

**Az agytörzsi dorzális vagus komplex glukokináz expressziójának molekuláris
és funkcionális változásai I-es típusú diabetes egérmodelljében**

PhD tézis

Halmos Csányi Katalin MSc

Témavezetők: Prof. Dr. Benedek György, SZTE ÁOK Élettani Intézet
Prof. Dr. Jancsó Gábor SZTE ÁOK Élettani Intézet
Dr. Bret N. Smith, Kentucky Egyetem, Élettani Intézet

Szeged

2015

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK:

1. K.C. **Halmos**, P. Gyarmati, H. Xu, S. Maimaiti, G. Jancsó, G. Benedek, B.N. Smith, Molecular and functional changes in glucokinase expression in the brainstem dorsal vagal complex in a murine model of type 1 diabetes. *Neuroscience* 2015 In Press.

doi:10.1016/j.neuroscience.2015.08.023

IF: 3,357

2. Bach EC, **Halmos KC**, Smith BN Enhanced NMDA receptor-mediated modulation of excitatory neurotransmission in the dorsal vagal complex of streptozotocin-treated, chronically hyperglycemic mice. *PLOS ONE* 2015 Mar 23;10(3):e0121022.

IF: 3.534

3. Boychuk CR, **Halmos, K**, Smith BN. Diabetes induces GABA receptor plasticity in murine vagal motor neurons. *J Neurophysiol.* 2015 May 20;jn.00209.2015. doi: 10.1152/jn.00209.2015 In Press.

IF: 2.887

Az agytörzsi dorzális vagus komplex glukokináz expressziójának molekuláris és funkcionális változásai I-es típusú diabetes egérmodelljében

Az egyértelműen megemelkedett vér-glukózkoncentrációval jellemzett diabetes mellitus több mint 29 millió embert érint az Egyesült Államokban. Súlyos szövődményei közé tartozik a szívbetegség, a stroke, a magas vérnyomás, a vakság, az idegrendszeri károsodás és a gyomor-bélrendszer működési zavara. A tünetek enyhítésére és a szövődmények csökkentésére irányuló erőfeszítések ellenére az állapot kezelése a mai napig nem megoldott. A glukóz homeostasisban szerepe van az agy különböző ún. preautonóm területeinek, működésüket a megemelkedett vérglukózsztint szintén befolyásolja. A plazmaglukóz- és inzulinsztint szabályozásában különösen fontos szerepet játszanak a hátsóagyban lévő idegi áramkörök. Ezek egyike, a vagus által közvetített paraszimpatikus output, meghatározó szerepet játszik a metabolikus homeostasisal összefüggő zsigeri működés szabályozásában, és számos adat bizonyítja az agytörzsi dorzális vagus komplex elsődleges és döntő jelentőségét a plazmaglukóz- és inzulinsztint, a táplálkozás és az energia-egyensúly glukózérzékeny modulálásában.

Az agytörzsi nucleus tractus solitarius (NTS) neuronjai a bélből, valamint egyéb mellkasi és hasi zsigerekből glutamaterg, primer vagus afferens szinaptikus inputot kapnak. A vagus afferensek az NTS felé közvetítik az információt a gyomor-bélrendszer disztenziójáról és tápanyagtartalmáról; az NTS ezeket az információkat feldolgozza, integrálja a neuronális és humorális jelekkel, majd továbbítja egyéb agyi területek, köztük a dorzális motoros vagusmag (DMV) motoros neuronjai felé. A glukózkoncentráció akut változására az NTS neuronjai az

idegi ingerelhetőség fokozódásával avagy csökkenésével és a szinaptikus input módosulásával reagálnak, ezek a folyamatok pedig glukokinázfüggők. A depolarizáló választ a káliumérzékeny adenzin-trifoszfát (K_{ATP}) csatornák inaktiválódása közvetíti, a K_{ATP} csatornák modulálása pedig megakadályozza a vagus motoros neuronjainak glukóz által indukált és gamma-aminovajsav (GABA) által közvetített gátlását. Az I-es típusú diabetest a hasnyámirigy béta-sejtjei által termelt inzulin mennyiségének csökkenése és az így kialakuló szabályozatlan hyperglycaemia jellemzi. Az I-es típusú diabetes modelljeiben a dorzális vagus komplex szinaptikus és egyéb celluláris válaszainak módosulását tapasztalták a glukózkoncentráció helyreállítását követően is. Krónikus hyperglycaemia során a vagus reflexek gyakran eltompulnak, a megváltozott vagusműködés pedig a zsigeri funkciók diabetesszel összefüggő zavarát okozhatja, ami arra utal, hogy a krónikusan magas glukózsint megváltoztatja a dorzális vagus komplex neuronjainak reakciókészségét.

