkhatsky in Nedergaard, 2018; Zorec in sod., 2012). Astrociti so zvezdaste oblike in prek številnih izrastkov so v tesnem stiku z žiljem na eni in nevroni (s sinapsami) na drugi strani. Tako so anatomsko optimalno umeščeni za signaliziranje med nevroni in endotelijem, kar omogoča astroцитom presnovno podporo nevronske mreže, ki so osrednji porabnik energije v CŽS, in sicer v obliki porabe glukoze (Dienel, 2019; Nortley in Attwell, 2017). Astrociti tako sodelujejo pri prevzemu glukoze iz krvnega obtoka, ki jo lahko kot vir energije posredujejo nevronom ali jo skladiščijo v obliki glikogena. V primeru povečane aktivnosti nevronov se v astrociti razgradi glikogen do glukoze v procesu aerobne glikolize, nastali L-laktat se izloči v zunajcelični prostor in se posreduje nevronom (*t.i.* hipoteza o izmenjavi laktata med astrociti in nevroni, angl. Astrocyte-neuron lactate shuttle, ANLS), ki ga pretvorijo v piruvat za oksidativno razgradnjo v Krebsovem ciklu (Belanger in sod., 2011; Stobart in Anderson, 2013; Pellerin in Magistretti, 1994; Verkhatsky in Nedergaard, 2018; Peng in sod., 2005), zelo verjetno pa je tudi zunajcelična signalna molekula, primarni prenašalec (Bergersen in sod., 2001).

Kot sekundarna signalna molekula v citosolu deluje 3',5'-ciklični adenozinmonofosfat (cAMP), univerzalni sekundarni prenašalec, katerega koncentracija se uravnava z mnogimi receptorji, ki so sklopljeni z G-proteini (angl. G protein-coupled receptor; GPCR) (Peng in sod., 2005). Ti receptorji se številčno izražajo na plazemski membrani astrocitov (Lauritzen in sod., 2014; Wang in Bordey, 2008).

Med receptorje GPCR sodijo tudi L-laktatni receptorji (npr. GPR81 ali GPR113), adrenergični receptorji (npr. receptorji β) in metabotropni glutamatni in purinergični receptorji (Lauritzen in sod., 2014; Wang in Bordey, 2008). Pri aktivaciji G_s -proteinov se aktivira encim adenilil ciklaza, ki katalizira pretvorbo adenozin trifosfata v cAMP, medtem ko aktivacija G_i -proteinov inhibira aktivnost adenilil ciklaze (Nikolaev in Lohse, 2006). Aktivacija G_q -proteinov stimulira fosfolipazo C, ki cepi fosfoinozitol difosfat v diacilglicerol (DG) in inozitol trifosfat (IP_3). IP_3 se veže na receptorje v endoplazemskem retikulumu (ER) in povzroči sproščanje Ca^{2+} iz znotrajceličnih zalog ER (Nikolaev in Lohse, 2006; Vardjan in sod., 2014; Peng in sod., 2005).

Zvišana citosolna koncentracija cAMP v astrocitu aktivira različne znotrajcelične efektorje, vključno z mehanizmi za uravnavanje aerobne glikolize. Predno pa se aktivirajo končni efektorji, se cAMP veže na vmesne signalne molekule. Primarno se cAMP veže na od cAMP odvisno protein-kinazo A (PKA), ki lahko fosforilira različne proteine v citoplazmi in jedru ter na ta način uravnava celične procese, kot so aerobna glikoliza, delitev celic, morfološka plastičnost in ekspresija genov prek regulacije transkripcijskih faktorjev, npr. CREB (angl. cAMP-response-element-binding protein) (Allen in Zhang, 2006; Beavo in Brunton, 2002). Poleg PKA lahko cAMP uravnava tudi delovanje od cikličnih nukleotidov-odvisne kanale (HCN, ionski kanali), proteinske domene Popeye in GTP-izmenjevalnega proteina Epac (angl. Exchange Protein directly Activated by cAMP) (Beavo in Brunton, 2002; Bos, 2003; Nikolaev in Lohse, 2006; Horvat in sod., 2016). Epac je bil prvič opisan kot znotrajcelični receptorski protein za cAMP, ki posreduje signalizacijo cAMP preko od-cAMP odvisne nukleotidne izmenjave prek monomerne gvanozinske trifosfataze (monomerna GTPaza), Rap1 (DiPilato in sod., 2004).

Citosolna porazdelitev cAMP in znotrajcelične koncentracije L-laktata, ki se uravnava tudi prek sekundarnega prenašalca cAMP, v astrocitih in celicah 3T3 še ni bila opisana in predstavlja enega od problemov, ki ga predlagano raziskovalno delo obravnava. Nove raziskovalne metode, ki temeljijo na prenosu energije z resonanco fluorescence (angl. fluorescence resonance energy transfer, FRET) (Förster, 2006), omogočajo meritve sprememb znotrajcelične koncentracije cAMP ($[cAMP]_i$) oziroma znotrajcelične koncentracije L-laktata ($[L-laktat]_i$) v realnem času. V doktorski nalogi smo spremljali dinamiko $[cAMP]_i$ in $[L-laktat]_i$ v mirovanju in po stimulaciji GPCR z različnimi agonisti.

1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

- $[cAMP]_i$ je v mirovanju heterogeno porazdeljena v citosolu astrocitov in/ali fibroblastom podobnih celic 3T3.
- Stimulacija z agonisti za različne GPCR izzove prostorsko heterogene spremembe v znotrajcelični porazdelitvi cAMP in L-laktata.
- $[L-laktat]_i$ je v mirovanju heterogeno porazdeljena v citosolu astrocitov in/ali celic 3T3.

2 PREGLED OBJAV

2.1 cAMP

cAMP je prvi identificiral Earl W. Sutherland leta 1958, kot termostabilno molekulo, ki posreduje znotrajcelično aktivacijo glukagona in epinefrina v jetrih (Rall in Sutherland, 1958). Danes je znano, da aktivnost cAMP uravnava veliko celičnih procesov, kot so genska ekspresija, celična delitev, apoptoza, eksocitoza, ima pa tudi fiziološke funkcije pri imunskem odzivu, krčenju srčnih mišic in spominu. Njegova sinteza poteče, kot odgovor na aktivacijo membranskih receptorjev, ki spadajo v superdružino receptorjev GPCR. Po vezavi liganda se aktivni G-protein sprosti in sproži delovanje membransko-vezanega encima adenilil ciklaze (AC), ki ustvari ciklični AMP iz ATP. Trenutno prevladuje domneva, da je koncentracija prostega cAMP v celici odvisna od hitrosti njegove sinteze, hitrosti razgradnje in od morebitnih znotrajceličnih sistemov, kot so vezavni proteini cAMP ali celičnih mikrodomen, ki lahko upočasnijo difuzijo cAMP. Hitrost sinteze se uravnava z aktivnostjo AC, stopnja razgradnje cAMP pa je odvisna od lokalne aktivnosti fosfodiesteraz (PDE), ki hidrolizirajo cAMP v AMP (Nikolaev in Lohse, 2006; Agarwal in sod., 2016; Richards in sod., 2016; Bers in sod., 2019; Calebiro in Maiellaro, 2014).

Zvišana citosolna koncentracija cAMP v astrocitu aktivira različne znotrajcelične efektorje, vključno z mehanizmi za uravnavanje aerobne glikolize (Vardjan in sod., 2018). Pred aktivacijo končnih efektorjev se cAMP veže na vmesne signalne molekule. Primarno se cAMP veže na od cAMP odvisno protein-kinazo A (PKA), ki lahko fosforilira različne proteine v citoplazmi in jedru ter na ta način uravnava celične procese, kot so aerobna glikoliza, delitev celic, morfološka plastičnost in ekspresija genov prek regulacije transkripcijskih faktorjev, npr. CREB (angl. cAMP-response-element-binding protein) (Allen in Zhang, 2006; Beavo in Brunton, 2002). Poleg PKA lahko cAMP uravnava tudi delovanje od cikličnih nukleotidov-odvisne kanale (HCN, ionski kanali), proteinske domene Popeye in GTP-izmenjevalnega proteina Epac (angl. Exchange Protein directly Activated by cAMP) (Beavo in Brunton, 2002; Bos, 2003; Nikolaev in Lohse, 2006; Vardjan in Zorec, 2015). Epac je bil prvič opisan kot znotrajcelični receptorski protein za cAMP, ki posreduje signalizacijo cAMP preko od-cAMP odvisne nukleotidne izmenjave prek monomerne gvanozinske trifosfataze (monomerna GTPaza), Rap1 (DiPilato in sod., 2004).

Zaccolo in sodelavci (2000) so opazovali koncentracijske gradiente cAMP na ravni mikrometrov v živih neonatalnih miocitih srčne mišice. Za prisotnost mikro-domen s povečano koncentracijo cAMP naj bi bile odgovorne PDE, ki razgradijo cAMP in preprečijo difuzijo le-tega izven mikrodomen (Zaccolo in sod., 2000; Zaccolo in Pozzan, 2002; Zaccolo, 2011). Maiellaro in sodelavci (2016) so pokazali, da je nastanek cAMP heterogen v živčnih končičih motoričnih nevronov, ki naj bi bili najbolj dinamičen predel motonevronov glede akumulacije molekul cAMP (Maiellaro in sod., 2016). Četudi je cAMP majhna difuzibilna molekula (D_{cAMP} znaša $1,36 \times 10^{-6} - 7,80 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, D_{cAMP} v vodi znaša $3,30 \times 10^{-6} - 9,70 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, D_{kalij} znaša $1,30 \times 10^{-5} - 1,73 \times$

$10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D_{[\text{kalcij}]_i}$ znaša $5,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) (Agarwal in sod., 2016; Donahue in Abercrombie, 1987; Hodgkin in Keynes, 1953), sta že Buxton in Brunton (1983) predvidela, da cAMP nima enakomernega dostopa do vseh encimov PKA, ki so prisotni v celici, kar posledično pomeni prostorsko nehomogeno porazdeljenost molekul cAMP v celici in s tem prisotnost kompartmentaliziranega signaliziranja s tem sekundarnim prenašalcem (Brunton, 1983). Znano je, da je znotrajcelični cAMP uravnavan z aktivnostjo AC in PDE (Beavo in Brunton, 2002). Raziskave so pokazale, da imajo membranske AC bazalno aktivnost (Tasken in Aandahl, 2004), vendar je zaradi vezave na proteinske kinaze koncentracija prostega cAMP v celici zelo nizka in difuzija le-tega zelo počasna. To omogoča PDE, ki so precej počasni encimi, da okoli sebe naredijo nanometrsk predelke, ki skorajda ne vsebujejo cAMP. To celicam, ob aktivaciji receptorjev, zagotavlja ločeno regulacijo signalov v vsakem od teh majhnih nanometrskih predelkov (Bock in sod., 2020). Znotrajcelično heterogenost $[\text{cAMP}]_i$ v astrocitech smo opisali v sklopu študije, ki je obravnavala primerjavo funkcionalne in signalizacijske plastičnosti serumskih astrocitov in zvezdastih astrocitov. Rezultati so pokazali, spremenjeno dinamiko mešičkov v zvezdastih, a ne v t.i. "serumskih" astrocitech, ki je bila povezana s zvišanim $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v mirovanju in povečano podcelično heterogeno porazdelitvijo $[\text{Ca}^{2+}]_i$, medtem ko je podcelična dinamika $[\text{cAMP}]_i$ ostala stabilna v obeh kulturah, kar kaže na to, da je signalizacija cAMP manj nagnjena k plastičnemu preoblikovanju kot signalizacija Ca^{2+} (Pirnat in sod., 2021).

2.2 L-LAKTAT

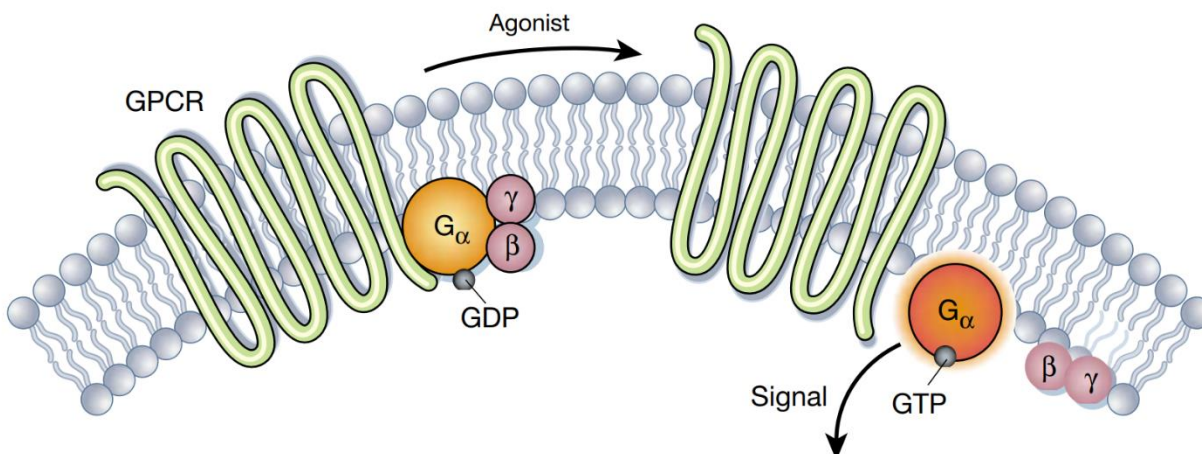
V CŽS, pri procesu aerobne glikolize, se ob razgradnji glukoze preko piruvata tvori L-laktat, ob normalnem parcialnem tlaku kisika, fenomen poznan tudi kot "Warburgov efekt" (Warburg, 1956). L-laktat, ima v CŽS energetska vrednost, saj poleg glukoze služi kot gorivo za nevrone. Kot signalna molekula zunajcelčni L-laktat igra vlogo "volumskega prenašalca" informacij, saj z difuzijo dosega daljše razdalje in aktivira receptorje okrog mesta sproščanja (Morland in sod., 2015). Volumski prenos ne poteka med sinapsami, pač pa je to signaliziranje način, ki omogoča komunikacijo med možganskimi celicami, kjer se izrablja koncentracijski gradient na obsežnejšem področju možganskega tkiva. Za razliko od sinaptičnega prenosa, kjer razdalja med izvorom in tarčo signalne molekule znaša nekaj deset nanometrov, lahko volumski prenašalec z difuzijo doseže veliko večje mikrometrsk razdalje (Borrito-Escuela in sod., 2015; Lauritzen in sod., 2014). L-laktat morda deluje tudi kot gliotransmitter v CŽS, saj naj bi astrociti imeli zmožnost modulacije aktivnosti noradrenergičnih nevronov. Tako lahko L-laktat uravnava razpoložljivost noradrenalina (NA), kjer sproščanje L-laktata iz aktiviranih astrocitov v jedru locus coeruleus povzroči vzbujanje nevronov in posledično sproščanje NA (Tang in sod., 2014).

Na tvorbo L-laktata lahko vpliva več mehanizmov, ki igrajo signalno vlogo v CŽS, vključno z redoks regulacijo (Brooks, 2009), modulacijo prostaglandinov (Gordon in sod., 2008) in z vezavo na L-laktat občutljivi z G_i -proteinom povezan receptor GPR81 (Lauritzen in sod., 2014) ali prek

še neidentificiranih receptorjev plazemske membrane (Tang in sod., 2014; Vardjan in sod., 2018). Identifikacija teh receptorjev predstavlja del doktorske študije.

2.3 GPCR

Za zaznavanje zunanjih kemičnih signalov celice izražajo veliko število receptorjev. Receptorji GPCR lahko posredujejo celične odzive na veliko število zunajceličnih signalnih molekul kot so hormoni, nevrotransmiterji in lokalni celični mediatorji. Te signalne molekule se med seboj razlikujejo tako po strukturi kot po funkcionalnosti. Med njimi so tako prisotni proteini, majhni peptidi, kot tudi derivati aminokislin in maščobnih kislin. Med drugim lahko en sam ligand ali agonist, aktivira več različnih GPCR-jev. Kljub kemični in funkcionalni pestrosti signalnih molekul, imajo GPCR-ji podobno molekulsko strukturo. Sestavljeni so iz sedmih transmembranskih α -vijačnic (Yang in sod., 2021). Ob vezavi zunajceličnega liganda na receptor pride do konformacijske spremembe receptorja, ki se prenese na znotrajcelični heterotrimerni G-protein. G-proteini so sestavljeni iz podenot α , β in γ . V stanju neaktivnosti G-proteina ima α -podenota nase vezan gvanozin difosfat (GDP). Ob stimulaciji aktiviranega receptorja, se vezani GDP sprosti iz α -podenote, kar omogoči vezavo gvanozin trifosfata (GTP). Ta reakcija povzroči razpad trimernega G-proteina v dve aktivirani komponenti, α -podenoto in kompleks sestavljenega iz β - in γ -podenote, ki posredujeta navzdolnjo signalizacijo (Slika 1). Poleg delovanja preko G-proteina lahko signaliziranje poteče tudi preko arestinov. Arestini so bili prvič opisani kot proteini, ki "ugasnejo" signaliziranje preko G-proteinov (Weis in Kobilka, 2018). Po hidrolizi vezanega GTP-ja v GDP se α -podenota ponovno združi s kompleksom $\beta\gamma$ -podenot in oblikuje neaktivni G-protein. Hidrolizo GTP-ja v GDP pospeši vezava specifičnega modulatorja, proteina RGS (angl. Regulator of G-protein signaling), ki deluje kot protein GAP (angl. GTP-ase activating protein). Za razliko od velikega nabora različnih genov, ki v evkariotskih organizmih kodirajo proteine GPCR, se G-proteini delijo na štiri glavne družine. Te družine so $G_{s/olf}$, $G_{i/o/t}$, $G_{q/11}$ in $G_{12/13}$ (Hilger in sod., 2018).



Slika 1: Shematski prikaz GPCR ob vezavi agonista (Li in sod., 2002).

2.3.1 G-proteini, ki vplivajo na nastajanje cAMP

Astroцитi na svojih membranah izražajo številne receptorje GPCR, ki se prek G-proteinov uravnavajo signalne poti s cAMP. Ti receptorji so sklopljeni z G-proteini, ki vključujejo proteine G_s in G_i , ki so sklopljeni z β -adrenergičnimi receptorji (β -AR; (protein G_s)), z α_2 -AR (protein G_i), adenozijski receptorji (proteini G_s/G_i), glutamatni receptorji mGlu3 (protein G_i), dopaminski receptorji D1 (protein G_s), histaminski receptorji H2 (protein G_s), opioidni receptorji (proteini G_i), PACAP/VIP receptorji (proteini G_s) (Verkhatsky in Nedergaard, 2018).

Sinteza cAMP je v veliki meri odvisna od aktivnosti encima AC, ki se nahaja na citoplazemski membrani. Aktivacija proteinov G_s stimulira transmembransko adenilatno ciklazo (tmAC), kar posledično vodi v povečanje sinteze cAMP. Inhibicija tmAC poteče z ligandi, ki stimulirajo receptorje sklopljene z G_i proteinom, kar zniža nivo sinteze znotrajceličnega cAMP (Verkhatsky in Nedergaard, 2018).

Aktivnost nekaterih GPCR vpliva na celokupni znotrajcelični cAMP, vendar še vedno ni povsem jasno, kako velika številčnost teh receptorjev povzroči specifične celične odzive. Specifični odzivi, značilni za določen receptor, bi lahko bili posledica celične kompartmentalizacije signaliziranja s cAMP. Napredne mikroskopske tehnike so omogočile opazovanje teh domen na nanometrski skali (Bers in sod., 2019; Bock in sod., 2020; Zaccolo in sod., 2021).

2.3.2 Laktatni receptor GPR81

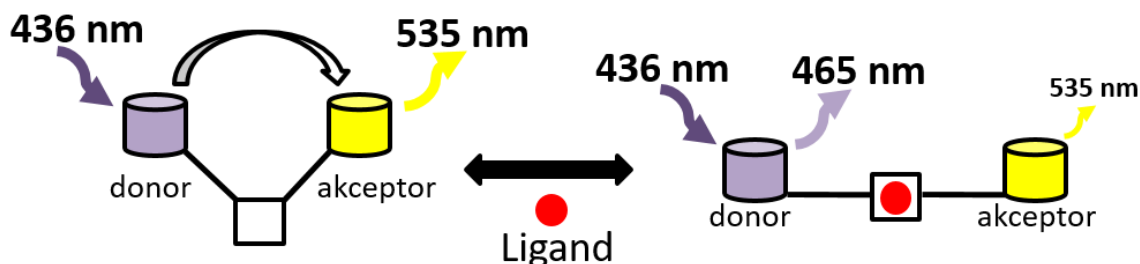
Signalizacija z L-laktatom lahko poteka preko aktivacije GPCR-jev, ki so občutljivi na laktat. Med te GPCR-je spada tudi GPR81. Ta receptor je bil odkrit v adipocitnem tkivu (Cai in sod., 2008),

izražanje pa je v manjši meri prisotno tudi v ledvičnih in mišičnih tkivih ter v možganih (Ge in sod., 2008; Lauritzen in sod., 2014; Liu in sod., 2012). Znano je, da aktivacija GPR81 v adipocitih povzroči znižanje sinteze znotrajceličnega cAMP zaradi inhibicije adenilil ciklaze, kar posledično v avtokrini zanki inhibira lipolizo in vzpodbudi skladiščenje lipidov in s tem energije (Ahmed in sod., 2009). Endogeni agonist za GPR81 je L-laktat (Liu in sod., 2009). Za ta receptor pa so opisani tudi selektivni agonisti, kot so 3-kloro-5-hidroksibenzojska kislina (Dvorak in sod., 2012), 2-hidroksi-5-metoksibenzojska kislina in "Compound 2" (4-metil-N-(5-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-oksoetil)-4-(2-tienil)-1,3-tiazol-2-il)-cikloheksankarboksilamid) (Sakurai in sod., 2014). Znano je, da zunajcelični L-laktat v astrocitih povzroči aktivacijo adenilat ciklaze, kar posledično zviša raven znotrajceličnega cAMP, pospeši aerobno glikolizo in zaradi prisotnosti mehanizma pozitivne povratne zanke, poveča citosolno raven L-laktata (Vardjan in sod., 2018). Prav tako dodatek selektivnih agonistov za GPR81 v astrogliji, poveča znotrajcelični cAMP in L-laktat, zaradi prisotnosti mehanizma pozitivne povratne zanke. Raziskave so pokazale, da v astrocitih dodatek selektivnih agonistov za GPR81 ojača astroglialno aerobno glikolizo, tudi ko ekspresija tega receptorja v celicah ni prisotna, kar kaže, da poleg aktivacije GPR81, ti agonisti aktivirajo še neznani receptorski mehanizem (Vardjan in sod., 2018).

2.4 NANOSENZORJI FRET

Različne fluorescenčne mikroskopske metode omogočajo spremljanje citosolne koncentracije cAMP ali L-laktata z visoko prostorsko in časovno ločljivostjo na ravni posamezne celice. Ena prvih opisanih metod zmožna detektiranja sprememb z nanometrsko resolucijo temelji na prenosu energije z resonanco oz. na Försterjevem resonančnem prenosu energije (Shrestha in sod., 2015). Koncept dipolno-dipolne interakcije in prenosa energije odvisnega od razdalje brez molekularnega trka je bil prvič predstavljen v začetku 20. stoletja, bolj natančno pa je kvantitativno teorijo FRET opisal Theodor Förster leta 1948 (Clegg, 2006). Fenomen FRET se pojavi med dvema fluoroforoma, kjer prvi deluje kot donor in drugi kot akceptor energije. Če je razdalja med molekulama manjša od 1 nm, med njima prihaja do trkov, če je razdalja večja od 10 nm pride do prenosa fotonov. Zaradi tega, lahko FRET poteka samo na razdaljah 1-10 nm (Lakowicz, 2006). Emisijski spekter donorskega fluorofora se mora prekrivati z absorpcijskim spektrom akceptorja za vsaj 30 %. Najbolj pogosti donorji in akceptorji izhajajo iz fluorescenčnih proteinov GFP (Sekar in Periasamy, 2003).

Napredne tehnike fluorescenčne mikroskopije vključujejo nanosenzorje FRET, ki so sestavljeni iz prepoznavne domene in poročevalske domene. Prepoznavna domena je vezavni protein za metabolit, oz. molekulo, ki naj bi jo detektirali. Vezava liganda na prepoznavno domeno povzroči konformacijsko spremembo in s tem zvečanje ali zmanjšanje razdalje med fluorescentnima proteinoma (akceptor in donor). Posledično pride do porasta ali padca učinkovitosti prenosa energije resonance (San Martin in sod., 2013).



Slika 2: Shematski model nanosenzorja FRET. Vezavno mesto za ligand se nahaja med donorjem in akceptorjem. Vezava liganda lahko povzroči sterično konformacijo in posledično povečanje razdalje med fluorescentnima fluoroforoma, ter znižanje signala FRET (Povzeto po Tamma in sod., 2017).

2.4.1 Nanosenzor FRET Epac1-camps

V fizioloških pogojih je v celicah prisoten cAMP zaradi bazalne aktivnosti encima AC. Odkritje proteina Epac, ki je pomembna efektivna molekula za cAMP, je prispevalo k razvoju novih nanosenzorjev FRET za merjenje sprememb v koncentraciji znotrajceličnega cAMP. Nanosenzor Epac1-camps je sestavljen iz vezavne domene Epac, ki je vključena med dva fluorescenčna proteina, donorskim fluorofornim proteinom CFP (angl. Cyan Fluorescent Protein) in akceptorskim fluorofornim proteinom YFP (angl. Yellow Fluorescent Protein). Ob vezavi cAMP na vezavni protein, se inducira konformacijska sprememba nanosenzorja, kar posledično vodi do spremenjene razdalje med fluoroforoma CFP in YFP (Allen in Zhang, 2006; Brunton, 1983; DiPilato in sod., 2004; Jurevicius in sod., 2003; Nikolaev in sod., 2004). To izmerimo kot padec oz. porast signala FRET, ki predstavlja razmerje intenzitet emitirane svetlobe CFP in YFP (CFP/YFP). Razmerje intenzitet predstavlja nivo cAMP, saj je razmerje fluorescenc neodvisno od količine molekul na optični poti v volumsko različnih delih celice (G Grynkiewicz, 1985), skozi katere potuje žarek, ki vzbuja fluorescenčni protein pri relativno krajši valovni dolžini (Calebiro in Maiellaro, 2014).

2.4.2 Nanosenzor FRET Laconic

Laconic (angl. LACTate Optical Nano Indicator from Cecs) nanosenzor FRET za merjenje znotrajceličnega L-laktata na ravni posamezne celice. Sestavljen je iz vezavnega proteina za laktat, Lidr in fluorescenčnih proteinov mTFP (varianta CFP) in Venus (varianta YFP) (San Martin in sod., 2013). Ob vezavi L-laktata na vezavno domeno pride do konformacijske spremembe, kar povzroči povečanje razdalje med fluoroforoma in posledično zvišanje emisije mTFP in znižanje emisije Venus oz. zvišanje signala FRET (mTFP/Venus). Razmerje intenzitet mTFP/Venus v fizioloških pogojih predstavlja nivo L-laktata v celici. Laconic omogoča zaznavanje koncentracije znotrajceličnega L-laktata med 1 μ M in 10mM (San Martin in sod., 2013).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Hranilni medij

Hranilni medij za gojenje celic 3T3 smo pripravili iz gojišča DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle's medium) z visoko vsebnostjo glukoze, 4500 mg/L (Sigma-Aldrich), ki smo mu v končnih koncentracijah dodali 5mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), 10 % FBS-a (ang. Fetal bovine Serum, Sigma-Aldrich), ter mešanice antibiotikov streptomicina in penicilina s koncentracijama 5 ug/mL (Innoprot). Prefiltrirani hranilni medij smo do uporabe hranili na +4 °C, največ 3 tedne. Hranilni medij za gojenje astrocitov se je razlikoval samo po manjši končni koncentraciji L-glutamina (2 mM) in po dodatku 1 mM Na-piruvata.

3.1.2 Lipofekcijski medij

Lipofekcijski medij za celice 3T3 smo pripravili iz gojišča DMEM s 4500 mg/l D-glukoze, ki smo mu dodali 5 mM L-glutamina. Lipofekcijski medij za astrocite je poleg DMEM-a (4500 mg/l D-glukoze) vseboval tudi 1mM Na-piruvata in 2 mM L-glutamina. Do uporabe smo ga hranili pri temperaturi +4 °C, največ 3 tedne.

3.1.3 Zunajcelične raztopine

Zunajcelična raztopina (ZCR) za merjenje laktata je vsebovala 135,3 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM HEPES; 0,5 mM NaH₂PO₄xH₂O; 5,0 NaHCO₃; 3 mM D-glukoze; 1,8 CaCl₂; 2 mM MgCl₂. Zunajcelična raztopina z laktatom je vsebovala 95,3 mM NaCl in 40mM Na-Laktat, vse ostale koncentracije sestavin so ostale enake. Končni pH raztopine smo umerili na 7,20. (NaOH) Osmornost raztopine je znašala 290-305 mOsm/kg. ZCR za merjenje cAMP je vsebovala 131,8 mM NaCl, 5mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0,5 mM NaH₂PO₄xH₂O, 5 mM NaHCO₃ in 10 mM D-glukoze. Končni pH raztopine smo umerili na 7,20 z NaOH. Osmolarnost raztopine je znašala 290-305 mOsm/kg.

3.1.4 Raztopina ligandov Smart075, Smart009 in agonista 8535/8535n

Založno količino agonista Smart009 (3-tert-butil-5-hidroksibenzojska kislina; SINOVA, Bethesda, ZDA) ali Smart075 (3-kloro-5-hidroksibenzojska kislina; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, ZDA) v prahu smo raztopili v ustrezni količni ZCR, da je končna koncentracija liganda znašala 10mM. Založno količino agonista 8535 (N-[4-(anilinkarbonil)fenil]-2,4-diklorobenzamid) (Dupuis in sod., 2017) ali 8535n (N-[4-(anilinosulfonil)fenil]-2,4-diklorobenzamid) (Pillaiyar in sod., 2021) v prahu smo raztopili v ustrezni količni DMSO, da je končna koncentracija liganda znašala 10mM.

3.1.5 Fosfatni pufer z NaCl (PBS)

Eno tableto PBS (Sigma-Aldrich, P4417) smo raztopili v 200 ml destilirane vode. Nastala raztopina je vsebovala 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl in 10 mM fosfatnega pufra. Do uporabe smo jo hranili na sobni temperaturi.

3.1.6 Raztopina za spiranje celic pri imunohistokemiji

Raztopino za spiranje celic smo pripravili z raztapljanjem govejega serumskega albumina (BSA, angl. "bovine serum albumin") v PBS do 3 % končne koncentracije in jo hranili do uporabe na -20 °C.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava krovnih stekelc za nasajanje astrocitov in celic 3T3

Krovna krožna stekelca s premerom 22 mm (Chance Proper, Velika Britanija) smo 20 min sterilizirali v 70 % etanolu in za tem dvakrat sprali z redestilirano vodo. Nato smo sterilna stekelca 20 min inkubirali v raztopini 1% poli-L-lizina (PLL, Sigma-Aldrich). Po ponovnem dvakratnem spiranju v redestilirani vodi smo stekelca sušili v manjših petrijevkah. Po 1 uri sušenja smo suha stekelca zaprli v petrijevke in jih do uporabe hranili na +4 °C.

