

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ  
„NEURONALNE CZYNNIKI REGULUJĄCE GLIKOLIZĘ W ASTROCYTACH”

Badania behawioralne w ostatnich latach wykazały, że metabolizm energetyczny tkanki nerwowej pełni fundamentalną rolę w rozwoju i regulacji funkcji poznawczych. Z jednej strony, trening pamięciowy stymuluje ekspresję białek zaangażowanych w astrocytarno-neuronalne czółenko mleczanowe, z drugiej zaś w schorzeniach związanych z deficytami poznawczymi, np. w chorobie Alzheimera, dochodzi do zaburzenia metabolizmu energetycznego mózgu. Wykazano też, że neurony i astrocyty funkcjonują jako swego rodzaju syncytium poprzez regulację krzyżową (ang. cross-talk) ekspresji białek zaangażowanych w metabolizm energetyczny (glukozy i glutaminy) i syntezę neurotransmiterów, jednak molekularne podstawy tego zjawiska nie są do końca poznane.

W niniejszej pracy skupiono się na identyfikacji czynników wydzielanych przez neurony i stymulujących ekspresję enzymów glikolitycznych w astrocytach, a także określeniu, które szlaki sygnalizacji komórkowej są w tę modulację zaangażowane. W wyniku podjętych badań wykazano, że neurony stymulują nie tylko ekspresję enzymów glikolitycznych, ale również aktywność katalityczną jednego z nich – kinazy pirogronianowej, a także syntezę ATP w astrocytach. Dodatkowo wykazano, że neurony wydzielają do medium przynajmniej dwa modulatory metaboliczne wrażliwe na działanie wysokiej temperatury i różniące się masą molową.

Dzięki wykorzystaniu spektrometrii mas udało się zidentyfikować jeden z neuronalnych regulatorów metabolicznych, transtyretynę (TTR), białko o masie 55 kDa znane dotychczas głównie jako białkowy nośnik tyroksyny i retinolu. W badaniach z zastosowaniem detekcji immunofluorescencyjnej, fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* i metody Western Blot pokazano, że TTR stymuluje w astrocytach ekspresję dwóch głównych enzymów regulujących tempo glikolizy, tj. fosfofruktokinazy (izoformy P) i kinazy pirogronianowej (izoformy M1/2). Wykazano także, że wywołane TTR zmiany poziomu enzymów glikolitycznych odzwierciedlone są przez wzrost syntezy ATP. Dowiedziono również, że regulacja przez TTR ekspresji fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej jest specyficzna dla tkanki nerwowej i nie jest związana z rolą TTR w transporcie retinolu i tyroksyny. W indukowanej przez TTR stymulacji glikolizy w astrocytach pośredniczy ścieżka sygnałowa cAMP/PKA, a transdukcja tego sygnału antagonizowana jest przez ścieżkę PI3K/AKT. Wyniki badań sugerują dodatkowo, że TTR jest elementem mechanizmu, za pomocą którego neurony stymulują wykorzystanie pochodzących z glikogenolizy reszt glikozyłowych bez modulacji glejowego wychwytu glukozy z krwioobiegu.

Drugi spośród wydzielanych przez neurony do medium regulatorów pozostaje niezidentyfikowany. Ustalono jednak, że obecny jest również w czystym medium hodowlanym, choć w mniejszym stężeniu, a jego masa molowa jest mniejsza niż 10 kDa. Regulator ten stymuluje ekspresję aldolazy (izoformy A) i działa za pośrednictwem ścieżki sygnałowej indukowanej przez IGF-1. Regulacja ta angażuje kinazy PI3K i FAK, ale jest antagonizowana przez kinazę AKT.

Uzyskane wyniki przyczyniają się do pełniejszego zrozumienia metabolizmu energetycznego tkanki nerwowej i złożonych zależności między poszczególnymi typami komórek budujących mózg. Wiedza ta może stanowić podstawę do rozwoju terapii poprawiających zdolności poznawcze, np. u osób starszych, czy cierpiących na choroby neurodegeneracyjne.

17.05.2018

Zawiślak

---

ABSTRACT OF DOCTORAL THESIS  
„NEURONAL FACTORS REGULATE ASTROGLIAL GLYCOLYSIS”

---

Behavioural studies of the last few years provide a growing body of evidence that brain energy metabolism is crucial for development and regulation of cognitive functions. On the one hand, memory training increases expression of proteins involved in the astrocyte-neuron lactate shuttle and on the other hand, in diseases which are associated with cognitive impairment (e.g. Alzheimer disease), metabolic disorders are observed in brain tissue. It has been also shown that neurons and astrocytes may operate as a kind of syncytium via cross-regulation of the expression of proteins involved in metabolism of energy substrates (glucose and glutamine) and neurotransmitters synthesis. However, molecular basis of this phenomenon are not well understood.

This thesis focuses on the identification of the regulatory factor(s) released from neurons into extracellular fluid which stimulate expression of glycolytic enzymes in astrocytes and on the description of signalling pathways involved in this modulation. It demonstrates that neurons stimulate not only expression of glycolytic enzymes in astrocytes, but also the activity of pyruvate kinase and ATP synthesis. What is more, neurons release at least two (if not more) types of metabolic modulators, which are heat-unstable and differ in molecular mass.

Mass spectrometry analysis made it possible to identify one of these regulators as transthyretin (TTR), a 55 kDa protein known as a carrier for thyroxine and retinol. The results of immunofluorescent study, FISH experiments and WB analysis revealed that TTR stimulates astrocytic expression of two main regulatory enzymes of glycolysis (phosphofructokinase P, pyruvate kinase M1/2). The regulation of glycolytic enzymes expression by TTR was also reflected by increased ATP synthesis. This modulation is presumably specific for brain tissue and was independent of the role of TTR as a carrier protein for retinol and thyroxine. The cAMP/PKA-dependent pathway mediated TTR-induced metabolic stimulation and this regulation was antagonized by the PI3K/Akt pathway. The data suggests that TTR is involved in a mechanism in which neurons stimulate utilisation of glycogen-derived glucosyl units without significant modulation of glucose uptake from blood stream.

The second neuron-derived metabolic modulator remains unidentified, however, it was revealed that its molecular mass is below 10 kDa and that this molecule is also present in fresh culture medium, albeit at a lower concentration. This regulator stimulates expression of aldolase A and acts via IGF-1-induced signalling pathway. The regulation engages PI3K and FAK, but is antagonised by AKT.

The results presented here are a significant step towards a better understanding of the energy metabolism of nerve tissue and complex relationships between brain cell types. This knowledge may be the basis of development of therapies focused on improvement of cognitive functions in the elderly or neurodegenerative patients.

17.05.2018

Zawisłak