Mivel a glukokináz (GCK) és a K_{ATP} csatorna modulációja szerepet játszik a glukóz kiváltotta neuronválaszban és az NTS neuronok megváltozott reakciókészségében I-es típusú diabetes modelljeiben, megvizsgáltuk azt a hipotézist, mely szerint a GCK vagy K_{ATP} csatorna expressziója megváltozik több napig tartó krónikus hyperglycaemiát/ hypoinsulaemiát követően streptozotocinnal (STZ) kezelt egerekben. Ha választ kapunk arra, hogyan változik a dorzális agytörzs glukózérzékenysége diabetes során, olyan hipotéziseket alkothatunk, amelyek azután iránymutatásul szolgálhatnak alternatív terápiák kifejlesztéséhez .

Valamennyi kísérlethez juvenilis és fiatal felnőtt (28–42 napos) hím CD-1 vagy transzgénikus GIN egereket (FVB-Tg (GadGFP) használtunk; az állatokat egyöntetűen 14 órás világosság -10 órás sötétség ciklusok mellett tartottuk, ételt és vizet korlátozás nélkül kaptak. A GIN egerek az NTS neuronok egy jelentős hányadát kitevő GABA neuronok szomatostatinerger al csoportjában

EGFP-t expresszálnak. Az I-es típusú diabetest streptozotocin (STZ; 200 mg/kg) injekció adásával idéztük elő. Feszültségzár („voltage clamp”) módszerrel „on-cell” és „whole-cell” felvételeket készítettünk azonosított GABA neuronokban 4-5 hetes hím GIN egerekből preparált agytörzsszeletek felhasználásával. A „whole-cell” felvételek segítségével a szinaptikus áramnak a GCK aktivitás glukózaminnal (GA) történő gátlása következtében bekövetkező változásait vizsgáltuk. Az akciós potenciál aktivitás „on-cell” regisztrálásával a növekvő glukózkoncentráció (2,5 mM-ről 15 mM-re) hatását mértük. A GCK, a Kir 6.2 és a SUR1 RNS molekuláris expressziójának vizsgálatára az NTS-t és a DMV-t magukban foglaló agytörzsi punch biopsziákat használtunk, kvantitatív polimeráz láncreakciót (QPCR) és a GCK fehérje expresszióját alkalmazva Western blot analízis segítségével. Valamennyi kísérletben összehasonlítást végeztünk a kontroll és az STZ-vel kezelt, I-es típusú diabetes egerek között.

A GCK és a KATP csatornák molekuláris expressziója. Punch technikával dorzális agytörzset tartalmazó szövetmintákat vettünk normoglycaemiás (n=8; glukóz index 180 ± 4 mg/dl) és STZ-vel kezelt egerekből, amelyek 3-4 napon át hyperglycaemiás állapotban voltak (n=8; 469 ± 5 mg/dl). A target transzkript mérési eredményeket β -aktin expresszióra normalizáltuk. Kvantitatív „real-time” polimeráz láncreakció (RT-PCR) módszerrel a GCK expresszió szignifikáns csökkenését tapasztaltuk STZ-vel kezelt hyperglycaemiás egerek dorzális vagus komplexében a kontrollokkal összehasonlítva. A Kir6.2 és az SUR1 transzkriptek esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a normoglycaemiás és a hyperglycaemiás egerek között az expresszió tekintetében ($p > 0,05$). Ellentétben a K_{ATP} csatorna komponenseivel, a GCK molekuláris expressziója a kontrollokhöz képest csökkent STZ-vel kezelt hyperglycaemiás egerekben.

Western blot tesztet végeztünk további 8 kontroll és 8 STZ-vel kezelt egér punch biopsziáján, hogy megállapítsuk, az mRNS transzkripció csökkenése előidézett-e fehérjeexpresszió-csökkenést. A Western blot analízis a GCK fehérjeexpressziójának szignifikáns csökkenését mutatta ki STZ-vel kezelt hyperglycaemiás egerek dorzális vagus komplexében.