3.2.2 Priprava in nasajanje celic 3T3

Celice 3T3-MEF so klasificirane kot embrionalni preadipocitni fibroblasti. Posredoval nam jih je Dr. K. Chylinski iz Univerze na Dunaju. Celice smo v gojilni posodi sprali z 2 ml hranilnega gojišča, ga odstranili, celicam dodali 4 ml tripsin-EDTA in jih inkubirali 5 min na 37 °C. Odlepljenim celicam smo v gojitveno posodo dodali 2 mL hranilnega gojišča za inhibicijo delovanja tripsina, celoten volumen prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 min na 900 obratih/min (Centric 150, Tehnica, Železniki, Slovenija). Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, ter pelet resuspendirali v 5 ml hranilnega gojišča. Na krovna stekelca smo nanесли 30-50 µl celične suspenzije in jih inkubirali 25 min na 37 °C, 95 % relativni zračni vlažnosti in sestavi atmosfere 5 % CO₂/95 % zrak. Po 30 minutni inkubaciji smo celicam dodali 2 ml svežega gojišča in jih do izvedbe poskusov vzdrževali v inkubatorju (37 °C, 95 % relativna zračna vlažnost, 5 % CO₂/95 % zrak).

3.2.3 Nasaditev podganjih astrocitov na krovna stekelca premazana s poli-L-lizinom

Izolacija in priprava kulture primarnih podganjih astrocitov je potekala v skladu z zakonodajo o delu na izoliranih tkivih, organih in truplih predhodno usmrčenih živali po 22.a členu Zakona o zaščiti živali (ZZZiv-UPB3, Uradni list RS, št. 38/2013 z dne 3. 5. 2013). Eksperimentalni protokol je bil odobren s strani Uprave RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana), dokument št. U34401-47/2014/7, podpisan s strani Barbare Tomše, dr. vet. med.

Hranilno gojišče smo v gojitveni posodi s kulturo primarnih podganjih astrocitov nadomestili z 1,5 ml mešanice tripsin/EDTA in inkubirali 5 min pri 37 °C. Odlepljenim celicam smo v gojitveno posodo dodali 1,5 mL hranilnega gojišča za inhibicijo delovanja tripsina, celoten volumen prenesli v dve centrifugirki in centrifugirali 5 min na 900 obratih/min (Centric 150, Tehnica, Železniki, Slovenija). Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v 0,5 ml hranilnega gojišča. Celično suspenzijo primerne gostote smo nanесли na krovna stekelca in jih inkubirali pri 37 °C, 95 % relativni zračni vlažnosti in sestavi atmosfere 5 % CO₂/95 % zrak. Po 30 minutni inkubaciji smo celicam dodali 2 ml svežega gojišča in jih do izvedbe poskusov vzdrževali v inkubatorju (37 °C, 95 % relativna zračna vlažnost, 5 % CO₂/95 % zrak).

3.2.4 Namnožitev in izolacija plazmidne DNA FRET-nanosenzorjev in GPR27-FLAG

Bakterijske celice *Escherichia coli* DH5α, ki vsebujejo plazmidno DNA (pDNA) pcDNA3 z zapisom za Epac1-camps (Julius-Maximilians Univerza v Wuerzburgu, Nemčija), pcDNA3.1 z zapisom za Laconic (Centro de Estudios Científicos, Valdivia, Čile) in pcDNA3.1 z zapisom za ssFlagGPR27 (Dupuis in sod., 2017) smo namnožili v gojišču LB v prisotnosti 100 µg/ml ampicilina. Gojišče s celicami smo stresali 16 h na 250 obratih/min pri 37 °C. pDNA smo izolirali po navodilu proizvajalca s kompletom za vakuumsko izolacijo DNA (PureYield™ Plasmid Midiprep System, Promega, Madison, ZDA). Koncentracijo in čistost izolirane pDNA smo preverili spektrofotometrično z meritvami absorbance (spektrofotometer Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, Olittel chalfont, Velika Britanija). Koncentracijo (*c*) izolirane pDNA smo izračunali iz absolutne vrednosti absorbance pri 260 nm (A₂₆₀) po enačbi:

$$c \text{ pDNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times DF \times 50 \mu\text{g/ml},$$

kjer DF (angl. "dilution factor") predstavlja faktor redčitve. Čistost izolirane pDNA smo določili z razmerjem med absorpcijo pri valovni dolžini 260 nm in 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀). Plazmide smo do uporabe hranili pri -20 °C.

3.2.5 Transfekcija celične kulture podganjih astrocitov s plazmidno DNA z zapisom za FRET-nanosenzorje in za GPR27-FLAG

Lipofekcija je vnos genskega materiala v celice s pomočjo liposomov (Felgner in sod., 1987). S to metodo smo v celice vnesli konstrukte pDNA z zapisom za FRET-nanosenzorje Epac1-camps, Laconic oz. GPR27-FLAG, 24-48 ur po nasaditvi na krovna stekla. V sterilni centrifugirki smo pripravili lipofekcijsko mešanico, ki je vsebovala 100 µl lipofekcijskega gojišča, 3 µl lipofekcijskega reagenta Fugene® 6 (Promega, Madison, ZDA) in 1 µg ustrezne pDNA ter mešanico inkubirali 20 min pri sobni temperaturi. Krovnikom z nasajenimi celicami smo zamenjali hranilno gojišče z 900 µl svežega hranilnega gojišča in mu po končani inkubaciji dodali 100 µl lipofekcijske mešanice. Transfecirane celice smo inkubirali 24 ur v inkubatorju. Pri poskusih "reševanja odzivov" smo celice sočasno transfecirali z nanosenzorjem Laconic, v končni koncentraciji 1 µg/ml in plazmidom GPR27-FLAG, v končni koncentraciji 0,5 µg/ml. Celicam smo po 2 urah inkubacije zamenjali hranilno gojišče in jih inkubirali 24 ur oz. do uporabe.

Postopek sočasne transfekcije smo standardizirali glede na koncentracijsko stopnjo prisotnosti obeh plazmidov v celicah in čas inkubacije celic v lipofekcijski mešanici (slika 18 E, F).

3.2.6 Meritve [cAMP]_i in [L-laktat]_i v posamezni celici z metodo FRET ter analiza

Meritve spremembe [cAMP]_i in [L-laktat]_i v celicah, katere smo transficirali s pDNA z zapisom za FRET-nanosenzorje Epac1-camps ali Laconic smo izvedli v realnem času z invertnim fluorescenčnim mikroskopom Zeiss Axio Observer.A1 (Zeiss, Oberkochen, Nemčija), pod vodnim imerzijskim objektivom s povečavo 63x/NA 1,4 in zračnim objektivom s povečavo 20x/NA 0,8. Kot vir svetlobe smo uporabili svetlobni modul Polychrome V (Till Photonic, Nemčija), celice smo osvetljevali z valovno dolžino 436 nm. Emitirano svetlobo je delilec slike (Optical Insights, Tucson, Arizona, ZDA) s pomočjo dveh emisijskih filtrov zaznal kot ločeni emisiji obeh fluoroforjev nanosenzorja, 480/30 nm za CFP (Epac1-camps) oz. mTFP (Laconic) in 535/40 nm za YFP (Epac1-camps) oz. Venus (Laconic). Emisijske slike nanosenzorja Epac1-camps smo zajemali vsake 5 s, emisijske slike nanosenzorja Laconic pa vsakih 10 s.

Krovnike s transfeciranimi celicami smo predhodno 10 min inkubirali v ZCR, pri sobni temperaturi. Nato smo krovnike vpeli v snemalno kamrico in jim dodali 200 µl sveže ZCR. Pod okularjem smo poiskali celico z ustrezno stopnjo fluorescence ter ustrezno morfologijo (brez vključkov in proteinskih agregatov) in pred začetkom snemanja posneli sliko pod presevno svetlobo in fluorescenčno sliko celice. V nadaljevanju je bilo posnetih 210 slik v primeru snemanja celic, ki so bile transfecirane z nanosenzorjem Epac1-camps in 120 slik v primeru celic, ki so bile transfecirane z nanosenzorjem Laconic. Celice so bile med zajemanji slik izpostavljene ekspozicijskim časom 0,1-0,8 s pri isti intenziteti eksitacije fluorescence. Učinek različno dolge eksitacije je bil analiziran predhodno (Maver, 2020).

3.2.7 Protokol stimulacije celic z agonisti in merjenje sprememb citoplazemske koncentracije cAMP in L-laktata

Emisijske slike celic, ki so izražale Epac1-camps, smo zajemali v 5-sekundnih intervalih 1045 s. Celicam smo po 145 s snemanja (stanje mirovanja) dodali:

- i. 200 µl ZCR z agonistom izbrane končne koncentracije oz. v primeru negativne kontrole samo ZCR
- ii. Učinkovitost senzorja in primerne izbire celice smo preverili z dodatkom ZCR z agonistom izbrane končne koncentracije in NA v končni koncentraciji 100 µM

Emisijske slike celic, ki so izražale Laconic, smo zajemali v 10-sekundnih intervalih 1190 s. Celicam smo po 290 s snemanja (stanje mirovanja) dodali:

- i. 200 µl ZCR z agonistom izbrane končne koncentracije oz. v primeru negativne kontrole samo ZCR

- ii. Učinkovitost senzorja in primerne izbire celice smo preverili z dodatkom ZCR z agonistom izbrane končne koncentracije in L-laktata v končni koncentraciji 16-20 mM.

3.2.8 Imunocitokemija

Za optimizacijo kolokalizacije plazmidnih konstruktov Laconic in GPR27-FLAG v celicah 3T3KO27 smo celice, ki so bile sočasno transfecirane z obema plazmidoma barvali *in vivo* s protitelesi specifičnimi za označevalno sekvenco FLAG, ki je označevalec prisoten na plazmidu GPR27-FLAG. Celice smo 48 ur po nasaditvi na krovna stekelca 3 min spirali v 2 ml PBS. V nadaljevanju smo celice za 2 min prelili s 300 µl 4 µM jonomicina in jih nato spirali v PBS s 3 % BSA. Nato smo celice barvali s primarnimi protitelesi anti-FLAG (redčitev 1:600), redčenimi v PBS s 3 % BSA in krovna stekelca s celicami inkubirali 10 min na sobni temperaturi (kunjča monoklonska protitelesa proti oznaki DDDDK oz. FLAG (Abcam, Cambridge, Velika Britanija, ab205606). Po 10 min smo celice spirali 3-krat po 2 min v PBS. Nato smo celice barvali s sekundarnimi protitelesi (redčitev 1:500), redčenimi v PBS s 3 % BSA in krovna stekelca s celicami inkubirali 20 min na sobni temperaturi (AlexaFluor⁵⁴⁶, Invitrogen, Life Technologies, Eugene, Oregon, ZDA). Na koncu smo celice spirali 3-krat po 2 min v PBS in jih nato prelili z 2 ml ZCR. Imunsko pobarvane žive celice smo takoj po barvanju opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom (Zeiss Axio Observer.A1, Zeiss Oberkochen, Germany) z objektivom Plan neofluar 20x/0.4, kamero AxioCam 702 in svetlobnim virom HXP 120 C (Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.2.9 Analiza posnetkov porazdelitve [cAMP]_i ali [L-laktat]_i

Spremembe v fluorescenci CFP in YFP (Epac1-camps) oz. mTFP in Venus (Laconic) smo evalvirali s programom ImageJ, kjer smo od obeh fluorescenčnih kanalov odšteli fluorescenco ozadja (povprečna vrednost $\pm 3 \times$ standardna deviacija) in potem na temelju tako odbelanih podatkov izračunali signal FRET, kot razmerje kanalov CFP/YFP oz. mTFP/Venus. Povečanje [cAMP]_i oz. [L-laktat]_i se je tako odražalo v povečanju signala FRET. Za karakterizacijo mikrodomen [cAMP]_i oz. [L-laktat]_i smo s pomočjo programa Matlab narisali linearne poti znotraj citoplazme na katerih so bila območja zanimanja v obliki krogov ($2r = 2\mu\text{m}$), v smeri pravokotno od jedra proti periferiji celice. Povprečje razmerja fluorescence CFP/YFP oz. mTFP/Venus smo po odštevanju ozadja izračunali za vsako območje zanimanja (mikrodomena). Za oceno časovno odvisnih sprememb [cAMP]_i oz. [L-laktat]_i znotraj mikrodomen, smo uporabili celotno časovno vrsto slik CFP in YFP oz. mTFP in Venus. Za oceno ravni [cAMP]_i (razmerje CFP/YFP) v mirovanju, smo povprečili podatkovne točke zbrane v časovnem intervalu 30 s v posamezni mikrodomeni. Enako smo naredili za oceno nivoja [cAMP]_i po stimulaciji, kjer smo povprečili podatkovne točke zbrane v časovnem intervalu 30 s po 120 s dodatka 100 µM NA. Za oceno ravni [L-laktat]_i (razmerje mTFP/Venus) v mirovanju, smo povprečili podatkovne točke zbrane v časovnem intervalu 60 s v posamezni mikrodomeni. Enako smo naredili za oceno nivoja [L-laktat]_i po stimulaciji, kjer smo povprečili podatkovne točke zbrane v časovnem intervalu 400-460 s oz. 100 s po dodatku agonista Smart009. Vsa razmerja CFP/YFP v posameznih celicah smo normalizirali po enačbi:

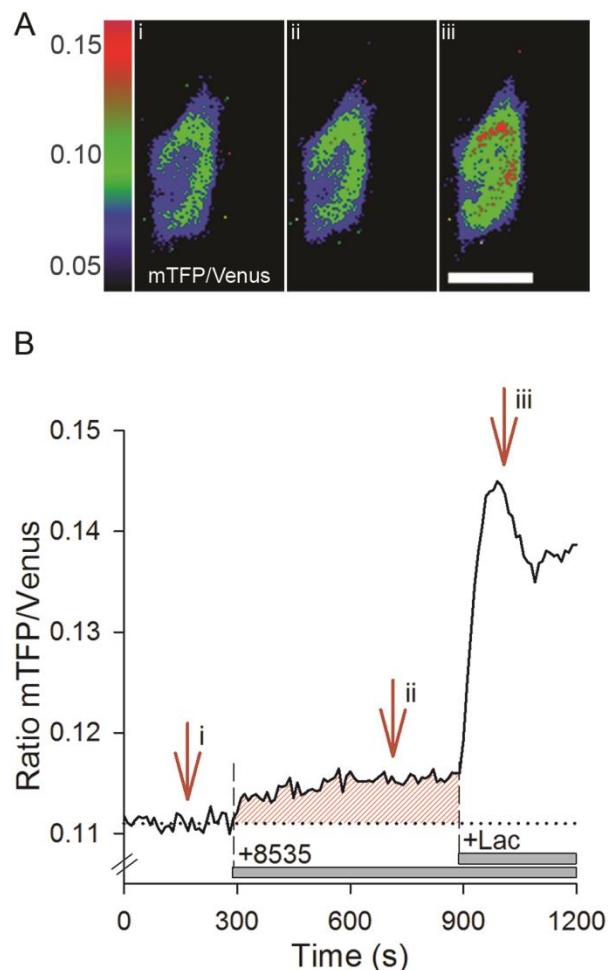
$$X' = \frac{(X - X_{\min})}{(X_{\max} - X_{\min})} \quad \dots(1)$$

3.2.10 Analiza meritev spremembe [L-laktat]_i v celicah 3T3 po stimulaciji z agonisti

Posnetke celic smo analizirali v programu OA Offline Analysis (Till Photonics, Nemčija). Za območja zanimanja smo označili celotno celico in del ozadja. V označenih regijah je program podal vrednosti intenzitete emitirane svetlobe za mTFP in Venus. S programom Excel (Microsoft, ZDA) smo izračunali razmerje signalov mTFP/Venus po enačbi:

$$\frac{\text{mTFP}}{\text{Venus}} = \frac{\text{mTFP (celica)} - \text{mTFP (ozadje)}}{\text{Venus (celica)} - \text{Venus (ozadje)}} \quad \dots(2)$$

Zvišan signal pomeni, da se je raven [L-laktat]_i povečal. Vse signale FRET smo normirali na vrednost 1,0 tako, da smo absolutne vrednosti razmerja FRET delili s povprečno vrednostjo meritev v mirovanju (določena kot povprečje vrednosti v obdobju 30 s, od začetka posnetka). Celice smo opredelili kot odzivne, ko je bila povprečna sprememba v signalu FRET, določena po dodatku agonista v obdobju 320-420 s po začetku snemanja, višja od treh standardnih deviacij povprečne vrednosti signala FRET v mirovanju (časovni interval pred dodatkom agonistov, 190-290 s). Če ta prag ni bil dosežen, smo celice uvrstili med neodzivne. Površino pod krivuljo (AUC, slika 3) smo izračunali za vsako normalizirano krivuljo odziva v časovnem intervalu od dodatka agonista do dodatka 16-20 mM L-laktata. Povprečna AUC je bila izračunana za vsak dodatek agonista in negativne kontrole. Za gladitev šuma v signalu FRET smo uporabili Excel-ovo drseče povprečje z intervalom 5 točk (Excel, Moving average).



Slika 3: Učinek stimulacije celic 3T3 z 8535, agonistom GPR27, na [L-laktat]i. (A) Slika prikazuje spremembe v razmerju FRET (mTFP/Venus) laktatnega senzorja Laconic v celici 3T3 (razmerje FRET, glejte Metode). Izražanje senzorja Laconic je pretežno prisotno v citosolu. Reprezentativne slike prikazujejo celico 3T3 na začetku poskusa (i), po dodatku 1 μM 8535 (ii) in 20 mM L-laktata (iii). Zunajcelični L-laktat smo dodali kot pozitivno kontrolo, kjer smo preverili ali se izraženi nanosenzor FRET Laconic v celici odziva na povišane vrednosti [laktata]i, ki jih povzroči povečanje zunajceličnega L-laktata, ki vstopa v celico prek transporterjev. Merilna vrstica, 20 μm . (B) Razmerje FRET, pridobljeno iz časovne serije mikroskopskih slik citoplazemske regije celice prikazane v (A). Prikazano je povečanje signala po aplikaciji 1 μM 8535 (+8535; vodoravna črtkana črta) in zunajceličnega 20mM L-laktata (+Lac; vodoravna črtkana črta). Puščice označujejo časovne okvirje, prikazane na (A). Rdeče črtasto območje označuje območje pod krivuljo (AUC).

3.2.11 Statistična analiza

Podatke smo predstavili kot povprečje $\pm$ standardna napaka ali mediana z interkvartilnim razponom ("škatla z brki"). Test normalnosti smo naredili s testom Shapiro-Wilk ali s testom Kolmogorov-Smirnov. Statistično značilnost med dvema skupinama smo določili s Studentovim t-testom in testom vsote ranga Mann-Whitney. Statistično značilnost med več kot dvema skupinama smo določili z eno- ali dvosmerno analizo variance po rangih. Statistična značilnost med dvema vrstama razvrstitev smo določili s Fisherjevim natančnim testom. Vse statistične analize so bile narejene s programoma SigmaPlot (SyStat, San Jose, CA, ZDA) in Excel

(Microsoft, Albuquerque, Nova Mehika, ZDA). Kot statistično značilne smo upoštevali razlike med vzorci, kjer je bila vrednost $P \leq 0,05$.

Za pripravo rezultatov smo uporabili računalniška orodja Matlab (MathWorks, ZDA), Zen2010 (Carl Zeiss, Nemčija), Offline Analysis 2.1.0.10 (Till Photonics GmbH, Nemčija) in Photoshop (Adobe, ZDA).

3.2.12 Bioinformatična analiza

Za bioinformatično analizo potencialnih kandidatov GPCR, ki bi lahko imeli vlogo pri regulaciji aerobne glikolize v astrocitih smo uporabili javno dostopno bazo podatkov (Uniprot 2019). Podatki za vseh 249 potencialnih kandidatov GPCR so predstavljeni v Preglednici 6.

3.2.13 Transkriptom astrocitov

Z uporabo podatkov transkriptoma glije, nevronov in žilnih celic možganske skorje smo izvozili podatke za 36 GPCR sirot (Preglednica 7) (Zhang in sod., 2014).

3.2.14 Primerjava sekvenc RNA astrocitov divjega tipa in astrocitov z izbitim genom za GPR81

Podatke za primerjavo izražanja genov GPCR v astrocitih divjega tipa (WT) in astrocitih, ki so imeli izbit gen za GPR81 (GPR81KO) smo pridobili iz predhodne študije (Vardjan in sod., 2018). Diferencialno izraženi geni so predstavljeni v Preglednici 8.

3.2.15 Evklidska razdalja podatkov vezavne energije agonistov GPR81

Za določitev novih potencialnih kandidatov za receptorje GPCR, smo ocenili vezavno energijo agonistov GPR81: L-laktata (Ahmed in sod., 2009), 3Cl-5OH-BA (Dvorak in sod., 2012) in 4-metil-N-(5-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-oksoetil)-4-(2-tienil)-1,3-tiazol-2-il)cikloheksankarboksilamid – Compound 2, ki zvečajo koncentracijo cAMP v astrocitih WT in astrocitih GPR81KO (Vardjan in sod., 2018). Vezavne energije vseh treh agonistov smo izračunali za vsak protein GPCR (Preglednica 5) in dobili 3 vrednosti za vsak protein GPCR, ki smo jih predstavili v 3-dimenzionalnem Evklidskem prostoru, ki predstavlja geometrijsko razdaljo v večdimenzionalnem prostoru, določeno z enačbo:

$$R = \sum \sqrt{x_i^2} \quad \dots(3)$$

Vrednost x_i predstavlja normalizirano vrednost vezavne energije med receptorjem in ligandom, ki smo jo dobili s programom Autodock Vina (Trott in Olson, 2010), ki v svojem lokalnem postopku optimizacije uporablja sofisticirano metodo optimizacije gradienta. S surovimi podatki vezavnih energij za vsak ligand in receptor smo ocenili v petdesetih tehničnih replikah (poskus *in silico*), kjer je bila v vsaki repliki sprejeta le najnižja vrednost in uporabljena za nadaljnji izračun povprečne vrednosti. Dobljene povprečne vrednosti smo normalizirali z enačbo:

$$X' = \frac{(X - X_{\min})}{(X_{\max} - X_{\min})} \quad \dots(4)$$

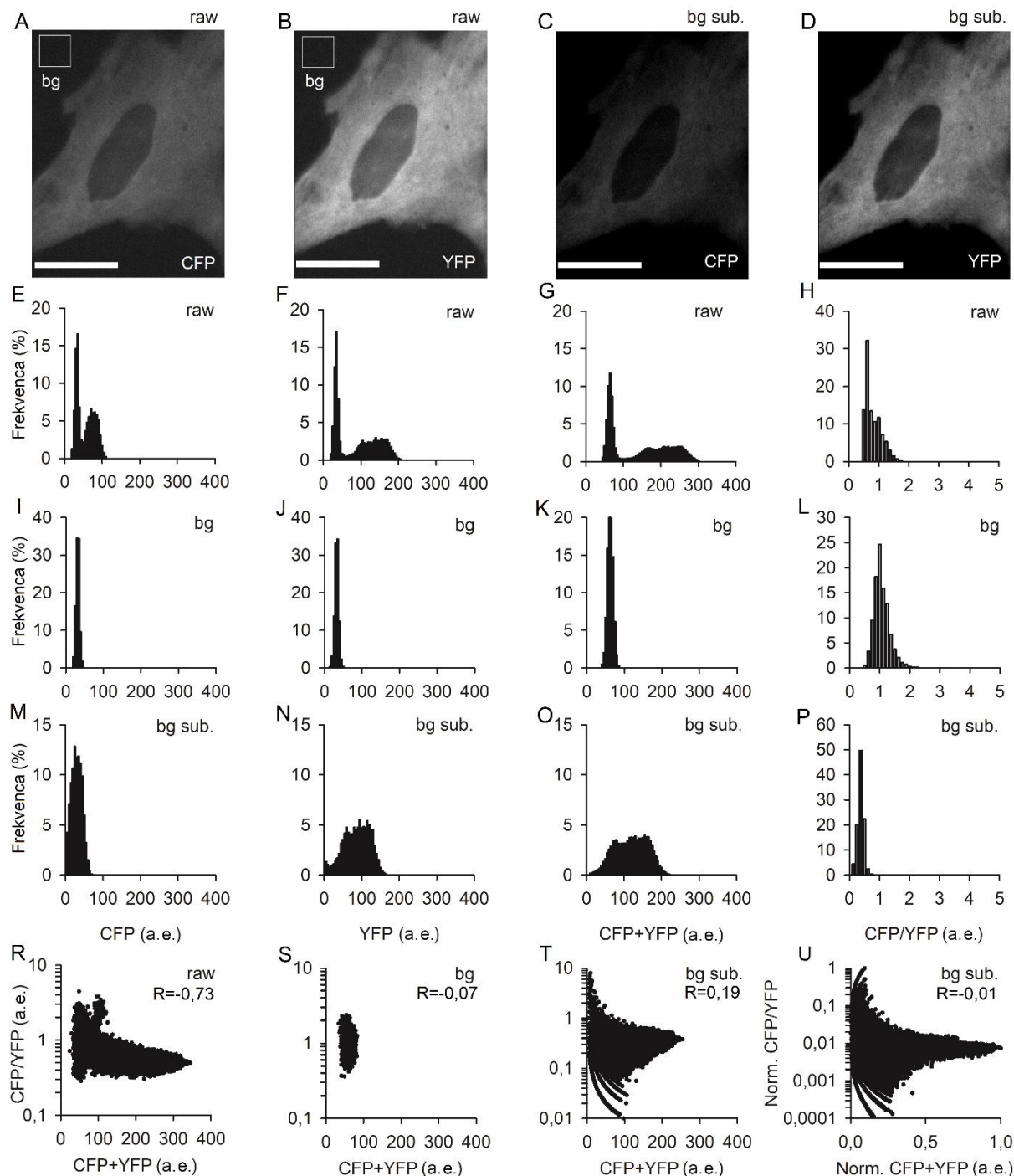
Kristalne strukture proteinov GPCR smo prenesli iz baze podatkov GPCRdb (Munk in sod., 2016). Dobljene podatke smo nato predstavili v kartezijskem koordinatnem sistemu. Na kratko, kartezijske koordinate določajo točko v n-dimenzionalnem evklidskem prostoru za katerokoli n-dimenzijo (Brannan in sod., 1999). Kot evklidske razdalje smo uporabili normalizirane vrednosti surovih vezavnih energij za vsak protein GPCR. Kriterij za sprejem domnevne interakcije med ligandom in receptorjem smo definirali kot evklidsko razdaljo, ki je bila nižja ali enaka evklidski razdalji GPR81 v prej omenjenem 3-dimenzionalnem kartezijskem prostoru (Preglednica 9).

4 REZULTATI

4.1 RAZMERJE SIGNALA FRET JE NEODVISNO OD KOLIČINE NANOTENZORJA FRET V CITOSOLU

Razmerjemerne meritve fluorescence označevalcev so v temelju neodvisne od artefaktov, ki so povezani z volumsko heterogeno porazdelitvijo nanosenzorja znotraj celice (G Grynkiewicz, 1985). To smo preverili pri skupno osmih astrocitih, ki so bili transfecirani z nanosenzorjem FRET Epac1-camps. Pri tem smo izračunali Pearsonov koeficient korelacije (R) med normalizirano vsoto intenzitet fluorescence kanalov CFP in YFP (CFP + YFP), ki je sorazmerna količini fluoroforja v celici, ter normaliziranim razmerjem kanalov CFP in YFP (CFP/YFP), meritev, ki predstavlja koncentracijo znotrajceličnega cAMP, na ravni posameznih slikovnih pik izračunana vrednost R je znašala -0,01 (Slika 4U; $n = 492097$ slikovnih pik). Tako lahko zaključimo, da med omenjenima parametroma ni korelacije, torej sta parametra neodvisna, kar je skladno z že objavljenim (G Grynkiewicz, 1985). To tudi pomeni, da regijsko specifične razlike v količini nanosenzorja ne vplivajo na meritve koncentracije znotrajceličnega cAMP, prek razmerjemerne metode.

Astroцити

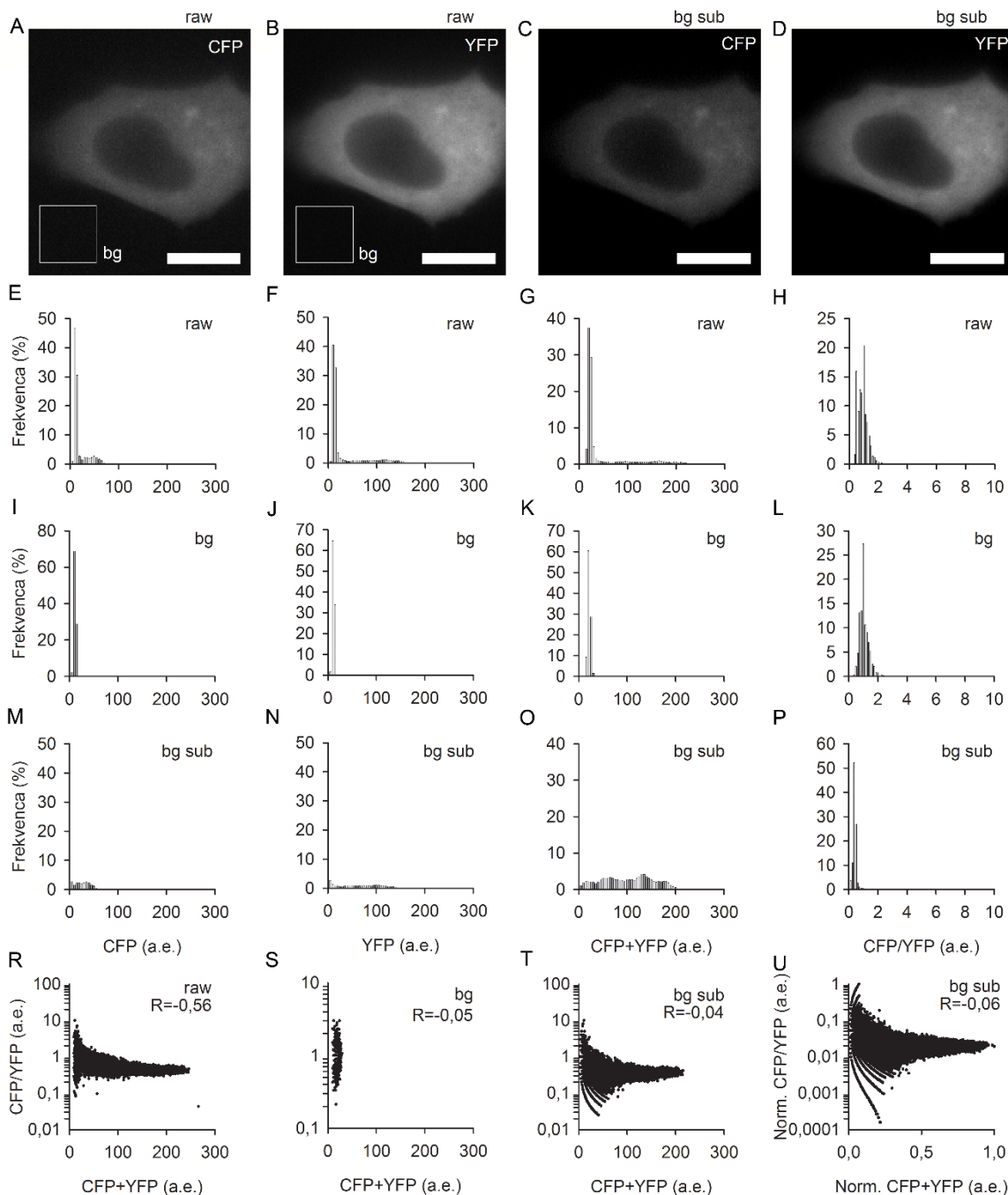


Slika 4: Korelacija med količino fluoroforjev in razmerjem intenzitete fluorescence kanalov CFP in YFP, v astrocitih. (A-D) Mikroskopske slike fluorescence signalov (A) CFP in (B) YFP v astrocitih transfeciranih z nanosenzorjem Epac1-camps, v mirovanju, (A, B) pred in (C, D) po odštetju fluorescence ozadja (okvir 50 x 50 slikovnih pik; bg). Merilo 20 μ m. Histogrami frekvence porazdelitev fluorescence slikovnih pik kanalov CFP, YFP, CFP + YFP in CFP/YFP, brez odštevanja fluorescence ozadja (raw), (I-L) ozadja (bg) in (M-P) z odštetim ozadjem (bg sub.). (R-T) Primerjava korelacij med vsoto kanalov CFP + YFP in razmerjem kanalov CFP/YFP, (R) brez odštevanja ozadja (raw), (S) ozadje (bg) in (T) z odštetim ozadjem (bg sub.). (R) Pearsonov koeficient korelacije je pokazal negativno korelacijo med vsoto kanalov CFP + YFP in razmerjem kanalov CFP/YFP, ki se je po

odštetju (S) ozadja (T) izničila. (U) Primerjava normaliziranih podatkov vsote kanalov CFP + YFP in razmerja kanalov CFP/YFP pri mikroskopskih slikah z odštetim ozadjem, v 8 astrocitih, transfeciranih z nanosenzorjem Epac1-camps. Sodeč po Pearsonovem koeficientu korelacije ($R=-0,01$), korelacija vseh slikovnih pik ni prisotna ($n = 492097$ slikovnih pik).

Metodo določanja heterogenosti $[cAMP]_i$ smo ponovili tudi pri osmih celicah 3T3, ki so bile transfecirane z nanosenzorjem FRET Epac1-camps. Vrednost R je znašala $-0,06$ (Slika 5U; $n = 151859$ slikovnih pik). Rezultati tudi na tem celičnem tipu kažejo, da je razmerjemerna metoda meritve cAMP neodvisna od količine nanosenzorja v različnih predelih celice in njegove volumnske porazdelitve.

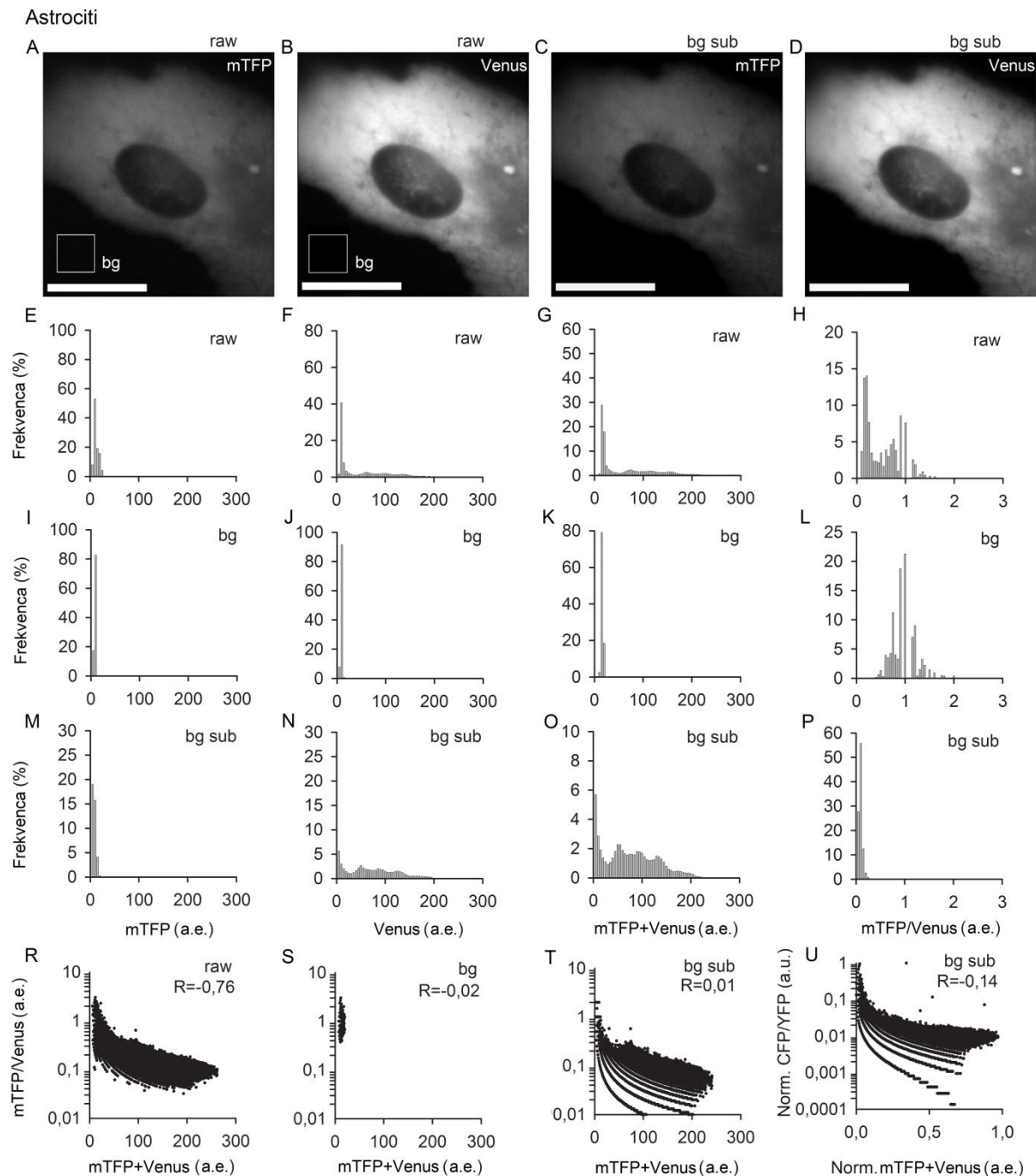
Celice 3T3



Slika 5: Korelacija med količino fluoroforjev in razmerjem intenzitete fluorescence kanalov CFP in YFP, v celicah 3T3. (A-D) Mikroskopske slike fluorescence signalov (A) CFP in (B) YFP v celicah 3T3 transfeciranih z nanosenzorjem Epac1-camps, v mirovanju, (A, B) pred in (C, D) po odšetju fluorescence ozadja (okvir 50 x 50 slikovnih pik; bg). Merilo 20 μm . Histogrami frekvence porazdelitev fluorescence slikovnih pik kanalov CFP, YFP, CFP + YFP in CFP/YFP, brez odštevanja fluorescence ozadja (raw), (I-L) ozadja (bg) in (M-P) z odštetim ozadjem (bg sub.). (R-T) Primerjava korelacij med vsoto kanalov CFP + YFP in razmerjem kanalov CFP/YFP, (R) brez odštevanja ozadja (raw), (S) ozadje (bg) in (T) z odštetim ozadjem (bg sub.). (R) Pearsonov koeficient korelacije je pokazal negativno korelacijo med vsoto kanalov CFP + YFP in razmerjem kanalov CFP/YFP, ki se je po odšetju (S) ozadja (T) izničila. (U) Primerjava normaliziranih podatkov vsote kanalov CFP + YFP in razmerja kanalov CFP/YFP

pri mikroskopskih slikah z odštetim ozadjem, v 8 celicah 3T3, transfeciranih z nanosenzorjem Epac1-camps. Sodeč po Pearsonovem koeficientu korelacije ($R=-0,06$), korelacija vseh slikovnih pik ni prisotna ($n = 151859$ slikovnih pik).

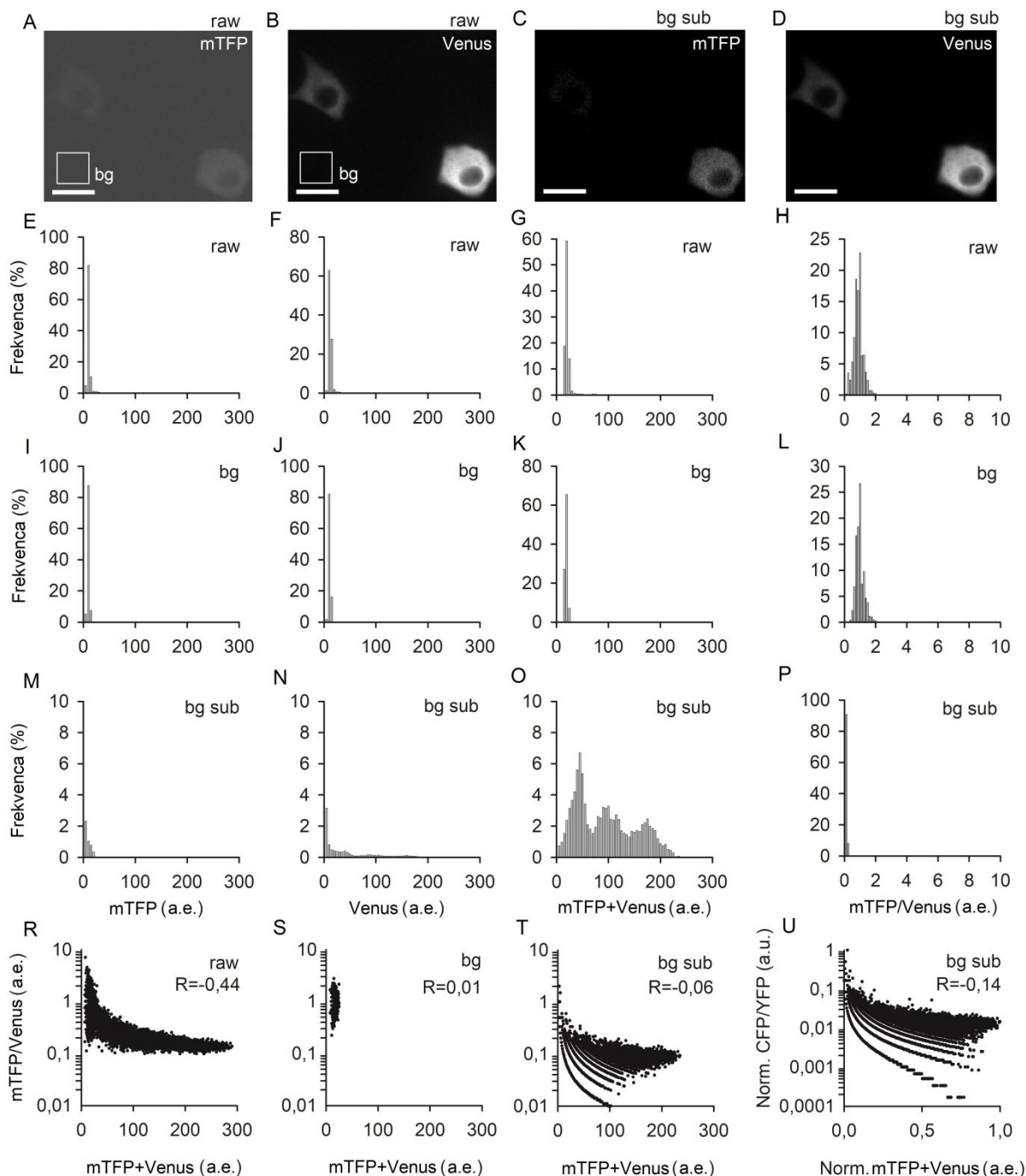
Neodvisnost razmerjemernih meritev fluorescence označevalcev od volumskih artefaktov smo preverili pri petih astrocitih in osmih celicah 3T3, transfeciranih z nanosenzorjem Laconic. Izračunali smo Pearsonov koeficient korelacije med normalizirano vsoto kanalov mTFP in Venus ($mTFP + Venus$), ki je sorazmerna količini fluoroforjev v celici in normaliziranim razmerjem kanalov mTFP in Venus ($mTFP/Venus$), ki predstavlja koncentracijo znotrajceličnega L-laktata. V primeru Pearsonovega koeficienta korelacije pri astrocitih je vrednost R znašala $-0,15$ (Slika 6U; $n = 183725$ slikovnih pik), v primeru celic 3T3 pa $0,14$ (slika 7U; $n = 18531$ slikovnih pik). To je potrdilo naše domneve, da je naša metoda meritev L-laktata neodvisna od volumske porazdelitve nanosenzorja Laconic.



Slika 6: Korelacija med količino fluoroforjev in razmerjem kanalov mTFP in Venus, v astrocih. (A-D) Mikroskopske slike fluorescence signalov (A) mTFP in (B) Venus v astrocih transfekiranih z nanosenzorjem Laconic, v mirovanju, (A, B) pred in (C, D) po odštevanju fluorescence ozadja (okvir 50 x 50 slikovnih pik; bg). Merilo 20 μ m. Histogrami frekvence porazdelitev fluorescence slikovnih pik kanalov mTFP, Venus, mTFP + Venus in mTFP/Venus, brez odštevanja fluorescence ozadja (raw), (I-L) ozadja (bg) in (M-P) z odštetim ozadjem (bg sub.). (R-T) Primerjava korelacij med vsoto kanalov mTFP + Venus in razmerjem kanalov mTFP/Venus, (R) brez odštevanja ozadja (raw), (S) ozadja (bg) in (T) z odštetim ozadjem (bg sub.). (R) Pearsonov koeficient korelacije je pokazal negativno korelacijo med vsoto kanalov mTFP + Venus in razmerjem kanalov mTFP/Venus, ki se je po odštevanju (S) ozadja (T) izničila. (U) Primerjava normaliziranih podatkov vsote kanalov mTFP + Venus in razmerja kanalov

mTFP/Venus pri mikroskopskih slikah z odštetim ozadjem, v 5 astrocitih, transfeciranih z nanosenzorjem Laconic. Sodeč po Pearsonovem koeficientu korelacije ($R=-0,14$), korelacija vseh slikovnih pik ni prisotna ($n = 183725$ slikovnih pik).

Celice 3T3



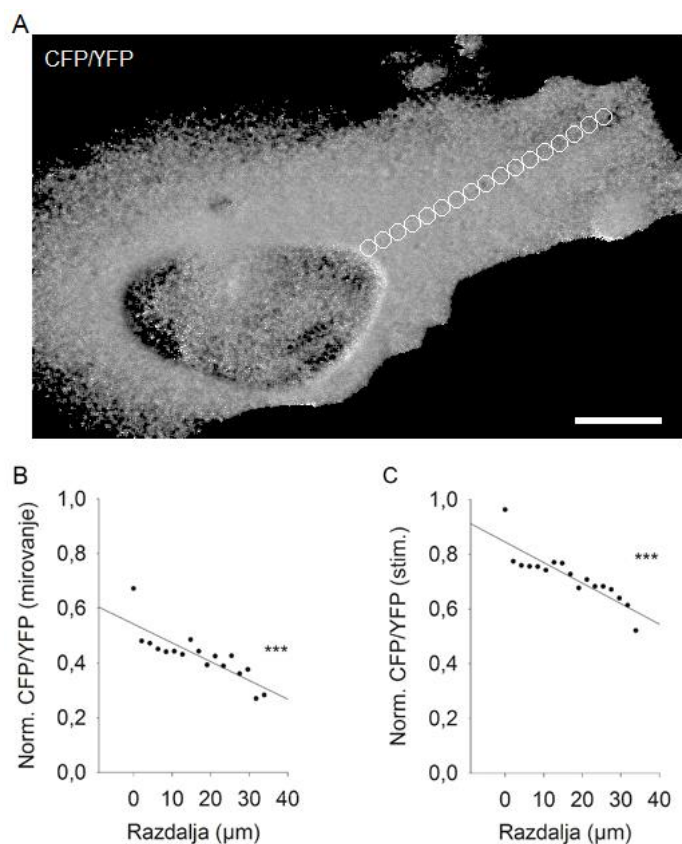
Slika 7: Korelacija med količino fluoroforjev in razmerjem kanalov mTFP in Venus, v celicah 3T3. (A-D) Mikroskopske slike fluorescence signalov (A) mTFP in (B) Venus v celicah 3T3 transfeciranih z nanosenzorjem Laconic, v mirovanju, (A, B) pred in (C, D) po odštetju fluorescence ozadja (okvir 50 x 50 slikovnih pik; bg). Merilo 20 μ m. Histogrami frekvence porazdelitev fluorescence slikovnih pik kanalov mTFP, Venus, mTFP + Venus in mTFP/Venus, brez odštevanja fluorescence ozadja (raw), (I-

L) ozadja (bg) in (M-P) z odštetim ozadjem (bg sub.). (R-T) Primerjava korelacij med vsoto kanalov mTFP + Venus in razmerjem kanalov mTFP/Venus, (R) brez odštevanja ozadja (raw), (S) ozadje (bg) in (T) z odštetim ozadjem (bg sub.). (R) Pearsonov koeficient korelacije je pokazal negativno korelacijo med vsoto kanalov mTFP + Venus in razmerjem kanalov mTFP/Venus, ki se je po odštetju (S) ozadja (T) izničila. (U) Primerjava normaliziranih podatkov vsote kanalov mTFP + Venus in razmerja kanalov mTFP/Venus pri mikroskopskih slikah z odštetim ozadjem, v 8 celicah 3T3, transfeciranih z nanosenzorjem Laconic. Sodeč po Pearsonovem koeficientu korelacije ($R=-0,14$), korelacija vseh slikovnih pik ni prisotna ($n = 18531$ slikovnih pik).

4.2 PODCELIČNA HETEROGENOST PORAZDELITVE $[cAMP]_i$ V ASTROCITIH IN CELICAH 3T3

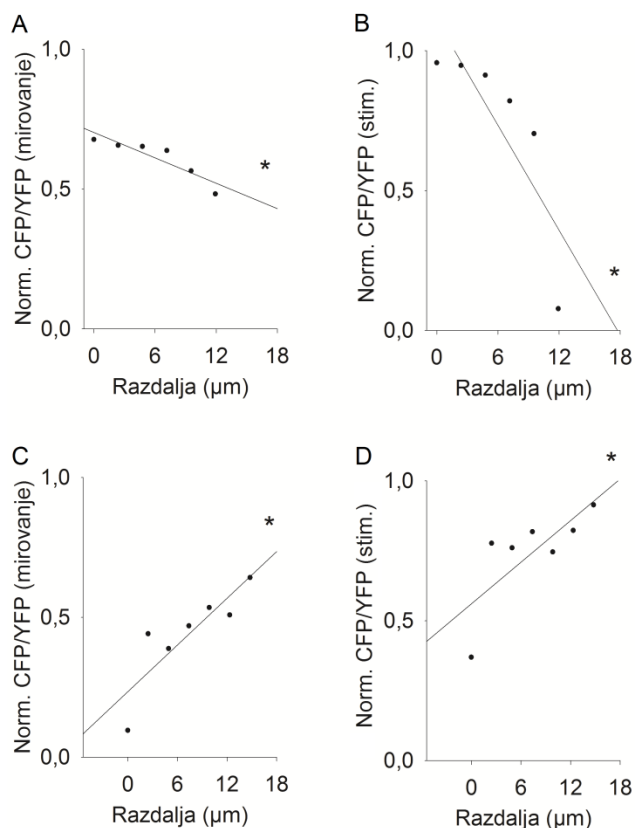
Za ugotavljanje heterogene porazdelitve $[cAMP]_i$ smo analizirali majhne regije zanimanja, postavljene v ravni vrsti pravokotno od jedra v smeri proti obrobju celice (Slika 8A). V regijah zanimanja smo analizirali časovno-odvisne spremembe v razmerju CFP/YFP, pred in po stimulaciji z NA. Časovna odvisnost razmerja CFP/YFP v regijah zanimanja je bila podobna kot pri analizi celotne celice.

Analiza sprememb v regijskem razmerju mirovnih signalov CFP/YFP od jedra proti periferiji smo opazili statistično značilno spremembo v 8 astrociti (11/16 smeri; Preglednica 1). Reprezentativni primer znižanja $[cAMP]_i$ v astrociti je prikazan na Sliki 8B in 8C.



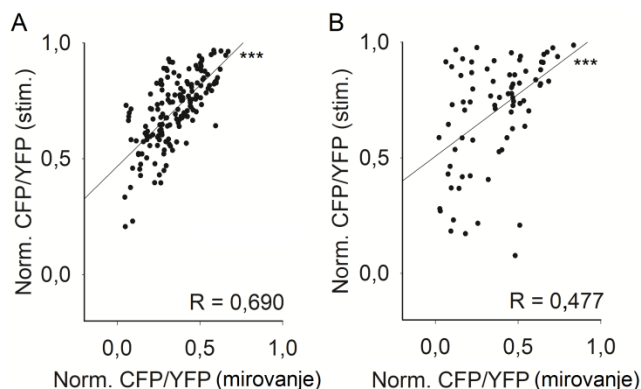
Slika 8: Analiza majhnih regij cAMP zanimanja v astrocitu. (A) Mikroskopska slika razmerja kanalov CFP/YFP in majhnih krožnih regij zanimanja (premer 2 μm) od jedra proti periferiji celice. Spremembe v razmerju CFP/YFP, sorazmerne spremembam v $[\text{cAMP}]_i$, (B) v mirovanju in (C) po stimulaciji s 100 μM NA, v odvisnosti od razdalje od jedra proti periferiji celice. Prikazana sta reprezentativna naklona ($P \leq 0,001$; Studentov t-test). Merilo 10 μm .

V celicah 3T3 ($n = 8$) je bilo statistično značilnih sprememb manj (5/16 smeri; Preglednica 2), od tega so bili trije statistično značilni padci in dva primera statistično značilne rasti podcelične $[\text{cAMP}]_i$ v mirovanju. V primeru prisotnosti negativnega ali pozitivnega trenda signala CFP/YFP od jedra proti periferiji celic v mirovanju (Slika 9A, C), smo v enaki celici opazili enak trend tudi po stimulaciji s 100 μM NA (Slika 9B, D). Ti rezultati kažejo na domnevno soodvisnost med subcelično lokalizacijo $[\text{cAMP}]_i$ pred in po stimulaciji z NA.



Slika 9: Analiza majhnih regij cAMP zanimanja v celici 3T3. (A) Spremembe v razmerju CFP/YFP, sorazmerne spremembam v $[cAMP]_i$, (A, C) v mirovanju in (B, D) po stimulaciji s $100 \mu M$ NA, v odvisnosti od razdalje od jedra proti periferiji celice. Prikazani so reprezentativni nakloni ($P \leq 0,05$; Studentov t-test).

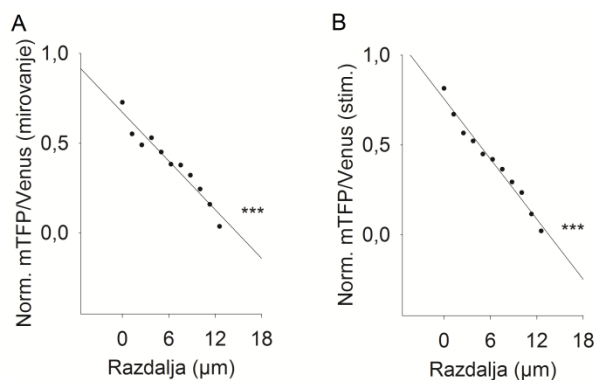
V nadaljevanju smo za vsak tip celic korelirali normalizirane vrednosti razmerja CFP/YFP v mirovanju, z vrednostmi razmerja CFP/YFP po stimulaciji; ločeno za astrocite ($n = 160$; Preglednica 1) in za celice 3T3 ($n = 81$; Preglednica 2) (Slika 10A, B). V obeh tipih celic smo zaznali statistično značilno pozitivno korelacijo ($R_{astro} = 0,690$; $P \leq 0,001$; Slika 10A in $R_{3T3} = 0,477$, $P \leq 0,001$; Slika 10B). Ti rezultati kažejo, da mikrodomene z nižjo koncentracijo cAMP dosežejo relativno manjše zvečanje $[cAMP]_i$ po stimulaciji, mikrodomene z relativno večjo $[cAMP]_i$ v mirovanju pa dosežejo proporcionalno večjo $[cAMP]_i$ po stimulaciji. Slika 10A predstavlja heterogenost porazdelitve cAMP v celicah astrocitov, Slika 10B pa heterogenost porazdelitve cAMP v celicah 3T3.



Slika 10: Podcelična heterogenost cAMP v astrociti in celicah 3T3. Grafa predstavljata primerjavi normaliziranih vrednosti razmerij CFP/YFP v mirovanju in po stimulaciji z 100 μ M NA, (A) v astrociti in (B) v celicah 3T3. V obeh primerih je prisotna statistično značilna pozitivna korelacija podatkov ($P \leq 0,001$; Studentov t-test).

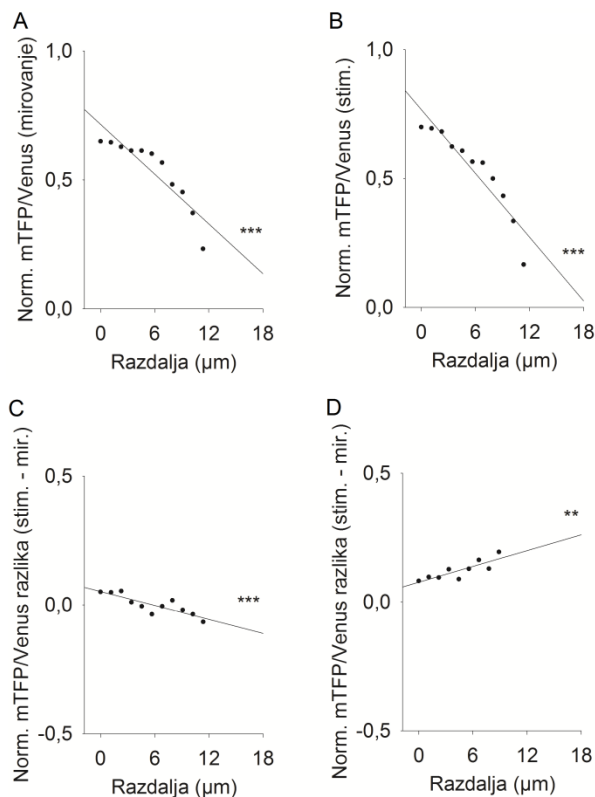
4.3 PODCELIČNA HETEROGENOST PORAZDELITVE KONCENTRACIJE L-LAKTATA ([L-LAKTAT]_i) V ASTROCITIH IN CELICAH 3T3

Kakor pri določanju podcelične heterogenosti [cAMP]_i, smo enako postopali pri določanju heterogenosti morebitne celične porazdelitve [L-laktat]_i. Analizirali smo majhne krožne regije zanimanja (premer 2 μ m), položene linearno pravokotno od jedrnega roba proti obrobju celice. Pri tem smo uporabili nanosenzor FRET Laconic, ki poroča o spremembah [L-laktat]_i (signalu mTFP/Venus) v realnem času (Metode). V mirovanju smo pri astrociti (n = 5) opazili statistično značilno spremembo v signalu mTFP/Venus v regijah med jedrom in celičnim obrobjem astrocitov (9/10 smeri; Preglednica 3) in pri celicah 3T3 (8/16 smeri; Preglednica 4). V vseh primerih je bil prisoten negativen trend, kar bi lahko pomenilo, da se [L-laktat]_i v mirovanju celic znižuje v smeri od jedra proti celičnemu obrobju (Slika 11A in Slika 12A). Enak trend smo v obeh tipih celic opazili tudi po stimulaciji z agonistom Smart009 (konc. 1 mM; Slika 11B in konc. 5 μ M; Slika 12B). Ti rezultati kažejo na domnevno soodvisnost med vrednostjo [L-laktat]_i v neki točki v mirovanju in po stimulaciji s Smart009.



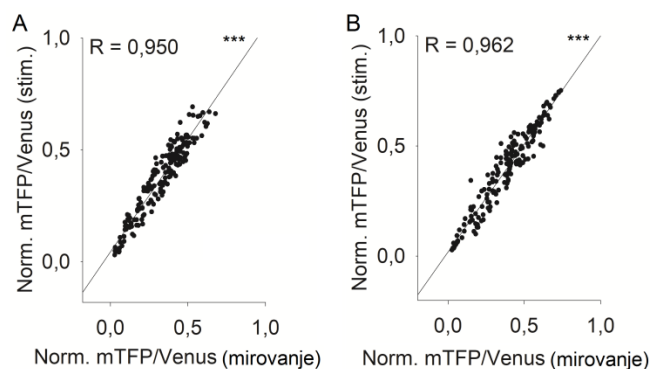
Slika 11: Analiza majhnih krožnih regij zanimanja (premer 2 μ m) v astrocitu. Spremembe v razmerju mTFP/Venus, sorazmerne spremembam v [L-laktat]_i, (A) v mirovanju in (B) po stimulaciji s Smart009 (1 μ M). Prikazana sta reprezentativni odvisnosti posneti v enem astrocitu ($P \leq 0,001$; Studentov t-test).

Dodatno smo analizirali tudi, če se intenziteta regijskih odzivov na stimulacijo s Smart009 spreminja v odvisnosti od oddaljenosti od jedra proti celičnemu obrobju. Podatke iz posameznih krožnih regij zanimanja smo primerjali tako, da smo pri vsakem tipu celic odšteli vrednosti signala mTFP/Venus v mirovanju od vrednosti signala mTFP/Venus po stimulaciji astrocitov z 1mM Smart009 in celic 3T3 s 5 μ M Smart009. Razlike smo primerjali z oddaljenostjo od jedra in na podatkih z linearno regresijo določili parameter premice $y = k * x + n$, kjer y predstavlja razliko med razmerjem mTFP/Venus po stimulaciji in razmerjem mTFP/Venus v mirovanju; x je oddaljenost od jedra (μ m); k je naklon regresijske premice (μ m⁻¹); n je presečišče z osjo y . Linearna funkcija je v obeh tipih celic pokazala relativno majhen, ampak statistično značilen naklon. Ta predstavlja prostorsko porazdelitev intenzitete produkcije L-laktata. V primeru astrocitov smo statistično značilni padec opazili pri veliki večini analiziranih smeri regijskih območij (9/10 smeri; Preglednica3). V celicah 3T3 je bilo statistično značilnih sprememb manj (6/16 smeri; Preglednica 4), od tega so bili štirje statistično značilni padci in dva primera statistično značilne rasti prostorsko porazdeljene podcelične sinteze L-laktata. Reprezentativna naklona prikazana na Sliki 12C, D.



Slika 12: Analiza majhnih krožnih regij zanimanja (premer 2 μ m) v celicah 3T3. Spremembe v razmerju mTFP/Venus, sorazmerne spremembam v [L-laktat]_i, (A) v mirovanju in (B) po stimulaciji s Smart009 (5 μ M). Prikazana sta reprezentativna naklona ($P \leq 0,001$; Studentov t-test). (C, D) Primerjava razlike med normaliziranimi vrednostmi razmerja mTFP/Venus po stimulaciji in v mirovanju (razlika = stimulacija – mirovanje). Prikazana sta reprezentativna naklona (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; Studentov t-test).

V nadaljevanju smo za vsak tip celic primerjali vse normalizirane vrednosti razmerja mTFP/Venus v mirovanju z vrednostmi po stimulaciji; ločeno za astrocite ($n = 186$) (Slika 13A) in za celice 3T3 ($n = 173$) (Slika 13B). V obeh tipih celic smo zaznali statistično značilno pozitivno korelacijo ($R_{\text{astro}} = 0,950$ in $R_{3T3} = 0,962$). Ti rezultati kažejo, da mikrodomene z nižjim $[L\text{-laktat}]_i$ dosežejo relativno nižje vrednosti $[L\text{-laktat}]_i$ po stimulaciji, mikrodomene z relativno višjo $[L\text{-laktat}]_i$ v mirovanju pa dosežejo relativno višji $[L\text{-laktat}]_i$ po stimulaciji.