A GCK gátlás hatása az NTS neuronokba érkező szinaptikus inputra. A glukokináz gátlás megakadályozza az akut hypoglycaemiára adott választ GABAerg NTS neuronok egy alcsoportjában. Mivel a több napig tartó hyperglycaemia csökkentette a GCK expressziót STZ-vel kezelt egerek NTS-ében, normoglycaemiás kontroll és STZ-vel kezelt GIN egerekből származó akut szeletekben EGFP expresszió által azonosított GABAerg mediális NTS (mNTS) neuronokban meghatároztuk a GCK gátló glukózaminra (GA) (5 μ M) adott választ. Az egészséges állatokból származó GABAerg mNTS neuronokban GA alkalmazása $\geq 20\%$ -kal csökkentette a spontaneous excitátoros posztzinaptikus current (sEPSC) frekvenciáját a neuronok 80%-ában (15-ből 12 neuron; $2,83 \pm 0,34$ Hz kontroll ACSF; $1,72 \pm 0,22$ Hz GA-ban; $n=15$; $p < 0,05$;). GA adása csökkentette ($n=12$) vagy nem változtatta ($n=3$) az sEPSC frekvenciáját. A szinaptikus current amplitúdója nem változott ($p > 0,05$). Eredményeink alátámasztják, hogy a GCK közvetítő szerepet játszik a GABAerg NTS neuronoknak az ambiens glukózkoncentrációra adott excitátoros szinaptikus válaszában, és arra utalnak, hogy a GCK blokádnak gátolja a legtöbb GABA neuron felé irányuló excitátoros, glutamaterg szinaptikus inputot.

STZ-vel kezelt, 3-5 napja hyperglycaemiás egerekből származó GABAerg mNTS neuronokban a GA hatása az sEPSC frekvenciára sokkal kevésbé volt erőteljes, mint a kontrollokban: csökkenés (-22%) a hat neuronból csak egyben következett be, a többi ötben változatlan maradt. Összességében az sEPSC középértéke GA jelenlétében nem változott ($7,63 \pm 1,04$ Hz a kontroll

ACSF-ben; $7,04 \pm 0,83$ Hz GA-ban; $n=6$; $p>0,05$). Összhangban a vagus komplex GCK expressziójának csökkenésével, az excitátoros szinaptikus aktivitás GA általi modulációja ugyancsak csökkent STZ-vel kezelt, hyperglycaemiás egerek GABAerg mNTS neuronjaiban.

Vizsgáltuk a GA hatását a spontaneous inhibitoros posztszinaptikus current (sIPSC) frekvenciájára és amplitúdójára is. Kontroll egerekből származó GABAerg mNTS neuronokban a GA alkalmazása a populáció egészét tekintve nem befolyásolta a frekvenciát ($1,22 \pm 0,2$ Hz kontroll, ACSF; $1,25 \pm 0,30$ Hz, GA; $n=9$; $p>0,05$), ám az egyes neuronokban a frekvencia növekedett ($n=3$) vagy csökkent ($n=6$). Az sIPSCs amplitúdója szintén nem változott GA hatására ($p>0,05$). A kontroll állatokban kapott eredményhez hasonlóan, az sIPSC frekvencia összességében nem változott STZ-vel kezelt egerek neuronjaiban ($1,04 \pm 0,30$ Hz kontroll ACSF; $1,01 \pm 0,31$ Hz GA; $n=7$; $p>0,05$), és nem következett be változás az sIPSC amplitúdójában sem ($p>0,05$). STZ-vel kezelt egerek neuronjaiban a GA alkalmazása növelte ($n=3$), csökkentette ($n=2$) vagy változatlanul hagyta ($n=2$) az sIPSC frekvenciát. Bár GA hatására általában változott az sIPSC frekvencia a GABAerg mNTS neuronokban, a kontroll és az STZ-vel kezelt állatokból származó neuronok válaszaiban nem volt lényeges különbség.

A glukóz hatása az akciós potenciálokra. Az NTS-ben lévő neuronok glukózszenzorként működnek, és a GABAerg NTS neuronok érzékenysége különösen kiemelkedő lehet. Mivel STZ-vel kezelt egerek NTS-ében több napos hyperglycaemiát követően lecsökkent a GCK expresszió, „on cell” felvételek segítségével megvizsgáltuk, hogyan változik a GABAerg NTS neuronok akciós potenciáljainak frekvenciája 2,5 mM-ről 15 mM-re emelkedő glukózkoncentráció hatására. A normoglycaemiás kontroll egerekből származó neuronokban a glukózkoncentráció növekedése $>20\%$ -os változást idézett elő az akciós potenciálok frekvenciájában a neuronok 78%-ában (9-ből 7 sejt). A glukózkoncentráció növelése az akciós