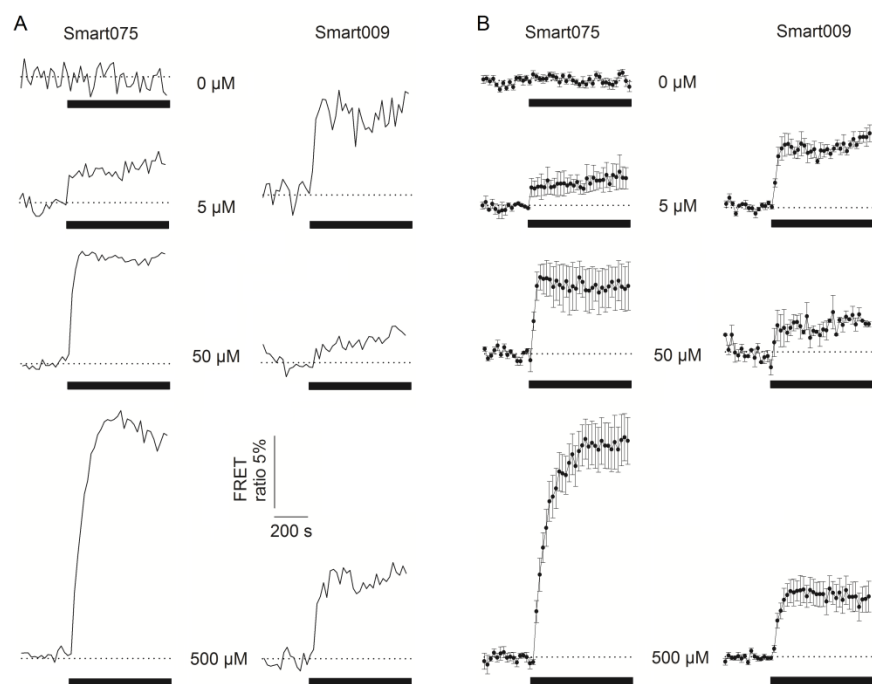
Slika 13: Podcelična heterogenost koncentracije L-laktata ($[L\text{-laktat}]_i$) v astrocitih in celicah 3T3. Grafa predstavljata primerjavo normaliziranih vrednosti razmerij mTFP/Venus v mirovanju in po stimulaciji s Smart009, (A) v astrocitih in (B) v celicah 3T3. V obeh primerih grafov je prisotna statistično značilna pozitivna korelacija ($P \leq 0,001$; Studentov t-test).

4.4 RAZLIKE V ČASOVNO-ODVISNIH SPREMEMBAH CITOSOLNE KONCENTRACIJE L-LAKTATA ($[L\text{-laktat}]_i$) V CELICAH 3T3, POVZROČENE Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI MOLEKUL SMART075 ALI SMART009

Znotrajcelični L-laktata $[L\text{-laktat}]_i$ je predhodno povezan s spremembami znotrajceličnega sekundarnega prenašalca cAMP $[cAMP]_i$, saj je bilo pokazano, da se ob dodatku NA, ki aktivira receptorje GPCR na površini celic, zveča $[cAMP]_i$, posledično pa tudi $[L\text{-laktat}]_i$ (Vardjan in sod., 2018). Zaradi pozitivne povratne zanke se ob dodatku zunajceličnega L-laktata, aktivirajo laktatni receptorji, ki so neznani, in tudi lahko zvečajo $[L\text{-laktat}]_i$ (Vardjan in sod., 2018), a narava tega receptorja ni znana. Ta pojav je bil opisan kot "presnovna vzdražnost" (Vardjan in sod., 2018). Zelo verjetno je, da pri tem procesu ne sodeluje klasični L-laktatni receptor GPR81, saj so agonisti za ta receptor v astrocitih brez tega receptorja tudi zvečali $[L\text{-laktat}]_i$ (Vardjan in sod., 2018). Da bi identificirali novi L-laktatni, še nepoznani, receptor, smo uporabili celice 3T3 (divji tip – 3T3WT), transfecirane z nanosenzorjem Laconic, in testirali ali predhodno uporabljeni selektivni agonist za GPR81 Smart075 (Dvorak in sod., 2012) in ligand Smart009, ki je bil določen z metodami molekulske dinamike *in silico* (Zorec, 2018), stimulirata zvečanje $[L\text{-laktat}]_i$ pri koncentracijah 5, 50 in 500 μM . Reprezentativne časovno-odvisne učinke obeh ligandov na $[L\text{-laktat}]_i$ prikazuje Slika 14A, povprečne vrednosti spremembe v $[L\text{-laktat}]_i$ vseh celic v raziskavi pa Slika 14B. Frekvence odzivnosti celic so prikazane v Preglednici 5. Obe molekuli Smart sodita

v družino 3-hidroksi-5-substituiranih benzojskih kislin in imata podobne značilnosti sprožitve časovno odvisnih sprememb znotrajceličnega L-laktata, kot NA; začetna faza poteka z eksponentno rastjo, ki ji sledi faza stacionarnega stanja, kjer [L-laktat]_i doseže plato (Vardjan in sod., 2018), kar smo merili z integriranjem časovnega odziva po dodatku ligandov (angl. area under curve – AUC, Metode).

Po stimulaciji celic 3T3WT z molekulami Smart, smo opazili razliko v amplitudi stacionarnega stanja v [L-laktat]_i pri različnih koncentracijah. V primeru stimulacije s Smart075 smo izmerili korelirano zvečanje v [L-laktat]_i pri zvečani koncentraciji agonista (Slika 14A). Pri ligandu Smart009 je bila dozna odvisnost odzivov bolj zapletena, saj smo opazili zvečane amplitude stacionarnega stanja in zvečano frekvenco odzivnosti pri relativno nizki koncentraciji (5 do 10 μ M) in potem pri koncentracijah višjih od 100 μ M. Pri koncentraciji 50 μ M so bili odzivi celic zmanjšani v amplitudi in v frekvenci odzivnosti: pri 5 μ M (AUC = $8,55 \pm 1,34$ %, n=81) večji kot pri 50 μ M (AUC=0,46 $\pm$ 0,64, n=26; Slika 14B, Razpredelnica 5). Pri koncentracijah Smart009 nad 500 μ M je [L-laktat]_i pričel eksponentno naraščati (Slika 15B).

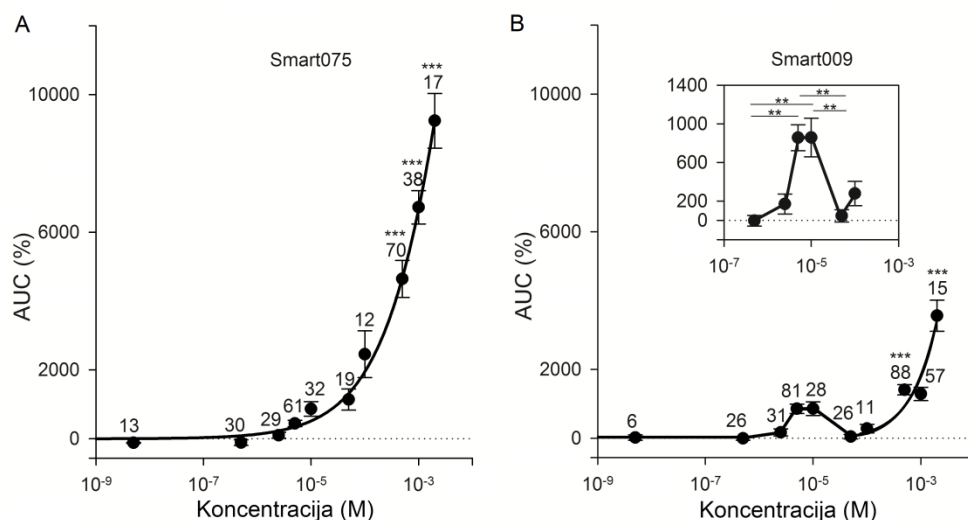


Slika 14: Časovno-odvisne spremembe znotrajcelične koncentracije L-laktata ([L-laktat]_i) v celicah 3T3WT, povzročene s Smart075 ali Smart009. (A) Reprezentativni in (B) povprečni odzivi [L-laktat]_i, ki smo jih izmerili kot razmerje med kanaloma mTFP/Venus. Število stimuliranih celic na sliki B (Smart075/Smart009): pri 0 μ M (n = 30); 5 μ M (n = 61/80); 50 μ M (n = 19/26) in pri 500 μ M (n = 77/88). (B) povprečni odzive s standardno napako (s.n.). Koncentracije uporabljenih agonistov so zapisane na sredini obeh panelov. Za negativno kontrolo smo dodali ZCR (0 μ M). Procenti odzivnosti celic so prikazani v Preglednici 5.

4.5 PRIMERJAVA DOZNE ODVISNOSTI SPREMEMB CITOSOLNE KONCENTRACIJE L-LAKTATA ([L-LAKTAT]_i) PO STIMULACIJI S SMART075 ALI SMART009 V CELICAH 3T3WT

Za boljšo predstavitev razlik v odzivih ob stimulaciji celic z molekulama Smart, smo v nadaljevanju naredili krivuljo dozne odvisnosti (Slika 15). Krivulji prikazujeta odvisnost med celičnimi odzivi v [L-laktat]_i in koncentracijo ligandov, kjer posamezne točke prikazujejo povprečno, integrirano površino pod krivuljo izmerjenih odzivov (Slika 15), prikazanih kot AUC (glej Metode). Pri stimulaciji s Smart075 dozno odvisnost oriše sigmoidna funkcija, kjer je koncentracija, ki povzroči 50 % maksimalnega učinka približno 300 μ M (Slika 15A). Pri stimulaciji s Smart009 prilagajanje sigmoidne funkcije ni bilo mogoče, saj so se po predhodnem zvečanju odzivov celic pri koncentraciji 5-10 μ M, le-ti močno prehodno zmanjšali pri 50 μ M in potem spet zvečevali do koncentracije 500 μ M (Slika 15B).

Rezultati na Sliki 14 in 15 kažejo, da sta učinkovitosti molekul Smart075 in Smart009 zelo različni. Pri prvi molekuli dozna odvisnost kaže na preprostejši farmakološki mehanizem, kot v primeru delovanja molekule Smart009, kjer sta vsaj dva vrhova v odvisnosti (Slika 14B), ki kaže na vpletenost vsaj dveh receptorskih mehanizmov delovanja na spremembe [L-laktat]_i v celicah 3T3WT. V nadaljevanju disertacije nas je zanimalo, kako določiti možne nove receptorje, ki uravnavajo [L-laktat]_i.



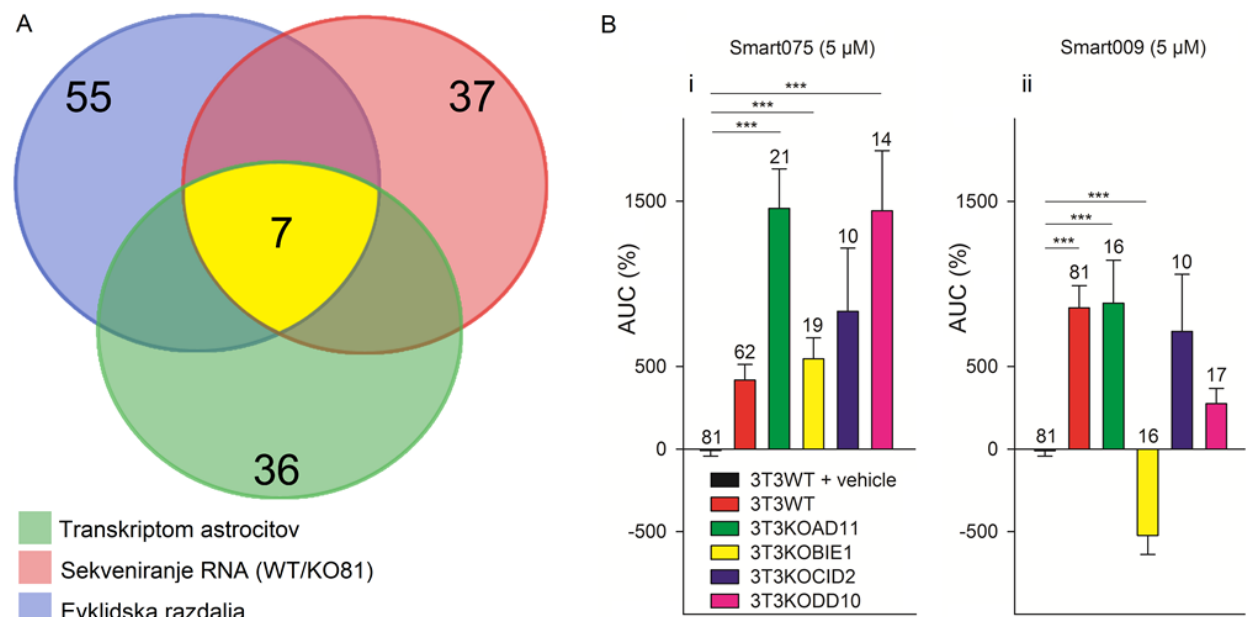
Slika 15: Dozne odvisnosti sprememb citosolne koncentracije L-laktata ([L-laktat]_i), po stimulaciji z molekulama Smart075 ali Smart009 v celicah 3T3WT. (A) Slika prikazuje dozno odvisnost po stimulaciji celic 3T3WT s Smart075. Točke predstavljajo povprečne vrednosti površine pod krivuljo (AUC; %) po stimulaciji s Smart075, merjenimi z nanosenzorjem Laconic (mTFP/Venus). Vrednosti po stimulaciji z 1 mM in 2mM koncentracijo so bile ločeno statistično različne od odzivov pri 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 250 nM, 500 nM, 5 nM in negativne kontrole (*** $P \leq 0,001$). Vrednosti pri stimulaciji 500 μ M so bile ločeno statistično značilne od koncentracij 5 μ M, 250 nM, 500 nM, 5 nM in negativne kontrole (*** $P \leq 0,001$). (B) Povprečne vrednosti AUC po stimulaciji celic 3T3WT s Smart009. Inset predstavlja vrhova odzivov pri koncentracijah 5 μ M in 10 μ M. Vrednosti po stimulaciji z 2 mM koncentracijo so bile ločeno statistično različne od koncentracij 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 500

nM, 5 nM in negativne kontrole (** $P \leq 0,001$). Vrednosti po stimulaciji z 1 mM so bile ločeno statistično različne od koncentracij 500 nM in kontrole (** $P \leq 0,001$). Vrednosti po stimulaciji z 500 μ M so bile ločeno statistično različne od koncentracij 50 μ M, 250 nM, 500 nM. 5 nM in negativne kontrole (** $P \leq 0,001$). Za testiranje statistične razlike smo uporabili enosmerno analizo variance (angl. "One-way" ANOVA) in Mann-Whitneyev test za primerjavo posameznih skupin (** $P \leq 0,001$). Števila testiranih celic so napisana ob krivuljah za vse testirane koncentracije.

4.6 KANDIDATI GPCR IN PREGLED ODZIVOV CELIC 3T3KO NA STIMULACIJO S SMART075 ALI SMART009

Znano je, da agonist Smart075 zveča [cAMP]_i in posledično tudi [L-laktat]_i v astrocitih divjega tipa, kot tudi v astrocitih z izbitim genom za GPR81 (GPR81KO) (Vardjan in sod., 2018). Ta rezultat je pokazal, da Smart075 vpliva na signalizacijo s cAMP in na aerobno glikolizo neodvisno od GPR81 (Vardjan in sod., 2018), verjetno prek novega, še neodkrita, receptorja. Kandidatne receptorske gene smo izbrali z bioinformatično analizo, ki je vključevala tri kriterije. Prvi kriterij je temeljil na genih GPCR, ki se izražajo v astrocitih (Zhang et al. 2014; Preglednica 7). Drugi kriterij je temeljil na podatkih predhodnega sekvenciranja RNA, kjer smo primerjali izražanje genov sirot GPCR v astrocitih divjega tipa in astrocitih z izbitim genom, ki nosi zapis za GPR81 (Vardjan et al., 2018; Preglednica 8). Tretji kriterij je temeljil na Evklidski razdalji (glej Metode) podatkov vezavne energije treh agonistov GPR81, L-laktata (Ahmed in sod., 2009), Smart075 (Dvorak in sod., 2012) in Compound 2 (Sakurai in sod., 2014) (Preglednica 8). S primerjavo teh treh podatkovnih nizov smo izbrali 7 kandidatnih GPCR genov (Slika 16A), trije so: *adrb3*, *lgr4*, *p2ry2*; štirje (*gprA*, *gprB*, *gprC*, *gprD*) imajo oznako v literaturi, da so receptorji GPCR "sirote" (angl. orphan), njihovi endogeni agonisti še niso znani.

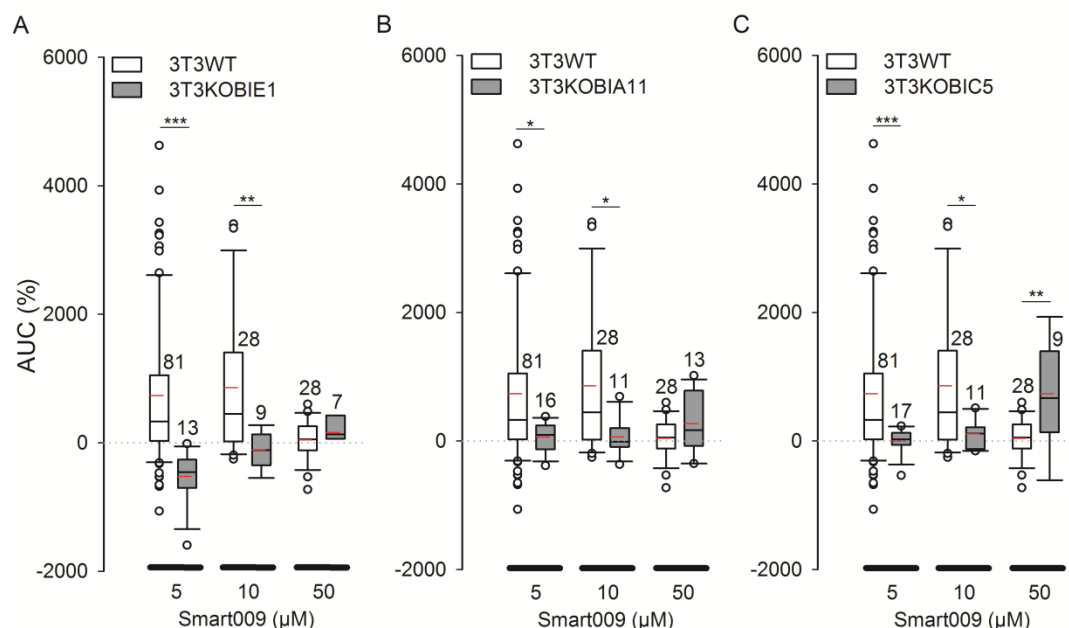
Za določitev receptorskega mehanizma ob stimulaciji celic s Smart075 in Smart009, smo uporabili 3T3 celične linije z izbitimi posameznimi geni za 4 kandidatne receptorje sirote (celice 3T3KO). Celične linije so bile generirane s tehniko CRISPR-cas9 (Vienna Bio Center, glej Metode). Glede na rezultate dozne odvisnosti stimulacije celic 3T3WT (Slika 15B, insert), smo sklepali, da iskani receptor posreduje zvečanje [L-laktat]_i pri stimulaciji s 5-10 μ M Smart009. Tako smo pri celicah 3T3KO ob stimulaciji s 5 μ M koncentracijo Smart009, pričakovali znižano spremembo [L-laktat]_i; v celicah z izbitim genom, ki naj bi bil kandidat za novi GPCR. Signifikantno razliko smo opazili pri celični liniji 3T3KOB (Slika 16B), kjer celice nosijo delecijo gena *gprB*, ki spada v družino zelo ohranjenih receptorskih genov izraženih v možganih (angl. super conserved receptor genes expressed in the brain - SREB) (Matsumoto in sod., 2000).



Slika 16: Presejanje kandidatov GPCR. (A) Vennov diagram predstavlja število kandidatov GPCR iz baz podatkov: Transkriptom astrocitov je vključeval podatke za ekspresijo GPCR sirot v astrocitih (Zhang in sod., 2014); Sekveniranje RNA je temeljilo na ekspresiji GPCR sirot v astrocitih divjega tipa in astrocitih z izbitim genom za GPR81 (KO81) (Vardjan in sod., 2018); Evklidska razdalja je predstavljala kandidate izbrane na podlagi najmanjše vezavne energije med receptorjem in ligandom, ter tridimenzionalne Evklidske razdalje, kjer smo preiskovali vezavne energije agonistov Smart075, Compound 2 in L-laktata. (B) Odzivi celic 3T3 z izbitimi geni GPRA, B, C in D na stimulacijo s 5 μ M Smart075 ali 5 μ M Smart009. (i) Primerjava povprečnih AUC (+ s.n.) po stimulaciji z (črn stolpec) negativno kontrolo in Smart075 (rdeči stolpec) celic 3T3WT, (zeleni stolpec) 3T3KOA, (rumeni stolpec) 3T3KOB, (modri stolpec) 3T3KOC, (roza stolpec) 3T3KOD. (ii) Primerjava povprečnih AUC (+s.n.) po stimulaciji z (črni stolpec) negativno kontrolo in Smart009 (rdeči stolpec) celic 3T3WT, (zeleni stolpec) 3T3KOA, (rumeni stolpec) 3T3KOB, (modri stolpec) 3T3KOC, (roza stolpec) 3T3KOD. Za testiranje statistične razlike smo uporabili enosmerno analizo variance (angl. "One-way ANOVA") in Mann-Whitneyev test za primerjavo posameznih skupin (***) $P \leq 0,001$. Števila testiranih celic so napisana na stolpcih za posamezne celice 3T3.

4.7 PRIMERJAVA SPREMENB CITOSOLNE KONCENTRACIJE L-LAKTATA ([L-LAKTAT]_i) PO STIMULACIJI S 5, 10 IN 50 μ M SMART009 NA CELICAH 3T3WT IN TREH RAZLIČNIH KLONIH CELIC 3T3KOB

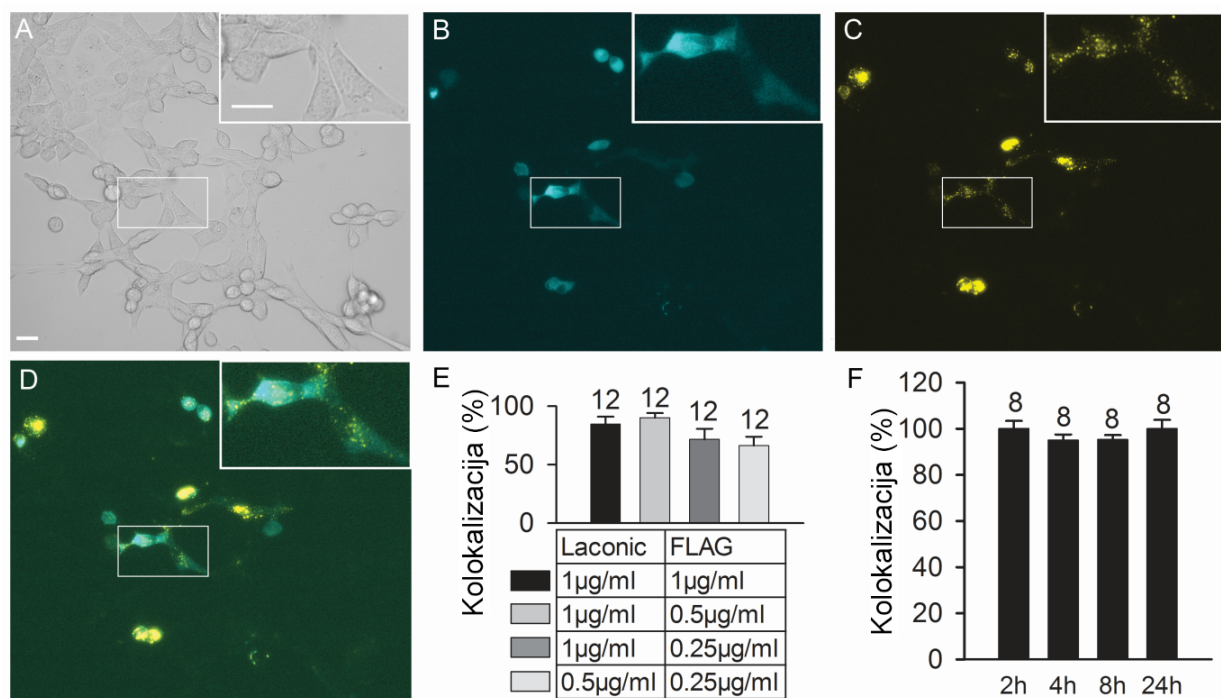
Za validacijo rezultatov na sliki 15, ki kažejo, da je možni novi receptor GPRB, smo s Smart009-izzvano spremembo v [L-laktat]_i primerjali v vseh pripravljenih klonih 3T3KOB, kakor tudi s kontrolnimi celicami 3T3WT. Po stimulaciji s 5 in 10 μ M Smart009 smo potrdili na treh neodvisnih celičnih klonih linije 3T3KOB (3T3KOBIA11, 3T3KOBIE1, 3T3KOBIC5), da je gen *gprB* potreben za zaznavanje s Smart009-odvisnim zvečanjem [L-laktat]_i (Slika 17). To kaže na pomembnost prisotnosti receptorja GPRB, pri stimulaciji aerobne glikolize v celicah 3T3.



Slika 17: Zmanjšana sprememba [L-laktat]_i v celicah 3T3KOB in 3T3WT, po stimulaciji s Smart009. Primerjava sprememb [L-laktat]_i merjena z nanosenzorjem Laconic po stimulaciji z 5, 10 in 50 μM Smart009 v celicah 3T3WT in v celicah (A) 3T3KOBIE1, (B) 3T3KOBIA11, (C) 3T3KOBIC5 (sivi stolpci). Rdeče črtkane črte predstavljajo povprečne vrednosti, beli krogi pa izstopajoče meritve. Za testiranje statistične razlike smo uporabili enosmerno in dvosmerno analizo variance (angl. "One-way ANOVA") in Mann-Whitneyev test za primerjavo posameznih skupin (***) $P \leq 0,001$). Števila testiranih celic so napisana ob stolpcih za posamezne celice 3T3.

4.8 DODATNA NEODVISNA POTRDITEV VLOGE GPRB PRI URAVNAVANJU SPREMENB [L-LAKTAT]_i

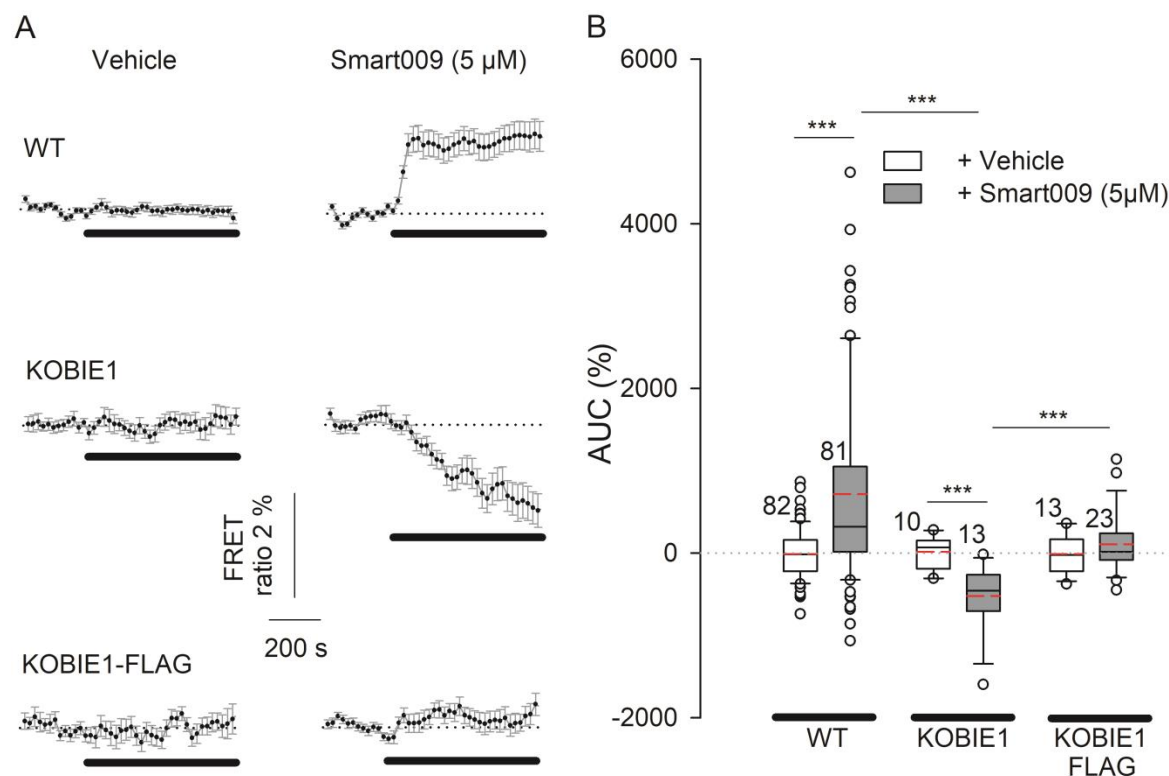
Za dodatno potrditev, da receptor GPRB posreduje zvečanje [L-laktat]_i po stimulaciji s 5 μM Smart009, smo celice 3T3KOB transfecirali s plazmidom za konstitutivno izražanje GPRB (GPRB-FLAG). Plazmid kodira tudi zapis za označevalec FLAG, kar omogoča potrditev uspešne transfekcije plazmida GPRB-FLAG z imunocitokemijo s protitelesi proti FLAG (Dupuis in sod., 2017). Pričakovali smo, da bomo s ponovnim vnosom receptorja GPRB rekonstruirali odzivnost celic 3T3KOB (brez *gprB*) na draženje s Smart009. Pred tem smo standardizirali dvojni vnos plazmidov za Laconinc in za plazmid GPRB-FLAG, tako, da smo spreminjali čas transfekcije in koncentracijo posamičnega plazmida. Uspešno transfekcijo s plazmidom GPRB-FLAG smo potrdili s protitelesi proti označevalcu FLAG. Slika 18 kaže rezultate uspešne transfekcije obeh plazmidov, kar smo določili z deležem celic, ki so bile hkrati pozitivne na Laconic in GPRB-FLAG. Za uspešno imunocitokemično označevanje znotrajcelične prisotnosti proteina GPRB-FLAG, smo celice permeabilizirali z inkubacijo celic z ionomicinom (4 μM), pri čemer pa smo optimizirali čas izpostavitve raztopini z ionomicinom tako, da se intenziteta fluorescence konstrukta Laconic ni znižala.



Slika 18: Optimizacija sočasne transfekcije plazmidov Laconic in GPRB-FLAG. Imunocitokemija celic 3T3KOB, ki so bile ko-transficerane z nanosenzorjem Laconic in plazmidom GPRB-FLAG. Uspešnost transfekcije smo spremljali z merjenjem fluorescence konstrukta Laconic in fluorescence imuno-označenih protiteles proti označevalcu FLAG. (A) Mikroskopske slike celic pod transmissijsko svetlobo (Zeiss HAL 100). (B) Celice, ki so izražale nanosenzor Laconic so emitirale svetlobo pri 535 nm (glej Metode). (C) Celice, ki so izražale plazmid GPRB-FLAG so fluorescirale pri 546 nm (glej Metode). (D) Kolokalizacija svetlobnih točk fluorescence nanosenzorja Laconic in plazmida GPRB-FLAG. (E) Kolokalizacija plazmidov Laconic in GPRB-FLAG, v odvisnosti od različnih koncentracij plazmidov. (F) Kolokalizacija plazmidov Laconic in GPRB-FLAG, v odvisnosti od različnih inkubacijskih časov celic (glej Metode). Števila testiranih celic so navedena ob stolpcih za posamezne celice 3T3.

Da bi preverili ali je znižano, s Smart009-inducirano zvečanje $[L\text{-laktat}]_i$ v celicah 3T3KOB (Slika 17A), posledica odsotnosti GPRB, smo celice 3T3KOB transfecirali s plazmidom GPRB-FLAG, ki nosi zapis za konstitutivno ekspresijo GPRB.

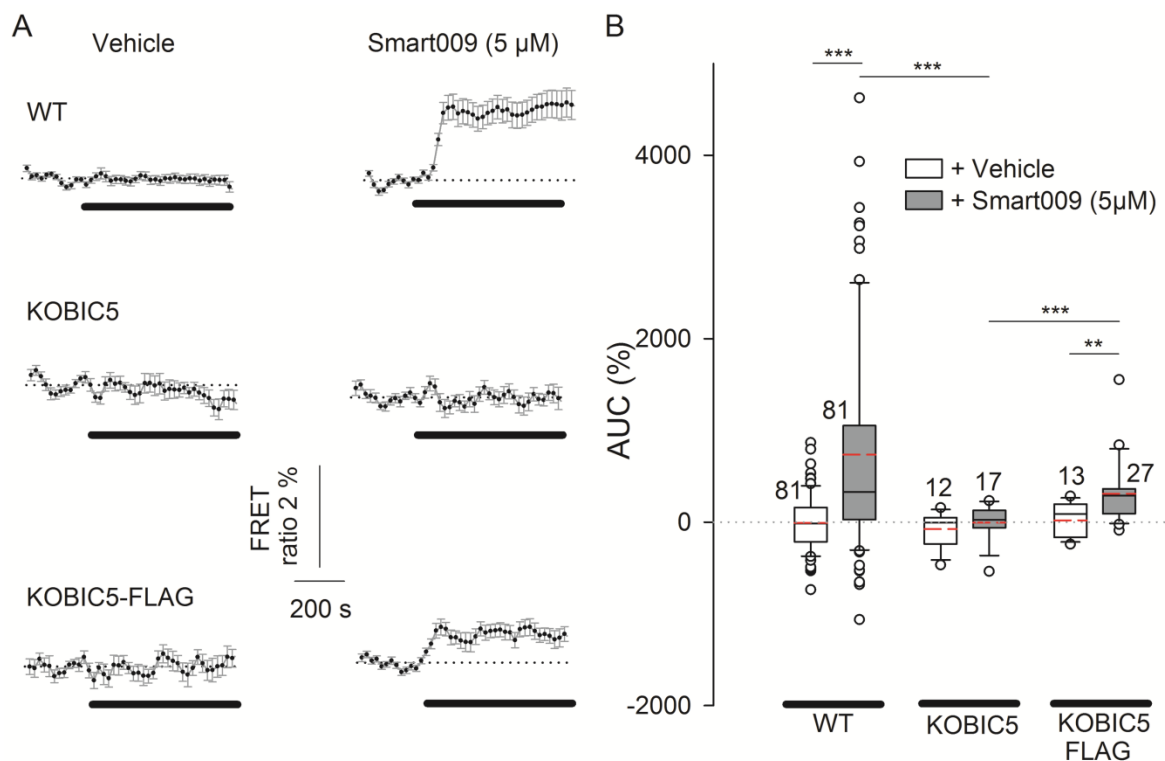
Rezultati na sliki 19A prikazujejo povprečne vrednosti AUC po stimulaciji celic 3T3WT (WT), 3T3KOBIE1 (KOBIE1) in celic transficiranih s plazmidom GPRB-FLAG (KOBIE1-FLAG). Povprečna sprememba, ki smo jo povzročili s stimulacijo Smart009, je bila znatno manjša v celicah 3T3KOBIE1 ($AUC = -522,8 \pm 114,9 \%$; $n=13$), v primerjavi s kontrolnimi celicami 3T3WT ($AUC = 855,0 \pm 134,1 \%$; $n = 81$; $P \leq 0,001$; Slika 19B). V prisotnosti plazmida GPRB-FLAG se je odziv $[L\text{-laktat}]_i$ po stimulaciji s Smart009 znatno povečal ($AUC = 106,8 \pm 77,3$) v primerjavi s kontrolo ($P \leq 0,001$; Slika 19B).



Slika 19: Rekonstrukcija odzivov v [L-laktat]_i povzročenih s Smart009 (5 μM), v celicah 3T3KOBIE1, transfeciranih s plazmidom GPRB-FLAG. (A) Povprečne normalizirane vrednosti sprememb v [L-laktat]_i po stimulaciji s negativno kontrolo (Vehicle) in Smart009 (5 μM), v celicah 3T3WT (WT), 3T3KOBIE1 (KOBIE1) in 3T3KOBIE1, ki so bile transfecirane s plazmidom za konstitutivno ekspresijo GPRB (KOBIE1-FLAG). Pri celicah 3T3KOBIE1 je prišlo do znižanja [L-laktat]_i, kar smo rekonstruirali v celicah KOBIE1-FLAG. To kaže, da je bilo za vzpostavitev ponovnih odzivov v [L-laktat]_i potrebna prisotnost GPRB. (B) Slika prikazuje primerjavo AUC med celicami 3T3WT, 3T3KOBIE1 in 3T3KOBIE1-FLAG, stimuliranimi z negativno kontrolo (beli stolpci) ali s 5 μM Smart009 (sivi stolpci). Rdeče črtkane črte predstavljajo povprečne vrednosti, beli krogi pa izstopajoče meritve. Za testiranje statistične razlike smo uporabili enosmerno in dvosmerno analizo variance (angl. "One-way ANOVA") in Mann-Whitneyev test za primerjavo posameznih skupin (***) $P \leq 0,001$. Števila testiranih celic so navedena ob stolpcih za posamezne celice 3T3.

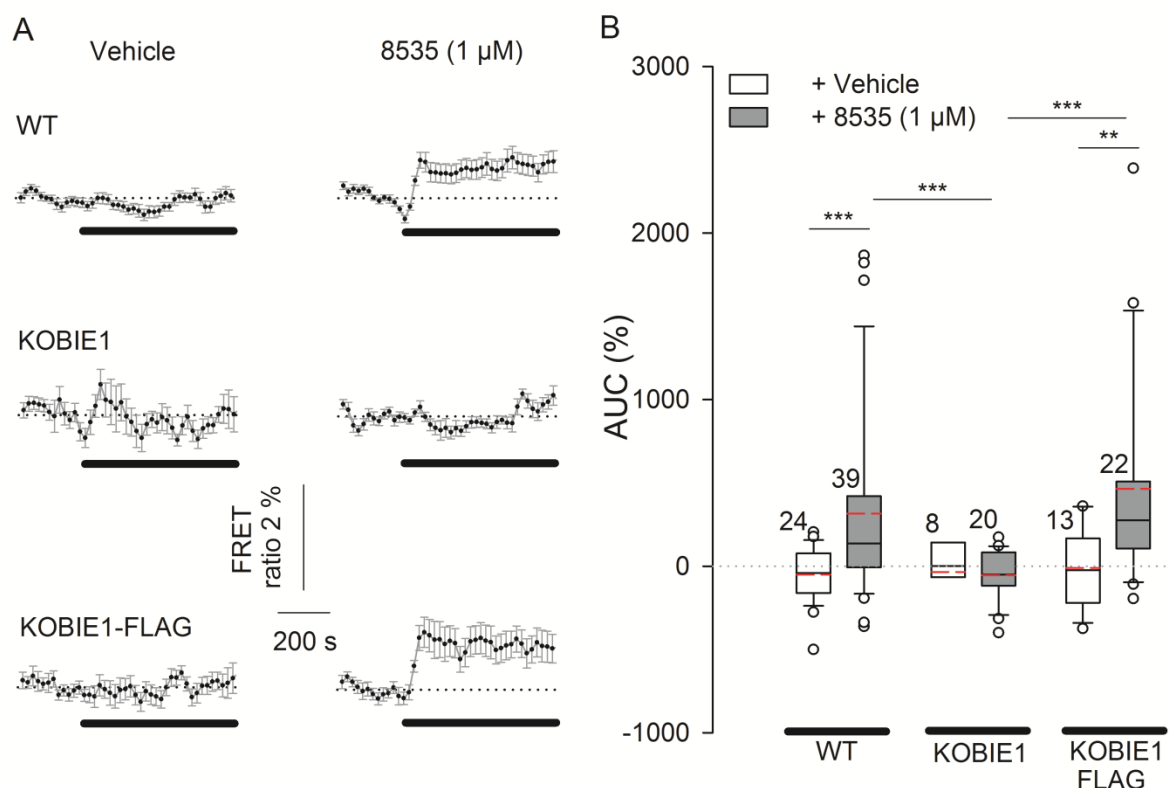
Rezultati na sliki 20A prikazujejo povprečne vrednosti AUC po stimulaciji celic 3T3WT (WT), 3T3KOBIC5 (KOBIC5) in celic transficiranih s plazmidom GPRB-FLAG (KOBIC5-FLAG). Povprečna sprememba, ki smo jo povzročili s stimulacijo Smart009, je bila znatno manjša v celicah 3T3KOBIC5 ($AUC = -6,5 \pm 49,1 \%$; $n=17$), v primerjavi s kontrolnimi celicami 3T3WT ($AUC = 855,0 \pm 134,1 \%$; $n = 81$; $P \leq 0,001$; Slika 20B). V prisotnosti plazmida GPRB-FLAG se je odziv [L-laktat]_i po stimulaciji s Smart009 znatno povečal ($AUC = 309,0 \pm 64,1 \%$; $n=27$) v primerjavi s kontrolo ($P \leq 0,01$; Slika 20B).

Ti rezultati podpirajo hipotezo, da spremembe [L-laktat]_i, ki jih izzovemo s Smart009 (5 μM), zahtevajo prisotnost GPRB.



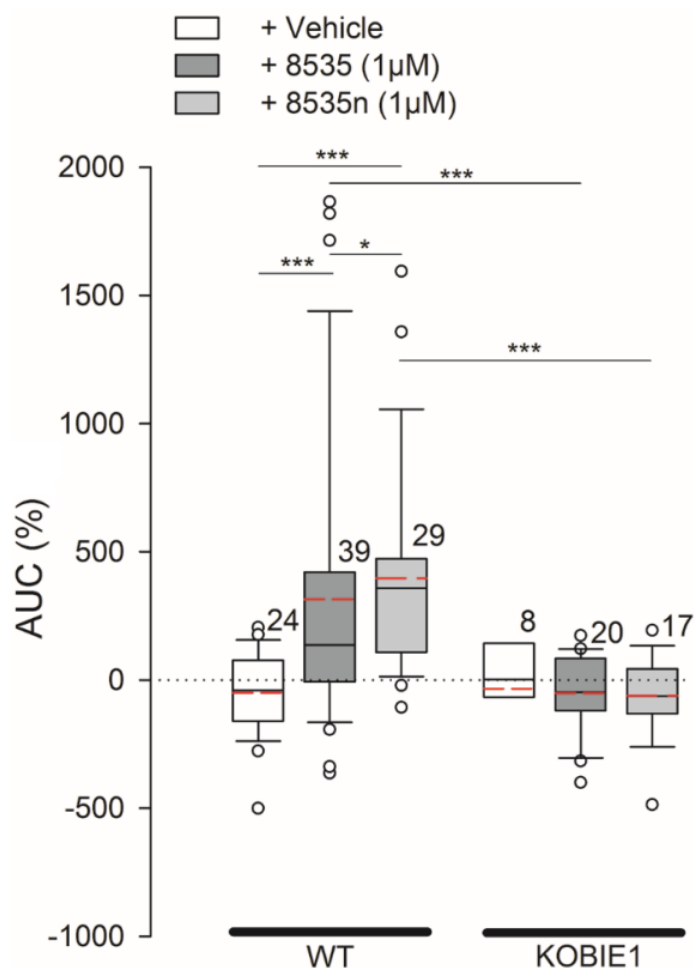
Slika 20: Rekonstrukcija odzivov v [L-laktat]_i povzročenih s Smart009 (5 μM), v celicah 3T3KOBIC5, transfeciranih s plazmidom GPRB-FLAG. (A) Povprečne normalizirane vrednosti sprememb v [L-laktat]_i po stimulaciji s negativno kontrolo (Vehicle) in Smart009 (5 μM), v celicah 3T3WT (WT), 3T3KOBIC5 (KOBIC5) in 3T3KOBIC5, ki so bile transfecirane s plazmidom za konstitutivno ekspresijo GPRB (KOBIC5-FLAG). Pri celicah 3T3KOBIC5 je prišlo do znižanja [L-laktat]_i, kar smo rekonstruirali v celicah KOBIC5-FLAG. To kaže, da je bilo za vzpostavitev ponovnih odzivov v [L-laktat]_i potrebna prisotnost GPRB. (B) Slika prikazuje primerjavo AUC med celicami 3T3WT, 3T3KOBIC5 in 3T3KOBIC5-FLAG, stimuliranimi z negativno kontrolo (beli stolpci) ali s 5 μM Smart009 (sivi stolpci). Rdeče črtkane črte predstavljajo povprečne vrednosti, beli krogi pa izstopajoče meritve. Za testiranje statistične razlike smo uporabili enosmerno in dvosmerno analizo variance (angl. "One-way ANOVA") in Mann-Whitneyev test za primerjavo posameznih skupin (***) $P \leq 0,001$). Števila testiranih celic so navedena ob stolpcih za posamezne celice 3T3.

Poskuse smo ponovili s stimulacijo s selektivnima agonistoma za GPRB, (Dupuis in sod., 2017). Celice 3T3WT so se odzvale na stimulacijo z ID5128535 (8535, 1 μM) z zvišanjem [L-laktat]_i ($AUC = 284,60 \pm 92,01 \%$; $n = 39$). Kot pričakovano se celice 3T3KOBIE1 niso odzvale na stimulus 8535 (1 μM; $AUC = -44,47 \pm 31,74 \%$; $n = 20$), oz. ni bilo razlike v odzivu v primerjavi s kontrolo ($P \leq 0,01$; dvosmerna ANOVA). Odzivi na selektivni agonist so bili prisotni pri celicah 3T3KOBIE1 transfeciranih s plazmidom za konstitutivno izražanje GPRB. Pri tem so bili signifikantno višji ($AUC = 464,20 \pm 134,54 \%$; $n = 22$) kot pri celicah 3T3KOBIE1, brez plazmida ($P \leq 0.001$; dvosmerna ANOVA; Slika 21B).



Slika 21: Ponovna vzpostavitev odzivov v [L-laktat]_i povzročenih s 8535, selektivnim agonistom GPRB, v celicah 3T3KOBIE1, transfeciranih s plazmidom GPRB-FLAG. (A) Povprečne normalizirane vrednosti sprememb v [L-laktat]_i po stimulaciji s negativno kontrolo (Vehicle) in 8535 (1 μM), v celicah 3T3WT (WT), 3T3KOBIE1 (KOBIE1) in 3T3KOBIE1, ki so bile transfecirane s plazmidom za konstitutivno ekspresijo GPRB (KOBIE1-FLAG; KO-FLAG). Pri celicah 3T3KOBIE1 je prišlo do znižanja z 8535-inducirano spremembo [L-laktat]_i, kar smo ponovno vzpostavili v celicah KOBIE1-FLAG (KO-FLAG). To kaže, da je GPRB pomemben za zvečanje [L-laktat]_i. (B) Slika prikazuje primerjavo AUC med celicami 3T3WT, 3T3KOBIE1 in 3T3KOBIE1-FLAG, stimuliranimi z negativno kontrolo (beli stolpci) ali z 1 μM 8535 (sivi stolpci). Rdeče črtkane črte predstavljajo povprečne vrednosti, beli krogi pa izstopajoče meritve. Za testiranje statistične razlike smo uporabili enosmerno in dvosmerno analizo variance (angl. "One-way ANOVA") in Mann-Whitneyev test za primerjavo posameznih skupin (** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001). Števila testiranih celic so napisana ob stolpcih za posamezne celice 3T3.

Pri celicah 3T3WT in 3T3KOBIE1 smo poskuse ponovili tudi s stimulacijo s selektivnim agonistom 8535n, ki ima namesto karbonilne skupine na istem mestu sulfonilno (Dupuis in sod., 2017; Pillaiyar in sod., 2021). Pri stimulaciji z 1 μM 8535n smo opazili zvečanje [L-laktat]_i v celicah 3T3WT (AUC = 490,03 ± 87,95 %; n = 29). Pri celicah 3T3KOBIE1 pa nismo zaznali odziva v [L-laktat]_i (AUC = -73,02 ± 31,55 %; n = 20) oz. ni bilo razlike v odzivu v primerjavi s kontrolo (P ≤ 0,01; dvosmerna ANOVA) (Slika 22).



Slika 22: Primerjava odzivov [L-laktat]_i v celicah 3T3WT (WT) in celicah 3T3KOBIE1 (KOBIE1) po stimulaciji z 1 µM 8535 in 8535n. Slika prikazuje primerjavo AUC med celicami 3T3WT in 3T3KOBIE1, stimuliranimi z negativno kontrolo (beli stolpci), z 1 µM 8535 (temno sivi stolpci) in 1 µM 8535n (svetlo sivi stolpci). Rdeče črtkane črte predstavljajo povprečne vrednosti, beli krogi pa izstopajoče meritve. Za testiranje statistične razlike smo uporabili enosmerno in dvosmerno analizo variance (angl. "One-way ANOVA") in Mann-Whitneyev test za primerjavo posameznih skupin (***) P ≤ 0,001; ** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05). Števila testiranih celic so napisana ob stolpcih za posamezne celice 3T3. Delež odzivnosti celic 3T3WT na stimulacijo z 8535 je bil 33,3 % (n=19/39), pri stimulaciji z 8535n pa 41,4 % (n=12/29).

Rezultati so potrdili, da je za zvečanje [L-laktat]_i, po stimulaciji s selektivnim agonistom za GPRB, nujno potrebna prisotnost receptorja GPRB.

5 RAZPRAVA

Astroцитi so tip celic glije, ki igrajo ključno vlogo pri vzdrževanju homeostaze centralnega živčnega sistema (CŽS) (Verkhatsky in Nedergaard, 2018). Celice astroglije so v možganih prisotne v velikem številu, tako zasedajo veliko večino prostora, kar jim omogoča komuniciranje s sinapsami in krvnimi žilami ter z drugimi glialnimi celicami prek kompleksnih izrastkov (Verkhatsky in Nedergaard, 2018). Tako se nahajajo v idealnem položaju za shranjevanje in oskrbo z energijo, vzdrževanje zunajceličnega okolja in dostavo trofičnih dejavnikov (Verkhatsky in Nedergaard, 2018). Te funkcije so pomembne za vzdrževanje ustrezne nevronske aktivnosti, preprečevanje oksidativnega stresa in omogočanje osnovnih možganskih funkcij na primer učenje in tvorjenje spomina (Murphy-Royal in sod., 2017; Bellot-Saez in sod., 2017; Suzuki in sod., 2011; Henneberger in sod., 2010). Astroцитi lahko na aktivnost bližnjih nevronov vplivajo z regulacijskim mehanizmom, ki vključuje sproščanje glijotransmiterjev, kot so L-laktat, glutamat, ATP in D-serin (Pellerin in sod., 1998; Pellerin in Magistretti, 1994; Bowser in Khakh, 2004; Panatier in sod., 2006).

Astroцитi na plazmalemi izražajo številne receptorje GPCR, preko katerih aktivirajo znotrajcelične signalne poti, ki vodijo do porasta različnih sekundarnih prenašalcev, tudi cAMP. Zvečanje $[cAMP]_i$ vpliva na posledični porast $[L-laktat]_i$, presnovka aerobne glikolize (Dienel, 2018).

V doktorskem delu smo na kulturi podganjih astrocitov in na celicah 3T3 spremljali podcelično dinamiko cAMP in L-laktata, po stimulaciji z agonisti GPCRjev. Ker je zvečanje $[L-laktat]_i$, predhodno povezano s spremembami $[cAMP]_i$ smo raziskali ali je porazdelitev $[cAMP]_i$ in $[L-laktat]_i$, znotraj celice heterogena in ali to vpliva na odziv celic na agoniste, ki uravnavajo aerobno glikolizo.

5.1 PORAZDELITEV $[cAMP]_i$ V ODVISNOSTI OD ODDALJENOSTI OD JEDRA PROTI CELIČNEM OBROBJU

Nedavne študije so pokazale, da aktivnost fosfodiesteraze in proteinske kinaze A pogojuje porazdelitev podceličnih mikrodomen cAMP (Bock in sod., 2020; Zhang in sod., 2020). Ker je vloga cAMP v astrocitih pomembna za njeno delovanje (Vardjan in sod., 2014), podcelična porazdelitev $[cAMP]_i$ pa še ni bila raziskana, smo se v naši raziskavi osredotočili prav v opredelitev podcelične heterogenosti $[cAMP]_i$. Poleg astrocitov smo uporabili tudi celice 3T3, saj je za oba tipa celic značilno izražanje aerobne glikolize (Vardjan in sod., 2018). V ta namen smo uporabili tehniko FRET, pri kateri se uporablja dva fluorofora s pomočjo katerih lahko merimo razmerje dveh intenzitet fluorescence. S tem se odpravi anomalija meritev fluorescence, ki se pojavi zaradi volumske nehomogenosti celice. Na začetku smo izločili možnosti artefaktov, tako da smo dokazali, da je razmerje signalov fluorescence (CFP/YFP) neodvisno od podcelične količine fluorescenčnega nanosenzorja na optični poti (CFP+YFP) za merjenje znotrajceličnega cAMP (Slika 4, 5).

Analiza podceličnih mikrodomen, ki so bile zaporedno nameščene vzdolž linije od jedra proti periferiji celice, je pokazala, da se v mirovanju znotrajcelični cAMP z oddaljevanjem od jedra se v astrocitih zmanjšuje (Preglednica 1), v celicah 3T3 pa smo opazili trende zviševanja in trende zniževanja cAMP (Preglednica 2). S tem smo potrdili našo raziskovalno hipotezo, da je znotrajcelična koncentracija cAMP v mirovanju heterogeno porazdeljena v citosolu astrocitov in fibroblastom podobnih celic 3T3.

Podcelična zmožnost sinteze cAMP po stimulaciji z NA, ki smo jo izmerili kot spremembo med cAMP po stimulaciji in pred stimulacijo, v mikrodomenah, ki so si sledile od jedra proti periferiji celice, se je v astrocitih zmanjševala (Slika 8; Preglednica 1), v celicah 3T3 pa smo opazili, da je v nekaterih celicah prisoten trend zniževanja, v drugih pa trend zviševanja (Slika 9; Preglednica 2). Razlog za to podcelično heterogenost porazdelitve cAMP še ni povsem znan, vendar bi lahko razlike v razmerju med površino in prostornino povzročile nastanek gradientov [cAMP]_i med različnimi deli celice z višjo koncentracijo [cAMP]_i v manjših strukturah celice (Neves in sod., 2008) in prostorske razlike v količini encimov, ki pogojujejo porazdelitev in signalizacijo s cAMP (Bock in sod., 2020; Zhang in sod., 2020).

Nadaljnji rezultati v naši študiji so pokazali, da v astrocitih in celicah 3T3 obstaja pozitivna korelacija med razmerjem CFP/YFP v mirovanju in po stimulaciji (Slika 10), kar kaže na to, da mikrodomene z nižjo koncentracijo [cAMP]_i dosežejo nižjo raven [cAMP]_i, kot mikrodomene z relativno visoko koncentracijo [cAMP]_i, po stimulaciji z NA. Ti podatki potrjujejo našo hipotezo, da stimulacija z agonisti za različne GPCR izzove prostorsko heterogene spremembe v znotrajcelični porazdelitvi cAMP.

5.2 PORAZDELITEV [L-LAKTAT]_i V ODVISNOSTI OD ODDALJENOSTI OD JEDRA PROTI CELIČNEM OBROBJU

V doktorskem delu smo opazovali tudi porazdelitev [L-laktat]_i v astrocitih in celicah 3T3. Pri merjenju [L-laktat]_i smo uporabili nanosenzor Laconic, pri katerem smo dokazali, da je razmerje signalov fluorescence mTFP/Venus neodvisno od podcelične količine fluorescenčnega nanosenzorja za merjenje znotrajceličnega L-laktata (Slika 6, Slika 7). Za dokaz neodvisnosti smo uporabili enak postopek kot pri merjenju cAMP z nanosenzorjem Epac (glej poglavje 5.1).

Nadaljnja analiza podceličnih mikrodomen, ki so bile zaporedno nameščene vzdolž linije od jedra proti periferiji celice, je pokazala, da se količina znotrajceličnega L-laktata v mirovanju znižuje z oddaljenostjo od jedra (Slika 11A, Slika 12A). Ti rezultati potrjujejo hipotezo, da je koncentracija znotrajceličnega L-laktata v mirovanju heterogeno porazdeljena v citosolu astrocitov in celic 3T3. Pri obeh tipih celic smo enak trend zmanjševanja L-laktata opazili tudi po stimulaciji celic z agonistom Smart009 (Slika 11B in Slika 12B). Podcelična zmožnost sinteze L-laktata v mikrodomenah po stimulaciji z agonistom Smart009, ki smo jo izmerili kot spremembo med L-laktatom po stimulaciji in pred stimulacijo, se je v astrocitih zmanjševala v smeri od jedra proti periferiji celic. V primeru celic 3T3 pa smo pri nekaterih celicah opazili trend zmanjševanja, v nekaterih celicah trend zviševanja podcelične zmožnosti sinteze L-laktata ali pa kombinacijo

oboje. Pri merjenju porazdelitve L-laktata glede na oddaljenost od jedra smo opazili, da obstaja pozitivna korelacija med razmerjem mTFP/Venus v mirovanju in po stimulaciji, kar kaže na to, da mikrodomene z nižjo koncentracijo L-laktata dosežejo nižjo raven L-laktata kot mikrodomene z relativno visoko koncentracijo L-laktata po stimulaciji z agonistom Smart009 (Slika 13). Cilj analize razporeditve L-laktata v citoplazmi je bil nasloviti vprašanje ali je L-laktat razporejen nehomogeno, kakor so encimi in substrati, ki so udeleženi v produkciji L-laktata, razporejeni po citoplazmi na specifičnih lokacijah. Metodologija, ki smo jo uporabili neposredno lahko eksperimentalno naslovi to vprašanje. Rezultati so skladni s predvidevanji.

5.3 ISKANJE NOVEGA RECEPTORJA

V doktorski nalogi smo raziskovali nov, še ne odkriti receptor, ki naj bi stimuliral aerobno glikolizo astrocitov in posledično tvorbo L-laktata. Mehanizem, poznan kot "presnovna vzdražnost" (Vardjan in sod., 2018), temelji na mehanizmu, kjer zunajcelični L-laktat aktivira neznani receptor. S pomočjo računalniške baze podatkov o geometriji in fizikalnokemijskih lastnostih velikega števila spojin smo poiskali spojino, ki se je najbolje prilegala računalniškemu modelu receptorja GPR81 (Zorec, 2018). Poleg tega, se je moral novi domnevni ligand razlikovati od znanih selektivnih agonistov klasičnih L-laktatnih receptorjev, vključno s Smart075 in Compound 2 (Dvorak in sod., 2012; Sakurai in sod., 2014). Ena od molekul, ki je izpolnjevala ta merila je Smart009, pri kateri sta bili dozna odvisnost in odzivnost celic očitno različna od molekule Smart075 (Slika 2). Pri stimulaciji celic s Smart075 smo opazili korelacijo med koncentracijo agonista in celičnim odzivom v $[L\text{-laktat}]_i$, medtem ko smo pri stimulaciji celic s Smart009 opazili, da so odzivi celic pri koncentraciji 5 in 10 μM signifikantno višji od odzivov celic pri koncentraciji 50 in 100 μM , pri višjih koncentracijah (500, 1000 in 2000 μM) pa so odzivi celic primerljivi z odzivi pri koncentracijah 5 in 10 μM .

NA in zelo verjetno tudi L-laktat (Bergersen in sod., 2001; Peng in sod., 2005) sta primarna prenašalca v CŽS, ki preko aktivacije GPCR na površini astrocitov povzročita spremembo v $[cAMP]_i$ in $[L\text{-laktat}]_i$. Testirali smo odziv posameznih astrocitov na selektivna agonista receptorja GPR81 (Dvorak in sod., 2012) in opazovali podcelične spremembe v $[cAMP]_i$ in $[L\text{-laktat}]_i$ v realnem času. Spremembe v $[cAMP]_i$ smo spremljali s fluorescenčnim mikroskopom ter FRET-nanosenzorjem Epac1-camps (Nikolaev in sod., 2004), ki poroča spremembe v $[cAMP]_i$ posredno preko aktivacije proteina Epac, ki je direktno aktiviran s cAMP. Spremembe $[L\text{-laktat}]_i$ pa smo spremljali s fluorescenčno mikroskopijo in FRET-nanosenzorjem Laconic, ki zazna L-laktat. Poskusi so pokazali, da po stimulaciji celic 3T3WT, ki so izražale FRET-nanosenzor Laconic (San Martín in sod., 2013), z različnimi koncentracijami selektivnih agonistov laktatnega receptorja GPR81, pride do povečanja signala FRET. To posredno kaže na zvečanje $[cAMP]_i$, ki vpliva na zvečanje $[L\text{-laktat}]_i$ (Vardjan in sod., 2018). V primeru stimulacije z agonistom Smart075 smo zaznali korelacijo med višanjem koncentracije agonista in višanjem odziva celic (Slika 14A). Sklepamo, da gre za mehanizem, kjer en sam receptor posreduje zvečanje $[L\text{-laktat}]_i$. Pri stimulaciji z agonistom Smart009 je ta odnos bolj kompleksen, saj imajo odzivi vrhove pri dveh

koncentracijah, kar kaže na kompleksnost receptorskih mehanizmov (Slika 14B). Ti rezultati kažejo, da Smart075, ki je selektivni agonist GPR81 ($EC_{50} = 16 \mu M$) in Smart009, ki GPR81 ne aktivira, tudi pri 1 mM koncentracijah (Dvorak in sod., 2012), z različnimi doznimi odvisnostimi stimulirata aerobno glikolizo v celicah 3T3, merjeno v povečanju znotrajceličnega laktata. Da bi ugotovili, kateri receptor aktivira molekula Smart009, smo generirali celične linije celic 3T3, z izbitimi specifičnimi geni za kandidatne GPCR-je.

5.4 SPREMEMBE V [L-LAKTAT]_i, KI JIH POVZROČIJO AGONISTI V CELICAH 3T3KO

V nadaljevanju smo merili odzive celic 3T3, ki so imele izbite 4 posamezne kandidatne gene, GPRA, GPRB, GPRC, GPRD (celice 3T3KO). Celice smo stimulirali s 5 μM Smart075 in Smart009, pri tem smo merili spremembo [L-laktat]_i. Pričakovali smo, da če kateri od kandidatnih genov posreduje zvečanje [L-laktat]_i pri 5 do 10 μM Smart009 (Slika 14B, insert), bi morala stimulacija celic 3T3KO s 5 μM Smart009 posredovati inhibirano spremembo v [L-laktat]_i. Rezultati so pokazali, da je bilo med vsemi testiranimi celičnimi linijami 3T3KO znatno zmanjšanje spremembe v zvečanju [L-laktat]_i, po stimulaciji s Smart009, prisotno le pri celicah 3T3KOB (Slika 15Bii). Celice 3T3KOB nosijo delečijo gena GPR27, ki spada v družino superohranjenih receptorskih genov, izraženih v možganih (angl. super conserved receptor genes expressed in the brain – SREB) (Matsumoto in sod., 2000b). Za potrditev teh rezultatov smo primerjali odzive [L-laktat]_i po stimulaciji s koncentracijami 5, 10 in 50 μM Smart009 v treh celičnih linijah 3T3KOB: 3T3KOBIA11, 3T3KOBIC5 in 3T3KOBIE1. Kot je prikazano na Sliki 16, je pri vseh testiranih celičnih linijah prišlo do bistveno zmanjšane spremembe [L-laktat]_i, pri stimulaciji s 5 ali 10 μM (Slika 16). To kaže na potrebo po GPRB pri s Smart009-posredovanem povečanju aerobne glikolize v celicah 3T3.

5.5 PONOVA VZPOSTAVITEV ODZIVNOSTI V [L-LAKTAT]_i CELIC 3T3KOB, POSREDOVANO Z GPRB, S TRANSFEKCIJO PLAZMIDA GPRB-FLAG

Za potrditev, da zmanjšana odzivnost [L-laktat]_i v celicah 3T3KOB, ki ga povzroči Smart009, smo celice, ki niso izražale *gprB* transficirali s plazmidom za konstitutivno ekspresijo GPRB. Transfecirane celice so se ob stimulaciji s Smart009 znova odzvale z zvečanjem [L-laktat]_i (Slika 19 in Slika 20), kar je potrdilo hipotezo, da je za odzivnost celic ob stimulaciji s Smart009, potrebno izražanje GPRB. V nadaljevanju smo celice stimulirali z nadomestnim selektivnim agonistom 8535 (Dupuis in sod., 2017) in dokazali, da so odzivi v [L-laktat]_i (Slika 21) zelo podobni primeru stimulacije s Smart009 (Slika 19 in Slika 20) pri celicah divjega tipa, celicah 3T3KOB in celicah 3T3KOB, ki so konstitutivno izražale GPRB. S tem smo dodatno potrdili vlogo GPRB pri uravnavanju aerobne glikolize po aktivaciji s selektivnima agonistoma.