potenciálok frekvenciájának növekedésével járt a kilenc neuronból ötben ($87 \pm 30\%$ növekedés; $p < 0,05$); csökkenésével két neuron esetében ($-26,5 \pm 2\%$ csökkenés), és változatlan maradt két neuronban. STZ-vel kezelt, hyperglycaemiás egerek neuronjaiban a glukózkoncentráció növelése a hét neuronból csupán háromban változtatta meg az akciós potenciálok frekvenciáját (43%). Két neuronban növekedett az akciós potenciálok frekvenciája ($115 \pm 31\%$), egy neuronban csökkent (-45%), a többi négyben változatlan maradt. Míg a normoglycaemiás egerek neuronjainak többségében a glukózkoncentráció növelése szignifikánsan és nagy mértékben változtatta meg az akciós potenciálok frekvenciáját, a hyperglycaemiás egerek neuronjainak túlnyomó részében a glukózkoncentráció növelése nem befolyásolta az akciós potenciálok frekvenciáját.

Az NTS neuronjai közvetlen inputot kapnak a primer visceroszenzoros vagus afferenseken keresztül, és a központi paraszimpatikus szabályozó kör első válaszkomponensét alkotják. Ismeretes, hogy ezeknek a neuronoknak bizonyos alcsoportjai, különösen a GABA neuronok, glukózérzékenyek. Diabetesben a központi vagus hálózat számos fiziológias aspektusa működésbeli változáson megy keresztül, összhangban a zsigerek a betegségre jellemző paraszimpatikus szabályozásának megváltozásával. Az NTS neuronok glukózérzékelésében szerepet játszik a GCK, amely a neuronokban és más sejtekben katalizálja a glukóz glukóz-6-foszfáttá alakulását, ami az ATP/ADP arány növekedéséhez vezet. Számos neurális rendszerben a megnövekedett glukózkoncentrációt követő membránválaszt az ATP-nek a K_{ATP} csatornához való kötődése váltja ki, ami változást idéz elő a membrán potenciáljában. A diabetes megváltoztatja a GCK vagy a K_{ATP} csatornák expresszióját a hipotalamuszban, ami összhangban van a glukózra adott neuronválasz megváltozásával. Az NTS neuronoknak I-es típusú diabetesben kimutatott megváltozott elektrofiziológias reakciókészsége szerepet játszhat

a zsigeri szabályozás diabetesre jellemző zavarában, ám az észlelt plaszticitás mechanizmusa ismeretlen. Jelen vizsgálatunkban a GCK molekuláris és funkcionális expressziójának csökkenését tapasztaltuk I-es típusú diabeteses egerek vagus komplexében, a K_{ATP} csatorna komponenseinek esetében ugyanakkor nem következett be változás. A csökkent mRNS transzkripcióval összhangban csökkent a GCK fehérjeszint, gyengült a GCK gátlás által kiváltott neuronális és szinaptikus válasz, és csökkent a megnövekedett glukózkoncentráció által kiváltott neuronaktivitás. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az NTS neuronoknak a megnövekedett glukózkoncentrációra adott válasza a krónikus hyperglycaemia következtében GCK-függő módon megváltozik.

Normális körülmények között az NTS neuronjai az ingerelhetőség növekedésével vagy csökkenésével válaszolnak a megemelkedett vagy csökkent glukózkoncentrációra, és ez a válasz sok esetben GCK-függő. Az excitáció glukóz által kiváltott növekedését a K_{ATP} csatornák inaktiválódása közvetíti az NTS neuronokban, a K_{ATP} csatorna modulációja pedig megakadályozza a vagus motoros neuronjainak glukóz által indukált és GABA által közvetített gátlását. Megvizsgáltuk azt a hipotézist, hogy a K_{ATP} csatorna molekuláris komponenseinek expressziója több napos hyperglycaemia hatására megváltozik, amint az előfordulhat a hipotalamusz neuronjaiban. A centrális neuronokban lévő K_{ATP} csatornák főleg SUR1 és Kir6.2 alcsoportokból épülnek fel, és a SUR1-et glukózérzékelő NTS sejtek expresszálják. Azt találtuk, hogy a SUR1 és a Kir6.2 molekuláris expressziója I-es típusú diabeteses egerek vagus komplexében változatlan maradt.