Rezultati poskusov v doktorskem delu so pokazali, da farmakološka aktivacija GPRB v celicah 3T3 povzroči zvečanje [L-laktat]_i. Endogeni ligand za GPRB še ni znan, vendar so bili nadomestni selektivni agonisti že opisani, vključno z molekulama 8535 in 8535n (Dupuis in sod., 2017; Pillaiyar in sod., 2021), kar omogoča nadaljnje študije delovanja tega receptorja.

Sklopitev GPRB z G-proteinom je še neznana. Prvotna študija, ki so opravili Chopra in sod., je pokazala, da konstitutivno izražanje GPRB v celicah 293T poveča IP1, kar naj bi pomenilo, da je receptor sklopljen z $G\alpha_q$ -podenoto, njihova zadnja študija pa kaže, da obstaja možnost zmanjšane izločanja insulina v miškah, ki ne izražajo gena za GPRB, kar bi lahko kazalo na sklopitev z $G\alpha_s$ ali $G\alpha_q$ (Chopra in sod., 2020). Teh rezultatov niso potrdili drugi raziskovalci, saj niso našli nobenih dokazov, da je receptor sklopljen z $G\alpha_q$, $G\alpha_s$ ali $G\alpha_i$ (Dupuis in sod., 2017). Martin in sod., pa so ugotovili konstitutivno sklopitev GPRB z $G\alpha_i$ (Martin in sod., 2015).

6 SKLEPI

Čeprav naša študija ni obravnavala natančne citosolne signalizacije zvečanja [L-laktat]_i, posredovanega z GPRB, rezultati jasno kažejo, da ima ta receptor vlogo pri uravnavanju aerobne glikolize. To smo potrdili s tremi dokazi. Prvi dokaz je ta, da v odsotnosti GPRB, v celicah 3T3KOB, farmakološka aktivacija z aplikacijo Smart009 ali 8353 ni uspela povzročiti zvečanja [L-laktat]_i (Slika 17,19,20,21,22). Drugi dokaz vključuje odzive [L-laktat]_i, ki smo jih lahko ponovno vzpostavili s transfekcijo plazmida, ki kodira GPRB, v celicah 3T3KOB, ki niso izražale GPRB (Slika 19, Slika 20, Slika 21). Za tretji dokaz pa smo z uporabo nadomestnega selektivnega agonista 8353 (Dupuis in sod., 2017) potrdili, da GPRB izzove zvečanje [L-laktat]_i v celicah divjega tipa in v celicah 3T3KOB, predhodno transfeciranih s plazmidom, ki kodira GPRB (Slika 21). Ti rezultati kažejo, da Smart009 in 8353 delujeta podobno na [L-laktat]_i v celicah 3T3, pri koncentracijah 1-5 μM , kar kaže, da Smart009 deloma deluje prek GPRB. Poleg tega smo potrdili naše tri raziskovalne hipoteze, da je [cAMP]_i v mirovanju heterogeno porazdeljena v citosolu astrocitov in fibroblastom podobnih celic 3T3, da stimulacija z agonisti za različne GPCR izzove prostorsko heterogene spremembe v znotrajcelični porazdelitvi cAMP in L-laktata ter, da je [L-laktat]_i v mirovanju heterogeno porazdeljena v citosolu astrocitov in celic 3T3.

Nedavna študija je pokazala, da z NA stimulirana proizvodnja L-laktata v astrocitih potrebuje vstop in prehod D-glukoze skozi glikogenski šant (Fink in sod., 2021). Zanimivo bo preučiti, ali je povečana glikoliza povezana z aktivacijo GPRB, prav tako kot je aktiviranje adrenergičnih receptorjev v astrocitih (Dienel, 2019), in ali je to odvisno od znotrajceličnega Ca^{2+} in/ali cAMP (Vardjan in sod., 2018; Horvat in sod., 2021).

7 POVZETEK

Astrociti so celice nevroglije, ki vzdržujejo homeostazo v centralnem živčnem sistemu (Verkhratsky in Nedergaard, 2018). Znano je, da aktivno sodelujejo pri številnih fizioloških in patoloških procesih CŽS prek izločanja kemičnih snovi iz mešičkov (Verkhratsky in Nedergaard, 2018; Zorec in sod., 2012). Zaradi svoje zvezdaste oblike so preko številnih izrastkov v tesnem stiku s sinapsami in z žiljem. Ta anatomsko optimalna umeščenost jim omogoča signaliziranje med endotelijem in nevroni, kjer nudijo presnovno podporo nevronske mreže, ki so osrednji porabnik energije v CŽS (Dienel, 2019; Nortley in Attwell, 2017). Astrociti sodelujejo pri prevzemu glukoze iz krvnega obtoka, ki jo kot vir energije posredujejo nevronom ali jo skladiščijo v obliki glikogena. Ob povečanju aktivnosti nevronov se v astrociti razgradi glikogen do glukoze v procesu aerobne glikolize, nastali L-laktat (Kreft in sod., 2013) se izloči v zunajcelični prostor in posreduje nevronom (t.i. hipoteza o izmenjavi laktata med astrociti in nevroni, angl. "Astrocyte-neuron lactate shuttle", ANLS). Laktat ima poleg energetske vloge tudi signalno vlogo saj verjetno deluje tudi kot primarni prenašalec (Bergersen in sod., 2001), kjer igra vlogo volumskega prenašalca informacij, saj lahko z difuzijo dosega daljše razdalje in aktivira receptorje okrog mesta sproščanja (Morland in sod., 2015), za razliko od sinaptičnega prenosa, kjer razdalja znaša le nekaj deset nanometrov (Borrito-Escuela in sod., 2015; Lauritzen in sod., 2014).

Preko L-laktata naj bi astrociti imeli zmožnost modulacije aktivnosti noradrenergičnih nevronov, kjer sproščanje L-laktata iz aktiviranih astrocitov v jedru locus coeruleus povzroči vzbujanje nevronov in posledično sproščanje noradrenalina (NA) (Tang in sod., 2014). Signaliziranje z L-laktatom poteče tudi s pomočjo aktivacije laktatnega receptorja GPR81 ali s pomočjo še neidentificiranih receptorjev plazemske membrane (Tang in sod., 2014; Vardjan in sod., 2018). V astrociti zunajcelični L-laktat aktivira adenilil ciklazo (AC), kar povzroči povečano sintezo znotrajceličnega cAMP ($[cAMP]_i$) in posledično pospeši aerobno glikolizo. Po stimulaciji astrocitov s selektivnimi agonisti za receptor GPR81 pride do povišanja $[cAMP]_i$ tudi, ko celice ne izražajo GPR81 (GPR81KO), kar kaže na to, da ti agonisti aktivirajo še nek neznan receptorski mehanizem.

Cilj doktorske naloge je bil potrditi tezi, da sta $[L-laktat]_i$ in $[cAMP]_i$ v astrociti in celicah 3T3 heterogeno porazdeljena ter, da stimulacija astrocitov in celic 3T3, z agonisti za različne GPCR izzove prostorsko heterogene spremembe v $[L-laktat]_i$ in $[cAMP]_i$. Poleg astrocitov smo uporabili tudi celice 3T3MEF, kajti za oba tipa celic je značilno izražanje aerobne glikolize (Leibiger in sod., 2013; Vardjan in sod., 2018).

Poskuse smo naredili na celični kulturi podganjih astrocitov in celični kulturi celic 3T3. Spremembe v $[L-laktat]_i$ in $[cAMP]_i$ v mirovanju in po stimulaciji z agonisti GPCR-jev smo spremljali s pomočjo nanosenzorjev FRET Epac1-camps in Laconic. Ti nanosenzorji so relativno neodvisni od artefaktov, ki so povezani z volumsko porazdelitvijo fluorescenčnih označevalcev. To smo preverili z izračunom Pearsonovega koeficienta korelacije med normalizirano vsoto intenzitet fluorescence kanalov (CFP + YFP, Epac1-camps ali mTFP + Venus, Laconic), ki je

sorazmerna količini fluoroforjev v celici ter normaliziranim razmerjem kanalov (CFP/YFP, Epac-camps ali mTFP/Venus, Laconic), ki predstavlja koncentracijo preiskovane znotrajcelične molekule. V primeru merjenja $[cAMP]_i$ (kanala CFP in YFP) je v astrocitih vrednost R znašala -0,01 (Slika 4U; $n = 492097$ slikovnih pik), v celicah 3T3 pa -0,06 (Slika 5U; $n = 151859$ slikovnih pik). V primeru merjenja $[L-laktat]_i$ (kanala mTFP in Venus) v astrocitih je vrednost R znašala -0,14 (Slika 6U; $n = 183725$ slikovnih pik), v celicah 3T3 pa -0,14 (Slika 7U; $n = 18531$ slikovnih pik).

Podcelično heterogenost porazdelitve cAMP v astrocitih in celicah 3T3, smo merili pred in po stimulaciji z NA, v mikrodomenah, ki so si sledile od jedra proti periferiji celice. Koncentracija cAMP se je v astrocitih zniževala od jedra proti periferiji (Slika 8). V nekaterih celicah 3T3 smo opazili trend zniževanja koncentracije cAMP od jedra proti periferiji celice (Slika 9 A, B), v drugih pa trend zviševanja koncentracije z oddaljenostjo od jedra (Slika 9 C, D). V primeru prisotnosti negativnega ali pozitivnega trenda signala od jedra proti periferiji celic v mirovanju, smo v isti celici opazili enak trend tudi po stimulaciji z NA (Slika 9).

V nadaljevanju smo ugotovili, da v astrocitih in celicah 3T3 stimulacija z agonisti za različne GPCR izzove prostorsko heterogene spremembe v znotrajcelični porazdelitvi cAMP, saj so rezultati pokazali, da obstaja pozitivna korelacija med razmerjem CFP/YFP v mirovanju in po stimulaciji (Slika 10).

Enak pristop pri določanju heterogenosti podcelične porazdelitve $[cAMP]_i$ smo uporabili pri določanju heterogenosti porazdelitve $[L-laktat]_i$. Analizirali smo majhne krožne regije zanimanja (premer $2\mu m$), pravokotno od jedrnega roba proti obrobju celice. V vseh primerih je bil prisoten negativen trend, kar bi lahko pomenilo, da se $[L-laktat]_i$ v mirovanju in po stimulaciji z agonistom Smart009 znižuje v smeri od jedra proti periferiji celice (Slika 11 in Slika 12 A, B).

Dodatno smo analizirali tudi spreminjanje intenzitete regijskih odzivov na stimulacijo s Smart009, v odvisnosti od oddaljenosti od jedra proti celičnem obrobju. Pri tem smo vrednosti razmerja signalov mTFP/Venus v mirovanju odšteli od vrednosti razmerja po stimulaciji. V primeru astrocitov smo statistično značilni padec intenzitete produkcije L-laktata opazili pri veliki večini analiziranih smeri regijskih območij (9/10 smeri; Preglednica 3). Pri celicah 3T3 je bilo statistično značilnih sprememb manj (6/16 smeri; Preglednica 4), od tega so bil štirje statistično značilni padci in dva primera statistično značilne rasti podcelične sinteze L-laktata. Reprezentativna naklona prikazana na Sliki 12C, D. Za vsak tip celic smo primerjali vse normalizirane vrednosti razmerja mTFP/Venus v mirovanju z vrednostmi po stimulaciji in v obeh tipih celic zaznali statistično značilno pozitivno korelacijo. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da mikrodomene z nižjim $[L-laktat]_i$ dosežejo relativno nižje vrednosti $[L-laktat]_i$ po stimulaciji, mikrodomene z relativno višjo $[L-laktat]_i$ v mirovanju pa dosežejo relativno višjo $[L-laktat]_i$ po stimulaciji (Slika 13).

Te ugotovitve so nam v pomoč pri raziskovanju celičnih odzivov v L-laktatu, saj moramo zaradi nehomogene porazdelitve laktata v celici spremljati spremembe v celici, namesto da se osredotočamo samo na določene lokacije.

V drugem delu doktorske naloge smo iskali novi L-laktatni, še nepoznani, receptor. Pri tem smo uporabili celice 3T3 (divji tip – 3T3WT), transfecirane z nanosenzorjem Laconic in testirali ali predhodno uporabljeni selektivni agonist za GPR81 Smart075 (Dvorak in sod., 2012) in ligand Smart009 (Zorec, 2018), stimulirata zvišanje $[L\text{-laktat}]_i$ pri različnih koncentracijah. V primeru stimulacije s Smart075 smo opazili korelacijo med višanjem koncentracije agonista in višanjem odziva celic v $[L\text{-laktat}]_i$. Predvidevamo, da je tukaj prisoten enostaven receptorski mehanizem. V primeru stimulacije s Smart009 je bila dozna odvisnost odzivov bolj zapletena, saj smo opazili vrhove odzivov pri več kot eni koncentraciji. Ti rezultati kažejo na to, da je tukaj prisoten več kot en receptorski mehanizem (Slika 14, 15). V nadaljevanju nas je zanimalo, kako določiti nove receptorje, ki uravnavajo $[L\text{-laktat}]_i$.

Kandidatke za receptorske gene smo izbrali s pomočjo bioinformatične analize, ki je vključevala tri kriterije. Prvi kriterij je vključeval GPCR, ki se izražajo v astrociti (Zhang in sod., 2014) (Preglednica 7). Drugi kriterij je vključeval podatke predhodnega sekveniranja RNA, kjer smo primerjali izražanje genov sirot GPCR v astrociti divjega tipa in astrociti z izbitim genom, ki nosi zapis za GPR81 (Vardjan in sod., 2018) (Preglednica 8). Tretji kriterij je vključeval Evklidsko razdaljo podatkov vezavne energije treh agonistov GPR81 (Preglednica 9). Na podlagi teh treh nizov podatkov smo izbrali 7 kandidatnih GPCR genov (Slika 16A), od katerih so štirje bili GPCR sirote (*gprA*, *gprB*, *gprC*, *gprD*) in za nas še posebej zanimivi.

V nadaljevanju smo uporabili celične linije 3T3 z izbitimi posameznimi geni za 4 kandidatne receptorje sirote (celice 3T3KO). Glede na rezultate dozne odvisnosti stimulacije celic 3T3WT (Slika 15B, insert), smo sklepali, da iskani receptor posreduje zvečanje $[L\text{-laktat}]_i$ pri stimulaciji s 5-10 μM Smart009. Ob stimulaciji s 5 μM koncentracijo Smart009, pričakovali znižano spremembo $[L\text{-laktat}]_i$ v celicah z izbitim genom, ki naj bi bil kandidat za novi GPCR. Signifikantno razliko smo opazili pri celični liniji 3T3KOB (Slika 16B), kjer celice nosijo delečijo gena *gprB*, ki spada v družino zelo ohranjenih receptorskih genov izraženih v možganih (angl. super conserved receptor genes expressed in the brain - SREB) (Matsumoto in sod., 2000a). To smo potrdili na treh neodvisnih klonih celične linije 3T3KOB (3T3KOBIA11, 3T3KOBIE1, 3T3KOBIC5), kar kaže na pomembnost prisotnosti receptroja GPRB, pri stimulaciji aerobne glikolize v celicah 3T3 (Slika 17).

Za dodatno potrditev, da receptor GPRB posreduje zvečanje $[L\text{-laktat}]_i$ po stimulaciji s 5 μM Smart009, smo celice 3T3KOB transfecirali s plazmidom za konstitutivno izražanje GPRB (GPRB-FLAG). Dvojni vnos plazmidov Laconic in GPRB-FLAG smo optimizirali in uspešno kotransfekcijo potrdili s protitelesi proti označevalcu FLAG, ki ga kodira plazmid (Slika 18). Odzive v $[L\text{-laktat}]_i$ na stimulacijo s 5 μM Smart009 pri celicah 3T3KOBIE1 in 3T3KOBIC5 smo ponovno vzpostavili z vnosom GPRB-FLAG. V prisotnosti plazmida GPRB-FLAG se je odziv v $[L\text{-laktat}]_i$ po stimulaciji s Smart009 znatno povečal pri celicah 3T3KOBIE1 ($\text{AUC} = 106,8 \pm 77,3$) v primerjavi s kontrolo ($P \leq 0,001$; Slika 19B).

V primeru celic 3T3KOBIC5 se je v prisotnosti plazmida GPRB-FLAG odziv v [L-laktat]_i po stimulaciji s Smart009 znatno povečal pri celicah 3T3KOBIC5 ($AUC = 309,0 \pm 64,1 \%$; $n=27$) v primerjavi s kontrolo ($P \leq 0,01$; Slika 20B).

Ti rezultati podpirajo hipotezo, da spremembe [L-laktat]_i, ki jih izzovemo s Smart009 (5 μ M), zahtevajo prisotnost GPRB.

Z uporabo znanih selektivnih agonistov za GPRB (Dupuis in sod., 2017; Pillaiyar in sod., 2021) smo poskuse ponovili. Kot pričakovano po stimulaciji s agonistom 8535 (Dupuis in sod., 2017) pri celicah 3T3KOBIE1 v odzivu (1 μ M; $AUC = -44,47 \pm 31,74 \%$; $n = 21$) pri primerjavi s kontrolo ($P \leq 0,01$; dvosmerna ANOVA), ni bilo razlike. Odzivi na selektivni agonist so bili prisotni pri celicah 3T3KOBIE1 transfeciranih s plazmidom za konstitutivno izražanje GPRB. Pri tem so bili signifikantno višji ($AUC = 464,20 \pm 134,54 \%$; $n = 22$) kot pri celicah 3T3KOBIE1, brez plazmida ($P \leq 0,001$; dvosmerna ANOVA; Slika 21B).

Poskuse smo ponovili tudi s stimulacijo s selektivnim agonistom 8535n, ki ima namesto karbonilne skupine na istem mestu sulfonilno (Pillaiyar in sod., 2021). Pri stimulaciji z 1 μ M 8535n smo opazili zvečanje [L-laktat]_i v celicah 3T3WT ($AUC = 490,03 \pm 87,95 \%$; $n = 29$). Pri celicah 3T3KOBIE1 pa nismo zaznali odziva v [L-laktat]_i ($AUC = -73,02 \pm 31,55 \%$; $n=20$) oz. ni bilo razlike v odzivu v primerjavi s kontrolo ($P \leq 0,01$; dvosmerna ANOVA) (Slika 22). Ti rezultati so potrdili, da je za zvečanje [L-laktat]_i, po stimulaciji s selektivnim agonistom za GPRB, nujno potrebna prisotnost receptorja GPRB.

Doktorska disertacija je pripomogla k boljšemu razumevanju procesov uravnavanja laktata in cAMP v astrocitih in celicah 3T3 ter tako poglobila razumevanje vloge metabolitov v celični signalizaciji, ki je novo kompetitivno področje v fiziologiji in patofiziologiji osrednjega živčnega sistema.

8 SUMMARY

Astrocytes are neuroglia cells that maintain homeostasis in the central nervous system (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). They are known to be actively involved in many physiological and pathological processes of the CNS through the excretion of chemicals from the follicles (Verkhratsky and Nedergaard, 2018; Zorec et al., 2012). Due to their star-shaped shape, they are in close contact with synapses and blood vessels through many protrusions. This anatomically optimal placement allows them to signal between the endothelium and neurons, where they provide metabolic support to neural networks which are the main consumer of energy in the CNS (Dienel, 2019; Nortley and Attwell, 2017). Astrocytes are involved in the uptake of glucose from the bloodstream, which is transported to neurons as an energy source or stored in the form of glycogen. As neuronal activity increases, the glycogen which is stored in astrocytes is broken down into glucose by a process called aerobic glycolysis, and the resulting L-lactate (Kreft et al., 2013) is excreted into the extracellular space and transmitted to neurons (Astrocyte-neuron lactate shuttle, ANLS). In addition to its energy role, lactate also has a signaling function, probably acting as a primary carrier (Bergersen et al., 2001), where it acts as a volume carrier of information, as it can diffuse longer distances and activate receptors around the release site (Morland. 2015), in contrast to synaptic transmission, where the distance is only a few tens of nanometers (Borrito-Escuela et al., 2015; Lauritzen et al., 2014).

Through L-lactate, they are thought to have the ability to modulate the activity of noradrenergic neurons, where in the locus coeruleus nucleus, the release of L-lactate from activated astrocytes causes neuronal excitation and a consequent release of norepinephrine (NE) (Tang et al., 2014). L-lactate signaling also occurs through the activation of the lactate receptors, such as GPR81 or through a yet unidentified plasma membrane receptor (Tang et al., 2014; Vardjan et al., 2018). In astrocytes, extracellular L-lactate activates adenylyl cyclase (AC), resulting in an increased synthesis of intracellular cAMP ($[cAMP]_i$) and consequently accelerating aerobic glycolysis. Following the stimulation of astrocytes with selective agonists for the GPR81 receptor, an increase in $[cAMP]_i$ occurs even when cells do not express GPR81 (GPR81KO), suggesting that these agonists activate another yet unknown receptor mechanism.

The aim of this doctoral dissertation was to confirm the thesis that $[L-lactate]_i$ and $[cAMP]_i$ in astrocytes and 3T3 cells are heterogeneously distributed and that stimulation of astrocytes and 3T3 cells with agonist for different GPCR causes spatially heterogeneous changes in $[L-lactate]_i$ and in $[cAMP]_i$. In addition to astrocytes, we used 3T3MEF cells, as both cell types are characterized by the expression of aerobic glycolysis (Leibiger et al., 2013; Vardjan et al., 2018). Experiments were performed on rat astrocyte cell culture and 3T3 cell culture. Changes in $[L-lactate]_i$ and $[cAMP]_i$ were measured, using FRET nanosensors Laconic and Epac1-camps, respectively, in resting stage and after stimulation with GPCR agonists. These nanosensors are relatively independent of artifacts associated with the volume distribution of fluorescent markers. This was verified by calculating the Pearson correlation coefficient between the normalized sum of channel

fluorescence intensities (CFP + YFP for Epac1-camps or mTFP + Venus for Laconic), which is proportional to the amount of fluorophores in the cell, and the normalized channel ratio (CFP/YFP for Epac-camps and mTFP/Venus for Laconic), which represents the concentration of the investigated intracellular molecule. In the case of measuring $[cAMP]_i$ (CFP and YFP channels), the value of R was -0.01 in astrocytes (Figure 4U; $n = 492097$ pixels) and -0.06 in 3T3 cells (Figure 5U; $n = 151859$ pixels). In the case of measuring $[L-lactate]_i$ (mTFP and Venus channels) the value of R was -0.14 in astrocytes (Figure 6U; $n = 183725$ pixels), and -0.14 in 3T3 cells (Figure 7U; $n = 18531$ pixels).

Subcellular heterogeneity of cAMP distribution in both cell types was measured before and after NE stimulation, in microdomains that followed one another from the nucleus to the cell periphery. The concentration of cAMP in astrocytes decreased from the nucleus towards the periphery (Figure 8). In some 3T3 cells, a trend of decreasing cAMP concentration from the nucleus towards the cell periphery was observed (Fig. 9 A, B), while in others a trend of increasing concentration with distance from the nucleus was observed (Fig. 9 C, D). In the presence of a negative or positive signal trend from the nucleus to the resting cell periphery, the same trend was observed in the same cell even after NA stimulation (Figure 9).

We further found that in astrocytes and 3T3 cells, agonist stimulation for different GPCRs causes spatially heterogeneous changes in the intracellular distribution of cAMP as the results showed a positive correlation between resting and post-stimulation CFP/YFP ratio (Figure 10).

To determine the heterogeneity of the subcellular $[L-lactate]_i$ distribution we used the same approach as in determining the heterogeneity of the $[cAMP]_i$ distribution. We analyzed small circular regions of interest (diameter $2\mu m$), perpendicular from the nucleus toward the cell periphery. In all cases, a negative trend was present, which could mean that $[L-lactate]_i$ at rest and after stimulation with the Smart009 agonist decreases in the direction from the nucleus to the periphery of the cell (Figure 11 and Figure 12 A, B).

We additionally analyzed the intensity changes of regional responses to stimulation with Smart009, depending on the distance from the nucleus to the cell periphery. The values of the mTFP/Venus signal ratio at rest were subtracted from the values of the ratio after stimulation. In the case of astrocytes, a statistically significant decrease in the intensity of L-lactate production was observed in the vast majority of the analyzed directions of regional areas (9/10 directions; Table 3). There were fewer statistically significant changes in 3T3 cells (6/16 directions; Table 4), of which four were statistically significant decreases and two were statistically significant increases in subcellular L-lactate synthesis. Representative slopes for 3T3 cells are shown in Figures 12C, D. For each cell type, all normalized values of the resting mTFP/Venus ratios were compared with the values after stimulation, and a statistically significant positive correlation was detected in both cell types. Based on these results, we can conclude that microdomains with lower $[L-lactate]_i$ achieve relatively lower values of $[L-lactate]_i$ after stimulation, and microdomains with

relatively higher $[L\text{-lactate}]_i$ at rest achieve relatively higher $[L\text{-lactate}]_i$ after stimulation (Figure 13).

These findings contribute to the better understanding of cellular biological responses (i.e. L-lactate production) because it is expected that enzymes and substrates for L-lactate production are likely positioned within specific location and not homogeneously within the cytoplasm.

In the second part of this doctoral thesis, we searched for a new L-lactate receptor. We used 3T3 cells (wild type - 3T3WT) transfected with the Laconic nanosensor and tested the previously used selective agonist for GPR81, Smart075 (Dvorak et al., 2012) and ligand Smart009 (Zorec, 2018) to stimulate the increase in $[L\text{-lactate}]_i$ at different concentrations. In the case of Smart075 stimulation, a correlation was observed between the increase in agonist concentration and the increase in cell response in $[L\text{-lactate}]_i$. We hypothesize that a simple receptor mechanism is present here. In the case of Smart009 stimulation, the dose-response response was more complex, as response peaks were observed at more than one concentration. These results suggest that more than one receptor mechanism is present (Figures 14, 15). Next, we were interested in how to determine new receptors that regulate $[L\text{-lactate}]_i$.

Candidates for receptor genes were selected using bioinformatics analysis that included three criteria. The first criterion included GPCRs which were highly expressed in astrocytes (Zhang et al., 2014) (Table 7). The second criterion included RNA sequencing data, where we compared the expression of GPCR orphan genes in wild-type astrocytes with the expressions from the GPR81 knocked-out astrocytes (Vardjan in sod., 2018) (Table 8). The third criterion included the Euclidean distance binding data of the three GPR81 agonists (Table 9). Based on these three data sets, we selected 7 candidate GPCR genes (Figure 16A), four of which were GPCR orphans (gprA, gprB, gprC, gprD) which were of particular interest to us.

Subsequently, we used 3T3 cell lines with knocked out individual genes for 4 orphan candidate receptors (3T3KO cells). Based on the results of the dose dependence of 3T3WT cell stimulation (Fig. 15B, insert), we concluded that the receptor in question would mediate an increase in $[L\text{-lactate}]_i$ upon stimulation with 5–10 μM Smart009. Upon stimulation with a 5 μM Smart009 concentration, a reduced change in $[L\text{-lactate}]_i$ was expected in cells that did not express one of the candidate GPCRs. A significant difference was observed in the 3T3KOB cell line (Figure 16B), where cells carry a deletion of the gprB gene, which belongs to the family of highly conserved receptor genes expressed in the brain (SREB) (Matsumoto et al., 2000). This was confirmed in three independent clones of 3T3KOB cell lines (3T3KOBIA11, 3T3KOBIE1, 3T3KOBIC5), indicating the importance of the presence of the GPRB receptor in stimulating aerobic glycolysis in 3T3 cells (Figure 17).

To further confirm that the GPRB receptor mediates an increase in $[L\text{-lactate}]_i$ after stimulation with 5 μM Smart009, the 3T3KOB cells were transfected with the plasmid for constitutive expression of GPRB (GPRB-FLAG). The cotransfection of Laconic and GPRB-FLAG plasmids

was optimized and a successful cotransfection was confirmed with antibodies against the FLAG marker encoded by the plasmid (Figure 18).

Responses in $[L\text{-lactate}]_i$ to stimulation with 5 μM Smart009 in 3T3KOBIE1 and 3T3KOBIC5 cells were re-established by GPRB-FLAG transfection. In the presence of plasmid GPRB-FLAG, the response in $[L\text{-lactate}]_i$ after stimulation with Smart009 was significantly increased in 3T3KOBIE1 cells ($\text{AUC} = 106.8 \pm 77.3$) compared to the control ($P \leq 0.001$; Figure 19B).

In the case of 3T3KOBIC5 cells, in the presence of plasmid GPRB-FLAG, the response to $[L\text{-lactate}]_i$ after stimulation with Smart009 was significantly increased in 3T3KOBIC5 cells ($\text{AUC} = 309.0 \pm 64.1\%$; $n = 27$) compared to control ($P \leq 0.01$; Figure 20B).

These results support the hypothesis that changes in $[L\text{-lactate}]_i$ induced by Smart009 (5 μM) require the presence of GPRB.

Experiments were repeated using known selective agonists for GPRB (Dupuis et al., 2017; Pillaiyar et al., 2021). As expected after stimulation with agonist 8535 (Dupuis et al., 2017) in 3T3KOBIE1 cells there was no difference in response (1 μM ; $\text{AUC} = -44.47 \pm 31.74\%$; $n = 21$) compared to the controls ($P \leq 0.01$; Two way ANOVA). Responses to the selective agonist were present in 3T3KOBIE1 cells transfected with the plasmid for constitutive expression of GPRB. They were significantly higher ($\text{AUC} = 464.20 \pm 134.54\%$; $n = 22$) as opposed to the plasmid-free 3T3KOBIE1 cells ($P \leq 0.001$; bidirectional ANOVA; Figure 21B).

The experiments were repeated with the selective agonist 8535n, which has a sulfonyl instead of a carbonyl group at the same site (Pillaiyar et al., 2021). Upon stimulation with 1 μM 8535n, an increase in $[L\text{-lactate}]_i$ was observed in 3T3WT cells ($\text{AUC} = 490.03 \pm 87.95\%$; $n = 29$). In 3T3KOBIE1 cells, however, no response was detected in $[L\text{-lactate}]_i$ ($\text{AUC} = -73.02 \pm 31.55\%$; $n = 20$) or there was no difference in response compared to control ($P \leq 0.01$; Two way ANOVA) (Figure 22). These results confirmed that the presence of the GPRB receptor is essential for an increase in $[L\text{-lactate}]_i$ after stimulation with a selective GPRB agonist.

The doctoral dissertation contributed to a better understanding of the processes of lactate and cAMP regulation in astrocytes and 3T3 cells, thus deepening the understanding of the role of metabolites in cellular signaling, which is a new competitive field in central nervous system physiology and pathophysiology.