Mivel az NTS-ben a glukóz által kiváltott, a K_{ATP} csatornák által közvetített válaszhoz GCK-ra van szükség, a GCK expresszió csökkenése a reakciókészség csökkenését előidéző mechanizmusra utal, amely a krónikusan hyperglycaemiás egerek kapcsán merült fel. A GCK

általunk észlelt csökkent molekuláris és fehérje expressziója összhangban volt a GCK gátlásra adott elektrofiziológiás válasz gyengülésével. A GCK aktivitás gátlása a normoglycaemiás egerekből származó legtöbb GABAerg NTS neuron szinaptikus ingerelhetőségének változását eredményezte, ami összhangban volt a szeletben mért tonikus GCK közvetítette aktivitással. A diabeteses egerek neuronjaiban a GCK gátlás hatása csökkent, különösen a glutamátfelszabadulást követően, ami arra utal, hogy a GABAerg NTS neuronok kevésbé érzékenyek az excitátoros szinaptikus inputra I-es típusú diabetesben. Csökkent továbbá a GABAerg NTS neuronoknak a megnövekedett glukózkoncentrációra adott válaszkészsége STZ-vel kezelt, hyperglycaemiás egerekben. Ez azt is jelenti, hogy az NTS szinaptikus aktivitása normális körülmények között a glukózkoncentrációval függ össze, hiszen a GCK közvetíti a glukózra adott válaszkészséget ezekben a neuronokban.

Ahhoz, hogy az NTS neuronok reagálni tudjanak az akut hypoglycaemiára, GCK aktivitás szükséges – ahogyan ezt korábbi vizsgálatokban kimutatták. Átmeneti hypoglycaemia kiváltotta reakcióról számoltak be glukóz transzporter 2-t (GLUT2) expresszáló NTS neuronokban, és a transzporter expressziójának kolokalizációját tapasztalták GABA neuronok egy alcsoportjában. A közelmúltban kimutattuk, hogy a glukóz a GABA neuronokat depolarizálja vagy hiperpolarizálja, és a depolarizáció különösen érzékeny a GCK aktivitás gátlására vagy a K_{ATP} csatornák blokkolására. Jelen vizsgálatunkban azt találtuk, hogy az I-es típusú diabeteses egerekben tapasztalt, átmeneti hyperglycaemiára adott csökkent neuronválaszhoz csökkent molekuláris, fehérje és funkcionális GCK expresszió társult a vagus komplexben, utalva arra, hogy az elhúzódó hyperglycaemia befolyásolja a vagus komplex glukózzal szembeni reakciókészségét.

A megemelkedett glukózkoncentráció fokozza a vagus afferensekből kiinduló glutamaterg szinaptikus transzmissziót patkányokban és egerekben, ám I-es típusú diabetes egy modelljében kimutatták, hogy ez a hatás I-es típusú diabetesben gyengül. Eredményeink összhangban vannak ezzel a megfigyeléssel, és magyarázatot kínálnak a válasz csökkenésének mechanizmusára. A bélben alkalmazott tápanyagok által kiváltott glukoregulatorikus választ az NTS ionotróp glutamát receptorainak gátlása megakadályozza, ami arra utal, hogy a válasz kialakulásához az NTS neuronok glutamaterg, vagus afferens aktivációja szükséges. A vagus komplex NMDA receptorainak gátlása megakadályozza, hogy a bariatrikus műtétnek a szisztémás vér-glukózsintre gyakorolt pozitív hatása érvényesüljön, amely hatás a feltételezések szerint a vagus komplexben található „bél-agytörzs-máj” körnek a gátlásával függ össze. Eredményeink alátámasztják azt a hipotézist, hogy az I-es típusú diabeteses egerek vagus komplexében tapasztalt csökkent GCK expresszió következtében csökken az NTS neuronok glukózzal szembeni válaszkészsége, beleértve a szinaptikus glutamátfelszabadulással szembeni választ. Valószínű, hogy az NTS-be érkező glutamaterg, zsigeri afferens szinaptikus input, ezen belül a bélben a mechano- és kemoreceptor aktivitást közvetítő inputok, kapcsolatban állnak a glukózkoncentráció alakulásával. A GCK expresszió helyreállítása elősegítheti az NTS neuronok glukózra adott válaszában normalizálódását, elősegítve ezáltal a zsigeri működés paraszimpatikus szabályozásának, ezen belül a glukóz homeostasisnak a helyreállítását diabetesben.