9 VIRI

- Agarwal S. R., Clancy C. E., Harvey R. D. 2016. Mechanisms Restricting Diffusion of Intracellular cAMP. *Scientific Reports*, 6, 19577 (2016), doi: 10.1038/srep19577: 11 str.
- Ahmed K., Tunaru S., Offermanns S. 2009. GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30: 557-562
- Allen M. D., Zhang J. 2006. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348: 716-721
- Beavo J. A., Brunton L. L. 2002. Cyclic nucleotide research - still expanding after half a century. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3: 710-718
- Belanger M., Allaman I., Magistretti P. J. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, 14: 724-738
- Bellot-Saez A., Kekesi O., Morley J. W., Buskila Y. 2017. Astrocytic modulation of neuronal excitability through K(+) spatial buffering. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 77: 87-97
- Bergersen L., Waerhaug O., Helm J., Thomas M., Laake P., Davies A. J., Wilson M. C., Halestrap A. P., Ottersen O. P. 2001. A novel postsynaptic density protein: the monocarboxylate transporter MCT2 is co-localized with delta-glutamate receptors in postsynaptic densities of parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Experimental Brain Research*, 136: 523-534
- Bers D. M., Xiang Y. K., Zaccolo M. 2019. Whole-Cell cAMP and PKA Activity are Epiphenomena, Nanodomain Signaling Matters. *Physiology (Bethesda)*, 34: 240-249
- Bock A., Annibale P., Konrad C., Hannawacker A., Anton S. E., Maiellaro I., Zabel U., Sivaramakrishnan S., Falcke M., Lohse M. J. 2020. Optical Mapping of cAMP Signaling at the Nanometer Scale. *Cell*, 182: 1519-1530
- Borroto-Escuela D. O., Agnati L. F., Bechter K., Jansson A., Tarakanov A. O., Fuxe K. 2015. The role of transmitter diffusion and flow versus extracellular vesicles in volume transmission in the brain neural-glial networks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370, 20140183, doi: 10.1098/rstb.2014.0183: 14 str.
- Bos J. L. 2003. Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 733-738
- Bowser D. N., Khakh B. S. 2004. ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. *Journal of Neurosciences*, 24: 8606-8620

- Brannan D. A., Brannan D. A., Esplen M. F., Gray J. J. 1999. Geometry. 1st ed., Cambridge, University Press: 373-375
- Brooks G. A. 2009. Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 587: 5591-5600
- Brunton B. A. 1983. Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*, 258: 10233-10239
- Cai T. Q., Ren N., Jin L., Cheng K., Kash S., Chen R., Wright S. D., Taggart A. K., Waters M. G. 2008. Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 377: 987-991
- Calebiro D., Maiellaro I. 2014. cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods. *Frontiers Cellular Neuroscience*, 8, doi: 10.3389/fncel.2014.00350: 9 str.
- Chopra D. G., Yiv N., Hennings T. G., Zhang Y., Ku G. M. 2020. Deletion of Gpr27 in vivo reduces insulin mRNA but does not result in diabetes. *Scientific Reports*, 10: 9
- Clegg R. M. 2006. The History of FRET. V: Reviews in Fluorescence. Geddes, C. D., Lakowicz, J. R. (ur.). Boston, MA, Springer: 1-45
- Dienel G. A. 2019. Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. *Physiological Reviews*, 99: 949-1045
- Dipilato L. M., Cheng X., Zhang J. 2004. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 101: 16513-16518
- Donahue B. S., Abercrombie R. F. 1987. Free diffusion coefficient of ionic calcium in cytoplasm. *Cell Calcium*, 8: 437-448
- Dupuis N., Laschet C., Franssen D., Szpakowska M., Gilissen J., Geubelle P., Soni A., Parent A. S., Pirotte B., Chevine A., Twizere J. C., Hanson J. 2017. Activation of the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR27 by Surrogate Ligands Promotes beta-Arrestin 2 Recruitment. *Molecular Pharmacology*, 91: 595-608
- Dvorak C. A., Liu C., Shelton J., Kuei C., Sutton S. W., Lovenberg T. W., Carruthers N. I. 2012. Identification of Hydroxybenzoic Acids as Selective Lactate Receptor (GPR81) Agonists with Antilipolytic Effects. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3: 637-639

- Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 84: 7413-7417
- Fink K., Velebit J., Vardjan N., Zorec R., Kreft M. 2021. Noradrenaline-induced l-lactate production requires d-glucose entry and transit through the glycogen shunt in single-cultured rat astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 99: 1084-1098
- Förster T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437: 55-75
- G Grynkiewicz M. P., R Y Tsien. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 3440-3450
- Ge H., Weiszmann J., Reagan J. D., Gupte J., Baribault H., Gyuris T., Chen J. L., Tian H., Li Y. 2008. Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81. *Journal of Lipid Research*, 49: 797-803
- Gordon G. R., Choi H. B., Rungta R. L., Ellis-Davies G. C., Macvicar B. A. 2008. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*, 456: 745-749
- Henneberger C., Papouin T., Oliet S. H., Rusakov D. A. 2010. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*, 463: 232-236
- Hilger D., Masureel M., Kobilka B. K. 2018. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural Molecular Biology*, 25: 4-12
- Hodgkin A. L., Keynes R. D. 1953. The mobility and diffusion coefficient of potassium in giant axons from *Sepia*. *The Journal of Physiology*, 119: 513-528
- Horvat A., Zorec R., Vardjan N. 2016. Adrenergic stimulation of single rat astrocytes results in distinct temporal changes in intracellular Ca^{2+} and cAMP-dependent PKA responses. *Cell Calcium*, 59: 156-163
- Horvat A., Zorec R., Vardjan N. 2021. Lactate as an Astroglial Signal Augmenting Aerobic Glycolysis and Lipid Metabolism. *Frontiers in Physiology*, 12, 735532, doi: 10.3389/fphys.2021.735532: 11 str.
- Jurevicius J., Skeberdis V. A., Fischmeister R. 2003. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in cAMP compartmentation following beta2-adrenergic stimulation of ICa,L in frog ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*, 551: 239-252

- Kreft M., Luksic M., Zorec T. M., Prebil M., Zorec R. 2013. Diffusion of D-glucose measured in the cytosol of a single astrocyte. *Cellular Molecular Life Sciences*, 70: 1483-1492
- Lakowicz J. R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York, Springer: 954 str.
- Lauritzen K. H., Morland C., Puchades M., Holm-Hansen S., Hagelin E. M., Lauritzen F., Attramadal H., Storm-Mathisen J., Gjedde A., Bergersen L. H. 2014. Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Cerebral Cortex*, 24: 2784-2795
- Leibiger C., Kosyakova N., Mkrtchyan H., Gleib M., Trifonov V., Liehr T. 2013. First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 61: 306-312
- Li J., Ning Y., Hedley W., Saunders B., Chen Y., Tindill N., Hannay T., Subramaniam S. 2002. The Molecule Pages database. *Nature*, 420: 716-717
- Liu C., Kuei C., Zhu J., Yu J., Zhang L., Shih A., Mirzadegan T., Shelton J., Sutton S., Connelly M. A., Lee G., Carruthers N., Wu J., Lovenberg T. W. 2012. 3,5-Dihydroxybenzoic acid, a specific agonist for hydroxycarboxylic acid 1, inhibits lipolysis in adipocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341: 794-801
- Liu C., Wu J., Zhu J., Kuei C., Yu J., Shelton J., Sutton S. W., Li X., Yun S. J., Mirzadegan T., Mazur C., Kamme F., Lovenberg T. W. 2009. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *Journal Biological Chemistry*, 284: 2811-2822
- Maiellaro I., Lohse M. J., Kittel R. J., Calebiro D. 2016. cAMP Signals in Drosophila Motor Neurons Are Confined to Single Synaptic Boutons. *Cell Reports*, 17: 1238-1246
- Martin A. L., Steurer M. A., Aronstam R. S. 2015. Constitutive Activity among Orphan Class-A G Protein Coupled Receptors. *PLoS One*, 10, 9:e0138463, doi: 10.1371/journal.pone.0138463: 12 str.
- Matsumoto M., Saito T., Takasaki J., Kamohara M., Sugimoto T., Kobayashi M., Tadokoro M., Matsumoto S., Ohishi T., Furuichi K. 2000a. An evolutionarily conserved G-protein coupled receptor family, SREB, expressed in the central nervous system. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 272: 576-582
- Matsumoto M., Saito T., Takasaki J., Kamohara M., Sugimoto T., Kobayashi M., Tadokoro M., Matsumoto S., Ohishi T., Furuichi K. 2000b. An evolutionarily conserved G-protein coupled

- receptor family, SREB, expressed in the central nervous system. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 272: 576-582
- Maver A. 2020. Standardizacija protokola meritev L-laktata v posamezni celici 3T3-L1. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 38 str.
- Morland C., Lauritzen K. H., Puchades M., Holm-Hansen S., Andersson K., Gjedde A., Attramadal H., Storm-Mathisen J., Bergersen L. H. 2015. The lactate receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: Expression and action in brain. *Journal of Neuroscience Research*, 93: 1045-1055
- Munk C., Isberg V., Mordalski S., Harpsoe K., Rataj K., Hauser A. S., Kolb P., Bojarski A. J., Vriend G., Gloriam D. E. 2016. GPCRdb: the G protein-coupled receptor database - an introduction. *British Journal of Pharmacology*, 173: 2195-2207
- Murphy-Royal C., Dupuis J., Groc L., Olié S. H. R. 2017. Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. *Journal of Neuroscience Research*, 95: 2140-2151
- Nikolaev V. O., Bunemann M., Hein L., Hannawacker A., Lohse M. J. 2004. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 37215-37218
- Nikolaev V. O., Lohse M. J. 2006. Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells. *Physiology (Bethesda)*, 21: 86-92
- Nortley R., Attwell D. 2017. Control of brain energy supply by astrocytes. *Current Opinion in Neurobiology*, 47: 80-85
- Panatier A., Theodosis D. T., Mothet J. P., Touquet B., Pollegioni L., Poulain D. A., Olié S. H. 2006. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell*, 125: 775-784
- Pellerin L., Magistretti P. J. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 10625-10629
- Pellerin L., Pellegrini G., Bittar P. G., Charnay Y., Bouras C., Martin J. L., Stella N., Magistretti P. J. 1998. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Developmental Neuroscience*, 20: 291-299

- Peng L., Huang R., Yu A. C., Fung K. Y., Rathbone M. P., Hertz L. 2005. Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. *Glia*, 52: 25-35
- Pillaiyar T., Rosato F., Wozniak M., Blavier J., Charles M., Laschet C., Kronenberger T., Muller C. E., Hanson J. 2021. Structure-activity relationships of agonists for the orphan G protein-coupled receptor GPR27. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 225: 113777
- Pirnat S., Bozic M., Dolanc D., Horvat A., Tavcar P., Vardjan N., Verkhatsky A., Zorec R., Stenovec M. 2021. Astrocyte arborization enhances Ca(2+) but not cAMP signaling plasticity. *Glia*, 69: 2899-2916
- Richards M., Lomas O., Jalink K., Ford K. L., Vaughan-Jones R. D., Lefkimmiatis K., Swietach P. 2016. Intracellular tortuosity underlies slow cAMP diffusion in adult ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, 110: 395-407
- Sakurai T., Davenport R., Stafford S., Grosse J., Ogawa K., Cameron J., Parton L., Sykes A., Mack S., Bousba S., Parmar A., Harrison D., Dickson L., Leveridge M., Matsui J., Barnes M. 2014. Identification of a novel GPR81-selective agonist that suppresses lipolysis in mice without cutaneous flushing. *European Journal of Pharmacology*, 727, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.029: 7 str.
- San Martin A., Ceballo S., Ruminot I., Lerchundi R., Frommer W. B., Barros L. F. 2013. A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. *PLoS One*, 8, 2:e57712, doi: 10.1371/journal.pone.0057712: 11 str.
- Sekar R. B., Periasamy A. 2003. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *Journal of Cell Biology*, 160: 629-633
- Shrestha D., Jenei A., Nagy P., Vereb G., Szollosi J. 2015. Understanding FRET as a research tool for cellular studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 6718-6756
- Stobart J. L., Anderson C. M. 2013. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 38, doi: 10.3389/fncel.2013.00038: 21 str.
- Suzuki A., Stern S. A., Bozdagi O., Huntley G. W., Walker R. H., Magistretti P. J., Alberini C. M. 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 144: 810-823
- Tang F., Lane S., Korsak A., Paton J. F., Gourine A. V., Kasparov S., Teschemacher A. G. 2014. Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nature Communications*, 5, 3284, doi: 10.1038/ncomms4284: 14 str.

- Tasken K., Aandahl E. M. 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiological Reviews*, 84: 137-167
- Trott O., Olson A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31: 455-461
- Vardjan N., Chowdhury H. H., Horvat A., Velebit J., Malnar M., Muhic M., Kreft M., Krivec S. G., Bobnar S. T., Mis K., Pirkmajer S., Offermanns S., Henriksen G., Storm-Mathisen J., Bergersen L. H., Zorec R. 2018. Enhancement of Astroglial Aerobic Glycolysis by Extracellular Lactate-Mediated Increase in cAMP. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 148, doi: 10.3389/fnmol.2018.00148: 15 str.
- Vardjan N., Kreft M., Zorec R. 2014. Dynamics of beta-adrenergic/cAMP signaling and morphological changes in cultured astrocytes. *Glia*, 62: 566-579
- Vardjan N., Zorec R. 2015. Excitable Astrocytes: Ca(2+)- and cAMP-Regulated Exocytosis. *Neurochemical Research*, 40: 2414-2424
- Verkhratsky A., Nedergaard M. 2018. Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*, 98: 239-389
- Von Lenhossék M., Mills W. 1895. *Der feinere Bau des Nervensystems im lichte neuester Forschungen*, Berlin, Fischer: 409 str.
- Wang D. D., Bordey A. 2008. The astrocyte odyssey. *Progress Neurobiology*, 86: 342-367
- Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*, 123: 309-314
- Weis W. I., Kobilka B. K. 2018. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annual Review Biochemistry*, 87: 897-919
- Yang D., Zhou Q., Labroska V., Qin S., Darbalaei S., Wu Y., Yuliantie E., Xie L., Tao H., Cheng J., Liu Q., Zhao S., Shui W., Jiang Y., Wang M. W. 2021. G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 7, doi: 10.1038/s41392-020-00435-w: 27 str.
- Zaccolo M. 2011. Spatial control of cAMP signalling in health and disease. *Current Opinion Pharmacology*, 11: 649-655
- Zaccolo M., De Giorgi F., Cho C. Y., Feng L., Knapp T., Negulescu P. A., Taylor S. S., Tsien R. Y., Pozzan T. 2000. A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nature Cell Biology*, 2: 25-29

- Zaccolo M., Pozzan T. 2002. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*, 295: 1711-1715
- Zaccolo M., Zerio A., Lobo M. J. 2021. Subcellular Organization of the cAMP Signaling Pathway. *Pharmacological Reviews*, 73: 278-309
- Zhang J. Z., Lu T. W., Stolerman L. M., Tenner B., Yang J. R., Zhang J. F., Falcke M., Rangamani P., Taylor S. S., Mehta S., Zhang J. 2020. Phase Separation of a PKA Regulatory Subunit Controls cAMP Compartmentation and Oncogenic Signaling. *Cell*, 182: 1531-1544
- Zhang Y., Chen K., Sloan S. A., Bennett M. L., Scholze A. R., O'keeffe S., Phatnani H. P., Guarnieri P., Caneda C., Ruderisch N., Deng S., Liddelow S. A., Zhang C., Daneman R., Maniatis T., Barres B. A., Wu J. Q. 2014. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 34: 11929-11947
- Zorec R., Araque A., Carmignoto G., Haydon P. G., Verkhratsky A., Parpura V. 2012. Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro*, 4, 2, doi: 10.1042/an20110061: 17 str.
- Zorec T. M. 2018. Method for identifying a compound useful in mitigating and/or the treatment of a disease associated with abnormal astrocytic function. 16778017.0: 25 str.

Priloga A

Preglednica 1: Podcelična heterogenost [cAMP]_i v astrocih. Koeficienti naklonov regresijskih premic (k), ki predstavljajo relativno spremembo podceličnega [cAMP]_i v majhnih krožnih regijah zanimanja (premer 2 µm), ki so bile postavljene v ravni črti pravokotno od jedra proti obrobju celice. Funkcije linearne regresije opisujejo razmerje fluorescenčnih kanalov CFP/YFP glede na oddaljenost od jedra med: (i) razmerjem kanalov CFP/YFP v mirovanju in oddaljenostjo od jedra (Spr. v mirovanju z razd.); (ii) razmerjem kanalov CFP/YFP po stimulaciji in oddaljenostjo od jedra (Spr. po stim. z razd.); (iii) razmerjem kanalov CFP/YFP pred in po stimulaciji (Mirovanje s stim.); (iv) razlika med razmerjem kanalov CFP/YFP pred in po stimulaciji v odvisnosti od oddaljenosti od jedra (Spr. razlike z razd.). Statistično značilni koeficienti naklonov so označeni z * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001. Koeficienti označeni z NS, niso različno od 0 (Studentov t-test).

Cel.	Št. smeri	Spr. v mirovanju z razd.		Spr. po stim. z razd.		Mirovanje s stim.		Spr. razlike z razd.		Št. regij zanimanja
		k(x10 ⁻³)	znač.	k(x10 ⁻³)	znač.	k	znač.	k(x10 ⁻³)	znač.	
1	1	-5,1 ± 1,7	*	-12,6 ± 3,0	**	1,5 ± 0,5	*	-7,5 ± 2,9	*	12
	2	-18,3 ± 4,4	**	-21,1 ± 6,0	**	1,2 ± 0,2	***	-2,9 ± 3,5	NS	9
2	1	-2,3 ± 1,1	NS	-9,0 ± 0,9	***	1,0 ± 0,5	*	-6,7 ± 1,3	***	16
	2	-1,7 ± 2,6	NS	0,1 ± 2,6	NS	0,8 ± 0,2	**	1,9 ± 1,6	NS	12
3	1	-6,6 ± 0,8	***	-4,3 ± 1,7	*	0,8 ± 0,2	***	2,3 ± 1,3	NS	16
	2	-30,3 ± 5,3	**	-26,6 ± 7,5	*	0,9 ± 0,1	**	3,7 ± 4,0	NS	6
4	1	-29,0 ± 3,7	***	-38,6 ± 7,9	**	1,4 ± 0,2	***	-9,6 ± 5,1	NS	8
	2	-10,3 ± 7,7	NS	-0,7 ± 10,7	NS	1,0 ± 0,3	*	9,6 ± 4,7	NS	7
5	1	-15,3 ± 6,2	*	-14,5 ± 4,8	*	0,7 ± 0,2	**	0,9 ± 4,7	NS	9
	2	21,1 ± 8,4	NS	22,0 ± 8,1	NS	1,0 ± 0,1	**	0,9 ± 2,6	NS	5
6	1	-6,9 ± 1,2	***	-7,5 ± 1,1	***	1,0 ± 0,1	***	-0,6 ± 0,6	NS	17
	2	-29,1 ± 4,9	**	-31,0 ± 3,4	***	1,0 ± 0,1	***	1,9 ± 2,8	NS	6
7	1	-8,6 ± 2,5	**	-14,4 ± 2,4	***	1,0 ± 0,4	*	-5,8 ± 3,4	NS	10
	2	-15,1 ± 4,3	*	-14,5 ± 4,5	*	0,9 ± 0,1	**	0,6 ± 2,5	NS	6
8	1	-7,1 ± 1,7	***	-8,4 ± 1,2	***	0,7 ± 0,2	***	-1,2 ± 1,8	NS	17
	2	-34,6 ± 9,0	NS	-5,2 ± 20,5	NS	0,3 ± 0,5	NS	29,4 ± 15,1	NS	4

Preglednica 2: Podcelična heterogenost [cAMP]_i v celicah 3T3. Koeficienti naklonov regresijskih premic (k), ki predstavljajo relativno spremembo podceličnega cAMP v majhnih krožnih regijah zanimanja (premer 2 μ m), ki so bile postavljene v ravni črti pravokotno od jedra proti obrobju celice. Funkcije linearne regresije opisujejo razmerje kanalov CFP/YFP glede na oddaljenost od jedra med: (i) razmerjem fluorescenčnih kanalov CFP/YFP v mirovanju in oddaljenostjo od jedra (Spr. v mirovanju z razd.); (ii) razmerjem kanalov CFP/YFP po stimulaciji in oddaljenostjo od jedra (Spr. po stim. z razd.); (iii) razmerjem kanalov CFP/YFP pred in po stimulaciji (Mirovanje s stim.); (iv) razlika med razmerjem kanalov CFP/YFP pred in po stimulaciji v odvisnosti od oddaljenosti od jedra (Spr. razlike z razd.). Statistično značilni koeficienti naklonov so označeni z * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Koeficienti označeni z NS, niso različno od 0 (Studentov t-test).

Cel.	Št. smeri	Spr. v mirovanju z razd.		Spr. po stim. z razd.		Mirovanje s stim.		Spr. razlike z razd.		Št. regij zanimanja
		k(x10 ⁻²)	znač.	k(x10 ⁻²)	znač.	k	znač.	k(x10 ⁻²)	znač.	
1	1	-0,6 $\pm$ 0,8	NS	-6,6 $\pm$ 4,2	NS	6,6 $\pm$ 2,2	NS	-6,0 $\pm$ 3,5	NS	4
	2	2,3 $\pm$ 2,7	NS	6,2 $\pm$ 3,9	NS	1,7 $\pm$ 0,5	NS	3,9 $\pm$ 1,5	NS	4
2	1	-5,1 $\pm$ 1,3	NS	-8,0 $\pm$ 3,2	NS	1,5 $\pm$ 0,6	NS	-2,9 $\pm$ 3,2	NS	4
	2	1,6 $\pm$ 3,8	NS	-6,2 $\pm$ 3,7	NS	0,5 $\pm$ 1,0	NS	-7,8 $\pm$ 1,8	*	4
3	1	-1,5 $\pm$ 0,3	*	-6,3 $\pm$ 2,1	*	4,4 $\pm$ 0,6	**	-4,7 $\pm$ 1,8	NS	6
	2	-3,9 $\pm$ 0,7	*	-9,4 $\pm$ 3,7	NS	2,5 $\pm$ 0,6	*	-5,4 $\pm$ 3,1	NS	4
4	1	0,8 $\pm$ 2,3	NS	3,0 $\pm$ 2,6	NS	0,2 $\pm$ 0,7	NS	2,3 $\pm$ 3,4	NS	5
	2	2,6 $\pm$ 1,6	NS	3,2 $\pm$ 0,4	**	0,7 $\pm$ 0,3	NS	0,7 $\pm$ 1,2	NS	5
5	1	2,8 $\pm$ 0,7	*	2,5 $\pm$ 1,0	*	1,0 $\pm$ 0,1	***	-0,3 $\pm$ 0,4	NS	7
	2	0,9 $\pm$ 0,6	NS	1,2 $\pm$ 0,2	**	0,7 $\pm$ 0,3	NS	0,2 $\pm$ 0,4	NS	5
6	1	-0,3 $\pm$ 0,7	NS	0,3 $\pm$ 1,5	NS	-0,9 $\pm$ 1,1	NS	0,6 $\pm$ 1,9	NS	5
	2	1,5 $\pm$ 1,8	NS	0,6 $\pm$ 0,7	NS	0,4 $\pm$ 0,1	*	-0,9 $\pm$ 1,2	NS	5
7	1	-2,6 $\pm$ 1,6	NS	-3,2 $\pm$ 1,0	*	0,8 $\pm$ 0,2	*	-0,6 $\pm$ 0,8	NS	6
	2	0,4 $\pm$ 2,2	NS	5,2 $\pm$ 1,6	*	0,3 $\pm$ 0,9	NS	4,8 $\pm$ 2,4	NS	5
8	1	1,0 $\pm$ 0,3	*	2,4 $\pm$ 2,3	NS	0,4 $\pm$ 2,3	NS	1,5 $\pm$ 2,5	NS	6
	2	-3,3 $\pm$ 1,1	*	-4,3 $\pm$ 0,7	**	1,1 $\pm$ 0,2	**	-0,9 $\pm$ 0,6	NS	6

Preglednica 3: Podcelična heterogenost [L-laktat]_i v astrocitih. Koeficienti naklonov regresijskih premic (k), ki predstavljajo relativno spremembo podceličnega [L-laktat]_i v majhnih krožnih regijah zanimanja (premer 2 μm), ki so bile postavljene v ravni črti pravokotno od jedra proti obrobju celice. Funkcije linearne regresije opisujejo razmerje kanalov mTFP/Venus glede na oddaljenost od jedra med: (i) razmerjem fluorescenčnih kanalov mTFP/Venus v mirovanju in oddaljenostjo od jedra (Spr. v mirovanju z razd.); (ii) razmerjem kanalov mTFP/Venus po stimulaciji in oddaljenostjo od jedra (Spr. po stim. z razd.); (iii) razmerjem kanalov mTFP/Venus pred in po stimulaciji (Mirovanje s stim.); (iv) razlika med razmerjem kanalov mTFP/Venus pred in po stimulaciji v odvisnosti od oddaljenosti od jedra (Spr. razlike z razd.). Statistično značilni koeficienti naklonov so označeni z * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001. Koeficienti označeni z NS, niso različno od 0 (Studentov t-test).

Cel.	Št. smeri	Spr. v mirovanju z razd.		Spr. po stim. z razd.		Mirovanje s stim.		Spr. razlike z razd.		Št. regij zanimanja
		k	znač.	k	znač.	k	znač.	k(x10 ⁻³)	znač.	
1	1	-2,2 ± 0,2	***	-2,9 ± 0,2	***	1,3 ± 0,0	***	-7,3 ± 0,8	***	22
	2	-3,0 ± 0,4	***	-3,5 ± 0,5	***	1,2 ± 0,0	***	-5,2 ± 1,4	**	19
2	1	-1,1 ± 0,2	***	-1,6 ± 0,2	***	1,2 ± 0,1	***	-4,9 ± 0,7	***	24
	2	-1,8 ± 0,5	***	-2,0 ± 0,5	***	1,1 ± 0,0	***	-2,4 ± 0,9	*	16
3	1	-2,0 ± 0,6	**	-2,5 ± 0,6	***	1,0 ± 0,1	***	-5,5 ± 1,5	**	19
	2	-4,5 ± 0,4	***	-5,6 ± 0,3	***	1,2 ± 0,1	***	-10,7 ± 2,4	**	11
4	1	-3,2 ± 0,8	***	-3,7 ± 0,7	***	1,0 ± 0,1	***	-5,0 ± 1,5	**	15
	2	-3,4 ± 0,6	***	-3,6 ± 0,5	***	1,0 ± 0,1	***	-2,4 ± 2,1	NS	15
5	1	2,6 ± 2,7	NS	-0,1 ± 0,3	NS	1,0 ± 0,1	***	-3,7 ± 1,1	**	27
	2	-3,3 ± 0,4	***	-3,5 ± 0,3	***	1,1 ± 0,0	***	-2,7 ± 1,2	*	18

Preglednica 4: Podcelična heterogenost koncentracije L-laktata ([L-laktat]_i) v astrocitih. Koeficienti naklonov regresijskih premic (k), ki predstavljajo relativno spremembo ([L-laktat]_i v majhnih regijah zanimanja, ki so bile postavljene v ravni črti od jedra proti periferiji celic. Naklon (k) premice določene z regresijo opisujejo [L-laktat]_i glede na oddaljenost od jedra med: (i) [L-laktat]_i (razmerje kanalov mTFP/Venus) v mirovanju in oddaljenostjo od jedra (Spr. [L-laktat]_i v mirovanju z razd.); (ii) ([L-laktat]_i po stimulaciji in oddaljenostjo od jedra (Spr. [L-laktat]_i po stim. z razd.); (iii) ([L-laktat]_i pred in po stimulaciji (Korelacija: mirovanje s stim.); (iv) razlika med [L-laktat]_i pred in po stimulaciji v odvisnosti od oddaljenosti od jedra (Spr. razlike: stim.- mir.[L-laktat]_i in razd.). Statistično značilni koeficienti naklonov so označeni z * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001. Koeficienti označeni z NS, niso različni od 0 (Studentov t-test).

Cel.	Št. smeri	Spr. [L-laktat] _i v mirovanju z razd.		Spr. [L-laktat] _i po stim. z razd.		Korelacija: mirovanje s stim.		Spr. razlike: stim.- mir.[L-laktat] _i in razd.		Št. regij zanimanja
		k(x10 ⁻³)	znač.	k(x10 ⁻³)	znač.	k	znač.	k(x10 ⁻³)	znač.	
1	1	-32,2 ± 5,1	***	-41,2 ± 5,3	***	1,2 ± 0,1	***	-9,1 ± 1,8	***	11
	2	-55,2 ± 16,9	*	-63,5 ± 18,1	*	1,1 ± 0,0	***	-8,3 ± 1,9	**	7
2	1	-1,3 ± 6,7	NS	-7,2 ± 4,3	NS	0,6 ± 0,1	***	-5,9 ± 3,7	NS	13
	2	-9,6 ± 7,8	NS	-7,6 ± 9,1	NS	1,1 ± 0,1	***	2,0 ± 2,5	NS	13
3	1	-15,9 ± 10,4	NS	-5,6 ± 9,5	NS	0,8 ± 0,1	***	10,2 ± 2,5	**	9
	2	-25,0 ± 13,2	NS	-48,3 ± 14,7	*	1,4 ± 0,2	***	-23,3 ± 3,0	***	7
4	1	-55,1 ± 6,5	***	-45,9 ± 6,7	***	0,8 ± 0,1	***	9,2 ± 3,2	*	8
	2	-18,2 ± 8,0	*	-23,5 ± 7,0	**	1,0 ± 0,1	***	-5,3 ± 3,5	NS	11
5	1	15,6 ± 8,9	NS	16,5 ± 11,0	NS	1,2 ± 0,1	***	0,9 ± 3,6	NS	11
	2	-37,7 ± 14,7	NS	-35,3 ± 6,2	**	0,7 ± 0,2	*	2,4 ± 10,2	NS	6
6	1	-22,7 ± 3,3	***	-22,6 ± 2,9	***	1,0 ± 0,1	***	0,0 ± 1,5	NS	15
	2	39,8 ± 22,2	NS	41,0 ± 28,2	NS	1,1 ± 0,1	**	1,2 ± 7,5	NS	5
7	1	-12,2 ± 2,3	***	-13,7 ± 2,6	***	1,1 ± 0,1	***	-1,5 ± 1,2	NS	21
	2	-22,7 ± 6,6	**	-29,1 ± 6,7	***	1,1 ± 0,1	***	-6,5 ± 1,6	***	16
8	1	-1,8 ± 0,9	NS	-2,0 ± 0,9	*	1,1 ± 0,1	***	0,2 ± 0,2	NS	13
	2	-31,1 ± 10,3	*	-45,1 ± 10,3	**	1,2 ± 0,2	***	-13,9 ± 5,8	NS	7

Preglednica 5: Odzivnost celic 3T3WT na stimulacijo s Smart075 in Smart009.

Concentration [μM]	Odzivnost celic (%)		Odzivne celice (vse celice)		AUC (%)	
	Smart075	Smart009	Smart075	Smart009	Smart075	Smart009
0	0	0	0(13)	0(6)	-1.19 ± 0,15	0.17 ± 0,78
0.5	10	0	3(30)	0(26)	-1.11 ± 0.83	-0.05 ± 0.55
2.5	4	3	1(29)	1(31)	1.02 ± 0.85	1.68 ± 1.03
5	18	15	11(61)	12(81)	4.46 ± 0.92	8.55 ± 1.34
10	28	32	9(32)	9(28)	8.68 ± 2.11	8.57 ± 1.99
50	32	4*	6(19)	1(26)	11.41 ± 3.07	0.46 ± 0.64 ^{##}
100	33	9	6(12)	1(11)	24.56 ± 6.78	2.76 ± 1.26
500	66	39	46(70)	34(88)	46.46 ± 5.37	14.06 ± 1.50 ^{###}
1000	87	30*	33(38)	17(57)	67.26 ± 4.84	12.87 ± 1.94 ^{###}
2000	100	80	17(17)	12(15)	92.38 ± 7.96	35.57 ± 4.50 ^{###}

Preglednica 6: Zbirka uporabljenih GPCR proteinov v bioinformatični analizi

#	Gen	Protein	Koda UniProt
1	<i>5ht1a</i>	5-Hydroxytryptamine Receptor 1A	P08908
2	<i>5ht2a</i>	5-Hydroxytryptamine Receptor 2A	P28223
3	<i>5ht2c</i>	5-Hydroxytryptamine Receptor 2C	P28335
4	<i>5ht4r</i>	5-Hydroxytryptamine Receptor 4	Q13639
5	<i>5ht5a</i>	5-Hydroxytryptamine Receptor 5A	P47898
6	<i>5ht6r</i>	5-Hydroxytryptamine Receptor 6	P50406
7	<i>5ht7r</i>	5-Hydroxytryptamine Receptor 7	P34969
8	<i>aa2br</i>	Adenosine A2b Receptor	P29275
9	<i>aa3r</i>	Adenosine A3 Receptor	P0DMS8
10	<i>ackr1</i>	Atypical Chemokine Receptor 1	Q16570
11	<i>ackr2</i>	Atypical Chemokine Receptor 2	O00590
12	<i>ackr3</i>	Atypical Chemokine Receptor 3	P25106
13	<i>ackr4</i>	Atypical Chemokine Receptor 4	Q9NPB9
14	<i>acm3</i>	Muscarinic Acetylcholine Receptor M3	A0A0X3PH97
15	<i>acm5</i>	Cholinergic Receptor Muscarinic 5	P08912
16	<i>acthr</i>	Melanocortin 2 Receptor	Q01718
17	<i>ada1a</i>	Adrenoceptor Alpha 1A	P35348
18	<i>ada1b</i>	Adrenoceptor Alpha 1B	P35368
19	<i>ada1d</i>	Adrenoceptor Alpha 1D	P25100
20	<i>ada2a</i>	Adrenoceptor Alpha 2A	P08913

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 6

#	Gen	Protein	Koda UniProt
21	<i>ada2b</i>	Adrenoceptor Alpha 2B	P18089
22	<i>ada2c</i>	Adrenoceptor Alpha 2C	P18825
23	<i>adrb1</i>	Adrenoceptor Beta 1	P08588
24	<i>adrb3</i>	Adrenoceptor Beta 3	P13945
25	<i>agtr2</i>	Angiotensin II Receptor Type 2	P50052
26	<i>apj</i>	Apelin Receptor	P35414
27	<i>bkrb1</i>	Bradykinin Receptor B1	P46663
28	<i>bkrb2</i>	Bradykinin Receptor B2	P30411
29	<i>brs3</i>	Bombesin Receptor Subtype 3	P32247
30	<i>c3ar</i>	Complement C3a Receptor 1	Q16581
31	<i>c5ar1</i>	Complement C5a Receptor 1	P21730
32	<i>c5ar2</i>	Complement Component 5a Receptor 2	Q9P296
33	<i>cckar</i>	Cholecystokinin A Receptor	P32238
34	<i>ccr1</i>	C-C Motif Chemokine Receptor 1	P32246
35	<i>ccr10</i>	C-C Motif Chemokine Receptor 10	P46092
36	<i>ccr3</i>	C-C Motif Chemokine Receptor 3	P51677
37	<i>ccr4</i>	C-C Motif Chemokine Receptor 4	P51679
38	<i>ccr6</i>	C-C Motif Chemokine Receptor 6	P51684
39	<i>ccr7</i>	C-C Motif Chemokine Receptor 7	P32248
40	<i>ccr8</i>	C-C Motif Chemokine Receptor 8	P51685
41	<i>ccrl2</i>	C-C Motif Chemokine Receptor Like 2	O00421
42	<i>cltr1</i>	Cysteinyl Leukotriene Receptor 1	Q9Y271
43	<i>cltr2</i>	Cysteinyl Leukotriene Receptor 2	Q9NS75
44	<i>cm1l</i>	N-Acetyltransferase 8	Q9UHE5
45	<i>cnr2</i>	Cannabinoid Receptor 2	P34972
46	<i>cx3c1</i>	C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1	P49238
47	<i>cxcr1</i>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 1	P25024
48	<i>cxcr2</i>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 2	P25025
49	<i>cxcr3</i>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 3	P49682
50	<i>cxcr5</i>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 5	P32302
51	<i>cxcr6</i>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 6	O00574
52	<i>drd1</i>	Dopamine Receptor D1	P21728
53	<i>drd2</i>	Dopamine Receptor D2	P14416
54	<i>drd4</i>	Dopamine Receptor D4	P21917
55	<i>drd5</i>	Dopamine Receptor D5	P21918
56	<i>ednra</i>	Endothelin Receptor Type A	P25101
57	<i>etbr2</i>	Endothelin B receptor-like protein 2	U6DRJ2

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 6

#	Gen	Protein	Koda UniProt
58	<i>ffar2</i>	Free Fatty Acid Receptor 2	O15552
59	<i>ffar3</i>	Free Fatty Acid Receptor 3	O14843
60	<i>ffar4</i>	Free Fatty Acid Receptor 4	Q5NUL3
61	<i>fpr1</i>	Formyl Peptide Receptor 1	P21462
62	<i>fpr2</i>	Formyl Peptide Receptor 2	P25090
63	<i>fpr3</i>	Formyl Peptide Receptor 3	P25089
64	<i>fshr</i>	Follicle Stimulating Hormone Receptor	P23945
65	<i>galr1</i>	Galanin Receptor 1	P47211
66	<i>galr2</i>	Galanin Receptor 2	O43603
67	<i>galr3</i>	Galanin Receptor 3	O60755
68	<i>gasr</i>	Cholecystokinin B Receptor	P32239
69	<i>ghsr</i>	Growth Hormone Secretagogue Receptor	Q92847
70	<i>gnrhr</i>	Gonadotropin Releasing Hormone Receptor	P30968
71	<i>gpbar</i>	G Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1	Q8TDU6
72	<i>gper1</i>	G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1	Q99527
73	<i>gpr1</i>	G Protein-Coupled Receptor 1	P46091
74	<i>gpr101</i>	G Protein-Coupled Receptor 101	Q96P66
75	<i>gpr119</i>	G Protein-Coupled Receptor 119	Q8TDV5
76	<i>gpr12</i>	G Protein-Coupled Receptor 12	P47775
77	<i>gpr132</i>	G Protein-Coupled Receptor 132	Q9UNW8
78	<i>gpr135</i>	G Protein-Coupled Receptor 135	Q8IZ08
79	<i>gpr139</i>	G Protein-Coupled Receptor 139	Q6DWJ6
80	<i>gpr141</i>	G Protein-Coupled Receptor 141	Q7Z602
81	<i>gpr142</i>	G Protein-Coupled Receptor 142	Q7Z601
82	<i>gpr146</i>	G Protein-Coupled Receptor 146	Q96CH1
83	<i>gpr148</i>	G Protein-Coupled Receptor 148	Q8TDV2
84	<i>gpr149</i>	G Protein-Coupled Receptor 149	Q86SP6
85	<i>gpr15</i>	G Protein-Coupled Receptor 15	P49685
86	<i>gpr150</i>	G Protein-Coupled Receptor 150	Q8NGU9
87	<i>gpr151</i>	G Protein-Coupled Receptor 151	Q8TDV0
88	<i>gpr152</i>	G Protein-Coupled Receptor 152	Q8TDT2
89	<i>gpr153</i>	G Protein-Coupled Receptor 153	Q6NV75
90	<i>gpr160</i>	G Protein-Coupled Receptor 160	Q9UJ42
91	<i>gpr161</i>	G Protein-Coupled Receptor 161	Q8N6U8
92	<i>gpr162</i>	G Protein-Coupled Receptor 162	Q16538
93	<i>gpr17</i>	G Protein-Coupled Receptor 17	Q13304
94	<i>gpr171</i>	G Protein-Coupled Receptor 171	O14626

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 6

#	Gen	Protein	Koda UniProt
95	<i>gpr173</i>	G Protein-Coupled Receptor 173	Q9NS66
96	<i>gpr174</i>	G Protein-Coupled Receptor 174	Q9BXC1
97	<i>gpr176</i>	G Protein-Coupled Receptor 176	Q14439
98	<i>gpr18</i>	G Protein-Coupled Receptor 18	Q14330
99	<i>gpr182</i>	G Protein-Coupled Receptor 182	O15218
100	<i>gpr183</i>	G Protein-Coupled Receptor 183	P32249
101	<i>gpr19</i>	G Protein-Coupled Receptor 19	Q15760
102	<i>gpr20</i>	G Protein-Coupled Receptor 20	Q99678
103	<i>gpr22</i>	G Protein-Coupled Receptor 22	Q99680
104	<i>gpr25</i>	G Protein-Coupled Receptor 25	O00155
105	<i>gpr26</i>	G Protein-Coupled Receptor 26	Q8NDV2
106	<i>gpr27</i>	G Protein-Coupled Receptor 27	Q9NS67
107	<i>gpr3</i>	G Protein-Coupled Receptor 3	P46089
108	<i>gpr31</i>	G Protein-Coupled Receptor 31	O00270
109	<i>gpr32</i>	G Protein-Coupled Receptor 32	O75388
110	<i>gpr33</i>	G Protein-Coupled Receptor 33	Q49SQ1
111	<i>gpr34</i>	G Protein-Coupled Receptor 34	Q9UPC5
112	<i>gpr37</i>	G Protein-Coupled Receptor 37	O15354
113	<i>gpr39</i>	G Protein-Coupled Receptor 39	O43194
114	<i>gpr4</i>	G Protein-Coupled Receptor 4	P46093
115	<i>gpr42</i>	G Protein-Coupled Receptor 42	O15529
116	<i>gpr45</i>	G Protein-Coupled Receptor 45	Q9Y5Y3
117	<i>gpr52</i>	G Protein-Coupled Receptor 52	Q9Y2T5
118	<i>gpr55</i>	G Protein-Coupled Receptor 55	Q9Y2T6
119	<i>gpr6</i>	G Protein-Coupled Receptor 6	P46095
120	<i>gpr61</i>	G Protein-Coupled Receptor 61	Q9BZJ8
121	<i>gpr62</i>	G Protein-Coupled Receptor 62	Q9BZJ7
122	<i>gpr63</i>	G Protein-Coupled Receptor 63	Q9BZJ6
123	<i>gpr75</i>	G Protein-Coupled Receptor 75	O95800
124	<i>gpr78</i>	G Protein-Coupled Receptor 78	Q96P69
125	<i>gpr82</i>	G Protein-Coupled Receptor 82	Q96P67
126	<i>gpr83</i>	G Protein-Coupled Receptor 83	Q9NYM4
127	<i>gpr84</i>	G Protein-Coupled Receptor 84	Q9NQS5
128	<i>gpr85</i>	G Protein-Coupled Receptor 85	P60893
129	<i>gpr87</i>	G Protein-Coupled Receptor 87	Q9BY21
130	<i>gpr88</i>	G Protein-Coupled Receptor 88	Q9GZN0
131	<i>gpr</i>	Gastrin Releasing Peptide Receptor	P30550

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 6

#	Gen	Protein	Koda UniProt
132	<i>hcar1</i>	Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1	Q9BXC0
133	<i>hcar2</i>	Hydroxycarboxylic Acid Receptor 2	Q8TDS4
134	<i>hcar3</i>	Hydroxycarboxylic Acid Receptor 3	P49019
135	<i>hrh2</i>	Histamine Receptor H2	P25021
136	<i>hrh3</i>	Histamine Receptor H3	Q9Y5N1
137	<i>hrh4</i>	Histamine Receptor H4	Q9H3N8
138	<i>kissr</i>	KISS1 Receptor	Q969F8
139	<i>lgr4</i>	Leucine Rich Repeat Containing GPCR 4	Q9BXB1
140	<i>lgr5</i>	Leucine Rich Repeat Containing GPCR 5	Q75473
141	<i>lgr6</i>	Leucine Rich Repeat Containing GPCR 6	Q9HBX8
142	<i>lpar2</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 2	Q9HBW0
143	<i>lpar3</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 3	Q9UBY5
144	<i>lpar4</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 4	Q99677
145	<i>lpar5</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 5	Q9H1C0
146	<i>lpar6</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 6	P43657
147	<i>lshr</i>	Lutropin-Choriogonadotropic Hormone Receptor	P22888
148	<i>lt4r1</i>	Leukotriene B4 Receptor	Q15722
149	<i>lt4r2</i>	Leukotriene B4 Receptor 2	Q9NPC1
150	<i>mas</i>	MAS1 Proto-Oncogene	P04201
151	<i>mas1l</i>	MAS1 Proto-Oncogene Like	P35410
152	<i>mc3r</i>	Melanocortin 3 Receptor	P41968
153	<i>mc4r</i>	Melanocortin 4 Receptor	P32245
154	<i>mc5r</i>	Melanocortin 5 Receptor	P33032
155	<i>mchr1</i>	Melanin Concentrating Hormone Receptor 1	Q99705
156	<i>mchr2</i>	Melanin Concentrating Hormone Receptor 2	Q969V1
157	<i>mrgrd</i>	MAS Related GPR Family Member D	Q8TDS7
158	<i>mrgre</i>	MAS Related GPR Family Member E	Q86SM8
159	<i>mrgrf</i>	MAS Related GPR Family Member F	Q96AM1
160	<i>mrgrg</i>	MAS Related GPR Family Member G	Q86SM5
161	<i>mrqx1</i>	MAS Related GPR Family Member X1	Q96LB2
162	<i>mrqx2</i>	MAS Related GPR Family Member X2	Q96LB1
163	<i>mrqx3</i>	MAS Related GPR Family Member X3	Q96LB0
164	<i>mrqx4</i>	MAS Related GPR Family Member X4	Q96LA9
165	<i>mshr</i>	Melanocortin 1 Receptor	Q01726
166	<i>mtlr</i>	Motilin Receptor	Q43193
167	<i>mtr1a</i>	Melatonin Receptor 1A	P48039
168	<i>mtr1b</i>	Melatonin Receptor 1B	P49286

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 6

#	Gen	Protein	Koda UniProt
169	<i>mtr1l</i>	Melatonin-Related Receptor	Q13585
170	<i>nk1r</i>	Tachykinin Receptor 1	P25103
171	<i>nk2r</i>	Tachykinin Receptor 2	P21452
172	<i>nmbr</i>	Neuromedin B Receptor	P28336
173	<i>nmur1</i>	Neuromedin U Receptor 1	Q9HB89
174	<i>nmur2</i>	Neuromedin U Receptor 2	Q9GZQ4
175	<i>npbw1</i>	Neuropeptides B And W Receptor 1	P48145
176	<i>npbw2</i>	Neuropeptides B And W Receptor 2	P48146
177	<i>npff1</i>	Neuropeptide FF Receptor 1	Q9GZQ6
178	<i>npff2</i>	Neuropeptide FF Receptor 2	Q9Y5X5
179	<i>npsr1</i>	Neuropeptide S Receptor 1	Q6W5P4
180	<i>npylr</i>	Neuropeptide Y Receptor Y1	P25929
181	<i>npy2r</i>	Neuropeptide Y Receptor Y2	P49146
182	<i>npy4r</i>	Neuropeptide Y Receptor Y4	P50391
183	<i>npy5r</i>	Neuropeptide Y Receptor Y5	Q15761
184	<i>ntr1</i>	Neurotensin Receptor 1	P30989
185	<i>ntr2</i>	Neurotensin Receptor 2	O95665
186	<i>ogr1</i>	Ovarian Cancer GPCR 1	Q15743
187	<i>opn3</i>	Opsin 3	Q9H1Y3
188	<i>opn4</i>	Opsin 4	Q9UHM6
189	<i>opn5</i>	Opsin 5	Q6U736
190	<i>oprm</i>	Opioid Receptor Mu 1	P35372
191	<i>opsb</i>	Opsin 1 SWS	P03999
192	<i>opsg</i>	Opsin 1	P04001
193	<i>opsr</i>	Opsin 1 LWS	P04000
194	<i>oxer1</i>	Oxoecosanoid Receptor 1	Q8TDS5
195	<i>oxgr1</i>	Oxoglutarate Receptor 1	Q96P68
196	<i>oxyr</i>	Oxytocin Receptor	P30559
197	<i>p2ry2</i>	Purinergic Receptor P2Y2	P41231
198	<i>p2ry4</i>	Pyrimidinergic Receptor P2Y4	P51582
199	<i>p2ry6</i>	Pyrimidinergic Receptor P2Y6	Q15077
200	<i>p2ry8</i>	P2Y Receptor Family Member 8	Q86VZ1
201	<i>p2y10</i>	P2Y Receptor Family Member 10	O00398
202	<i>p2y11</i>	Purinergic Receptor P2Y11	Q96G91
203	<i>p2y12</i>	Purinergic Receptor P2Y12	Q9H244
204	<i>p2y13</i>	Purinergic Receptor P2Y13	Q9BPV8
205	<i>p2y14</i>	Purinergic Receptor P2Y14	Q15391

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 6

#	Gen	Protein	Koda UniProt
206	<i>par2</i>	F2R Like Trypsin Receptor 1	P55085
207	<i>par3</i>	Par-3 Family Cell Polarity Regulator	Q8TEW0
208	<i>par4</i>	F2R Like Thrombin Or Trypsin Receptor 3	Q96RI0
209	<i>pd2r</i>	Prostaglandin D2 Receptor	Q13258
210	<i>pd2r2</i>	Prostaglandin D2 Receptor 2	Q9Y5Y4
211	<i>pe2r1</i>	Prostaglandin E Receptor 1	P34995
212	<i>pe2r2</i>	Prostaglandin E Receptor 2	P43116
213	<i>pe2r3</i>	Prostaglandin E Receptor 3	P43115
214	<i>pe2r4</i>	Prostaglandin E Receptor 4	P35408
215	<i>pf2r</i>	Prostaglandin F Receptor	P43088
216	<i>pi2r</i>	Prostaglandin I2 Receptor	P43119
217	<i>pkrl</i>	Prokineticin Receptor 1	Q8TCW9
218	<i>pkrl2</i>	Prokineticin Receptor 2	Q8NEJ6
219	<i>prlhr</i>	Prolactin Releasing Hormone Receptor	P49683
220	<i>psyr</i>	Psychosine Receptor	Q8IYL9
221	<i>qrfr</i>	Pyroglutamylated RFamide Peptide Receptor	Q96P65
222	<i>rl3r1</i>	Relaxin Family Peptide Receptor 3	Q9NSD7
223	<i>rl3r2</i>	Relaxin Family Peptide Receptor 4	Q8TDU9
224	<i>rxfp1</i>	Relaxin Family Peptide Receptor 1	Q9HBX9
225	<i>rxfp2</i>	Relaxin Family Peptide Receptor 2	Q8WXD0
226	<i>s1pr2</i>	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2	Q95136
227	<i>s1pr3</i>	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3	Q99500
228	<i>s1pr4</i>	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 4	Q95977
229	<i>s1pr5</i>	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 5	Q9H228
230	<i>ssr2</i>	Signal Sequence Receptor Subunit 2	P43308
231	<i>ssr3</i>	Signal Sequence Receptor Subunit 3	Q9UNL2
232	<i>ssr4</i>	Somatostatin Receptor 4	P31391
233	<i>ssr5</i>	Somatostatin Receptor 5	P35346
234	<i>sucr1</i>	Succinate Receptor 1	Q9BXA5
235	<i>ta2r</i>	Thromboxane A2 Receptor	P21731
236	<i>taar1</i>	Trace Amine Associated Receptor 1	Q96RJ0
237	<i>taar2</i>	Trace Amine Associated Receptor 2	Q9P1P5
238	<i>taar3</i>	Trace Amine Associated Receptor 3	Q9P1P4
239	<i>taar5</i>	Trace Amine Associated Receptor 5	O14804
240	<i>taar6</i>	Trace Amine Associated Receptor 6	Q96RI8
241	<i>taar8</i>	Trace Amine Associated Receptor 8	Q969N4
242	<i>taar9</i>	Trace Amine Associated Receptor 9	Q96RI9

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 6

#	Gen	Protein	Koda UniProt
243	<i>trfr</i>	Transferrin Receptor	P02786
244	<i>tshr</i>	Thyroid Stimulating Hormone Receptor	P16473
245	<i>ur2r</i>	Urotensin 2 Receptor	Q9UKP6
246	<i>v1ar</i>	Arginine Vasopressin Receptor 1A	P37288
247	<i>v1br</i>	Arginine Vasopressin Receptor 1B	P47901
248	<i>v2r</i>	Arginine Vasopressin Receptor 2	P30518
249	<i>xcr1</i>	X-C Motif Chemokine Receptor 1	P46094

Preglednica 7: Podatki GPCR sirot pridobljenih iz transkriptoma glije, nevronov in žilnih celic možganske skorje (Zhang in sod., 2014)

#	Gen	Protein	Koda UniProt
1	<i>ackr2</i>	Atypical Chemokine Receptor 2	O00590
2	<i>acm3</i>	Cholinergic Receptor Muscarinic 3	P20309
3	<i>ada1d</i>	Adrenoceptor Alpha 1D	P25100
4	<i>adrb3</i>	Adrenoceptor Beta 3	P13945
5	<i>ccr4</i>	C-C Motif Chemokine Receptor 4	P51679
6	<i>ffar2</i>	Free Fatty Acid Receptor 2	O15552
7	<i>ffar3</i>	Free Fatty Acid Receptor 3	O14843
8	<i>galr2</i>	Galanin Receptor 2	O43603
9	<i>galr3</i>	Galanin Receptor 3	O60755
10	<i>gipr</i>	Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor	P48546
11	<i>gnrhr</i>	Gonadotropin Releasing Hormone Receptor	P30968
12	<i>gpr12</i>	G Protein-Coupled Receptor 12	P47775
13	<i>gpr135</i>	G Protein-Coupled Receptor 135	Q8IZ08
14	<i>gpr153</i>	G Protein-Coupled Receptor 153	Q6NV75
15	<i>gpr19</i>	G Protein-Coupled Receptor 19	Q15760
16	<i>gpr27</i>	G Protein-Coupled Receptor 27	Q9NS67
17	<i>gpr45</i>	G Protein-Coupled Receptor 45	Q9Y5Y3
18	<i>gpr84</i>	G Protein-Coupled Receptor 84	Q9NQS5
19	<i>lgr4</i>	Leucine Rich Repeat Containing GPCR 4	Q9BXB1
20	<i>lpar4</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 4	Q99677
21	<i>mtr11</i>	Melatonin-Related Receptor	Q13585
22	<i>npylr</i>	Neuropeptide Y Receptor Y1	P25929
23	<i>opn5</i>	Opsin 5	Q6U736
24	<i>opsb</i>	Opsin 1, Short Wave Sensitive	P03999
25	<i>p2ry2</i>	Purinergic Receptor P2Y2	P41231
26	<i>par2</i>	F2R Like Trypsin Receptor 1	P55085

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 7

#	Gen	Protein	Koda UniProt
27	par3	Par-3 Family Cell Polarity Regulator	Q8TEW0
28	par4	F2R Like Thrombin Or Trypsin Receptor 3	Q96RI0
29	pd2r2	Prostaglandin D2 Receptor 2	Q9Y5Y4
30	pe2r1	Prostaglandin E Receptor 1	P34995
31	pe2r3	Prostaglandin E Receptor 3	P43115
32	pe2r4	Prostaglandin E Receptor 4	P35408
33	pf2r	Prostaglandin F Receptor	P43088
34	rxfp2	Relaxin Family Peptide Receptor 2	Q8WXD0
35	ssr2	Signal Sequence Receptor Subunit 2	P43308
36	ssstr4	Somatostatin Receptor 4	P31391

Preglednica 8: Diferencialno izraženi geni GPCR sirot v astrocitih, ki niso izražali GPR81. Podatki so bili pridobljeni s sekveniranjem RNA (Vardjan in sod., 2018).

#	Gen	Protein	Koda UniProt
1	<i>gprc5c</i>	G protein-coupled receptor, family C	I7HPW4
2	<i>gprc5a</i>	Retinoic acid-induced protein 3	G5E8C3
3	<i>gpr89</i>	Golgi pH regulator (Protein GPR89)	Q8BS95
4	<i>gpr88</i>	G-protein coupled receptor 88	B2RXU4
5	<i>gpr85</i>	Probable G-protein coupled receptor 85	P60894
6	<i>gpr84</i>	G-protein coupled receptor 84	Q8CIM5
7	<i>gpr65</i>	Psychosine receptor	A0A0R4J0Y2
8	<i>gpr63</i>	Probable G-protein coupled receptor 63	Q9EQQ3
9	<i>gpr55</i>	G protein-coupled receptor 55	Q14BV9
10	<i>gpr45</i>	G protein-coupled receptor 45	Q148B5
11	<i>gpr4</i>	G-protein coupled receptor 4	Q8BUD0
12	<i>gpr39</i>	G-protein-coupled receptor 39	A0A0B4J1E4
13	<i>gpr37l1</i>	G protein-coupled receptor 37-like 1	A1L151
14	<i>gpr37</i>	Prosaposin receptor GPR37	Q9QY42
15	<i>gpr35</i>	G-protein coupled receptor 35	Q9ES90
16	<i>gpr31b</i>	G-protein coupled receptor 31	F8VQN3
17	<i>gpr3</i>	G-protein coupled receptor 3	P35413
18	<i>gpr27</i>	Probable G-protein coupled receptor 27	Q54897
19	<i>gpr19</i>	Probable G-protein coupled receptor 19	Q61121
20	<i>gpr180</i>	Integral membrane protein GPR180	Q8BPS4
21	<i>gpr179</i>	G protein-coupled receptor 179	E9PY61
22	<i>gpr162</i>	Probable G-protein coupled receptor 162	Q3UN16
23	<i>gpr161</i>	G-protein coupled receptor 161	B2RPY5

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 8

#	Gen	Protein	Koda UniProt
24	<i>gpr160</i>	Probable G-protein coupled receptor 160	Q3U3F9
25	<i>gpr158</i>	Probable G-protein coupled receptor 158	Q8C419
26	<i>gpr156</i>	Probable G-protein coupled receptor 156	Q6PCP7
27	<i>gpr155</i>	G protein-coupled receptor 155	D7RXL9
28	<i>gpr153</i>	Probable G-protein coupled receptor 153	Q8K0Z9
29	<i>gpr150</i>	Probable G-protein coupled receptor 150	Q8BL07
30	<i>gpr146</i>	Probable G-protein coupled receptor 146	Q99LE2
31	<i>gpr137c</i>	G protein-coupled receptor 137C	E9Q343
32	<i>gpr137b</i>	Integral membrane protein GPR137B	A0A0R4J022
33	<i>gpr137</i>	Integral membrane protein GPR137	Q3UPL3
34	<i>gpr135</i>	G-protein coupled receptor 135	Q7TQP2
35	<i>gpr12</i>	G-protein coupled receptor 12	P35412
36	<i>gpr108</i>	G-protein coupled receptor 108	Q91WD0
37	<i>gpr107</i>	G protein-coupled receptor 107	Q148Z6

Preglednica 9: GPCR proteini, katerih Evklidska razdalja je bila manjša ali enaka Evklidski razdalji GPR81.

#	Gen	Protein	Koda UniProt
1	<i>ackr2</i>	Atypical Chemokine Receptor 2	Q00590
2	<i>acm3</i>	Muscarinic Acetylcholine Receptor M3	A0A0X3PH97
3	<i>ada1d</i>	Adrenoceptor Alpha 1D	P25100
4	<i>adrb3</i>	Adrenoceptor Beta 3	P13945
5	<i>ccr4</i>	C-C Motif Chemokine Receptor 4	P51679
6	<i>ccr8</i>	C-C Motif Chemokine Receptor 8	P51685
7	<i>drd4</i>	Dopamine Receptor D4	P21917
8	<i>ffar2</i>	Free Fatty Acid Receptor 2	Q15552
9	<i>ffar3</i>	Free Fatty Acid Receptor 3	Q14843
10	<i>fpr3</i>	Formyl Peptide Receptor 3	P25089
11	<i>galr1</i>	Galanin Receptor 1	P47211
12	<i>galr2</i>	Galanin Receptor 2	Q43603
13	<i>galr3</i>	Galanin Receptor 3	Q60755
14	<i>ghsr</i>	Growth Hormone Secretagogue Receptor	Q92847
15	<i>gnrhr</i>	Gonadotropin Releasing Hormone Receptor	P30968
16	<i>gpr101</i>	G Protein-Coupled Receptor 101	Q96P66
17	<i>gpr132</i>	G Protein-Coupled Receptor 132	Q9UNW8
18	<i>gpr135</i>	G Protein-Coupled Receptor 135	Q8IZ08
19	<i>gpr141</i>	G Protein-Coupled Receptor 141	Q7Z602
20	<i>gpr149</i>	G Protein-Coupled Receptor 149	Q86SP6

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 9

#	Gen	Protein	Koda UniProt
21	<i>gpr152</i>	G Protein-Coupled Receptor 152	Q8TDT2
22	<i>gpr153</i>	G Protein-Coupled Receptor 153	Q6NV75
23	<i>gpbar</i>	G Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1	Q8TDU6
24	<i>gpr12</i>	G Protein-Coupled Receptor 12	P47775
25	<i>gpr19</i>	G Protein-Coupled Receptor 19	Q15760
26	<i>gpr25</i>	G Protein-Coupled Receptor 25	Q00155
27	<i>gpr27</i>	G Protein-Coupled Receptor 27	Q9NS67
28	<i>gpr33</i>	G Protein-Coupled Receptor 33	Q49SQ1
29	<i>gpr42</i>	G Protein-Coupled Receptor 42	Q15529
30	<i>gpr45</i>	G Protein-Coupled Receptor 45	Q9Y5Y3
31	<i>gpr52</i>	G Protein-Coupled Receptor 52	Q9Y2T5
32	<i>gpr61</i>	G Protein-Coupled Receptor 61	Q9BZJ8
33	<i>gpr84</i>	G Protein-Coupled Receptor 84	Q9NQS5
34	<i>lgr4</i>	Leucine Rich Repeat Containing GPCR 4	Q9BXB1
35	<i>lpar4</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 4	Q99677
36	<i>mtlr</i>	Motilin Receptor	Q43193
37	<i>mtr1b</i>	Melatonin Receptor 1B	P49286
38	<i>mtr1l</i>	Melatonin-Related Receptor (GPR50)	Q13585
39	<i>opn4</i>	Opsin 4	Q9UHM6
40	<i>opn5</i>	Opsin 5	Q6U736
41	<i>oprm</i>	Opioid Receptor Mu 1	P35372
42	<i>opsb</i>	Opsin 1, Short Wave Sensitive	P03999
43	<i>opsr</i>	Opsin 1, Long Wave Sensitive	P04000
44	<i>p2ry2</i>	Purinergic Receptor P2Y2	P41231
45	<i>par2</i>	F2R Like Trypsin Receptor 1	P55085
46	<i>par3</i>	Par-3 Family Cell Polarity Regulator	Q8TEW0
47	<i>pd2r2</i>	Prostaglandin D2 Receptor 2	Q9Y5Y4
48	<i>pe2r3</i>	Prostaglandin E Receptor 3	P43115
49	<i>pf2r</i>	Prostaglandin F Receptor	P43088
50	<i>rxfp2</i>	Relaxin Family Peptide Receptor 2	Q8WXD0
51	<i>ssr2</i>	Signal Sequence Receptor Subunit 2	P43308
52	<i>ssr5</i>	Somatostatin Receptor 5	P35346
53	<i>taar1</i>	Trace Amine Associated Receptor 1	Q96RJ0
54	<i>taar2</i>	Trace Amine Associated Receptor 2	Q9P1P5
55	<i>taar5</i>	Trace Amine Associated Receptor 5	Q14804

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju akad. prof. dr. Robertu Zorcu, ki mi je omogočil opravljanje raziskovalnega dela in izdelavo doktorske disertacije na Inštitutu za patološko fiziologijo v Laboratoriju za nevroendokrinologijo in molekularno celično fiziologijo ter za številne uporabne nasvete in usmeritve med samim izvajanjem dela. Zahvaljujem se somentorici izr. prof. dr. Heleni Haque Chowdhury za obilo podpore in konstruktivnih kritik pri nastajanju disertacije.

Hvala članom komisije; prof. dr. Marku Kreftu, prof. dr. Petru Veraniču in prof. dr. Toniju Petanu, za pregled doktorskega dela in komentarje, s katerimi so prispevali k izboljšavi doktorske disertacije.

Zahvaljujem se sodelavkam in sodelavcem iz Inštituta za pomoč pri praktičnem delu in konstruktivnih diskusijah.

Na koncu gre velika zahvala tudi mojim staršem in prijateljem, ki so me vsa ta leta podpirali in mi z vso ljubeznijo ter potrpljenjem vedno stali ob strani.