

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KITY POŽEK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KITY POŽEK

IZRAŽANJE GENA ZA CISTATIN C V PRISOTNOSTI AMILOIDA BETA NA  
CELIČNEM MODELU ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

EXPRESSION OF CYSTATIN C GENE IN THE PRESENCE OF AMYLOID BETA IN  
THE CELL MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka, mag. farm.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Bojanu Doljaku, mag. farm. za vse nasvete, vzpodbudne besede in pomoč pri načrtovanju ter izdelavi diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem vsem zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo in Blažu, za prijaznost in pomoč pri delu v laboratoriju.

Posebne zahvale veljajo mojim najbližnjim, ki so mi omogočili študij, mi stali ob strani in me vzpodbujali. Še posebej bi se rada zahvalila Aleksu, za stalno podporo, motivacijo in pomoč tekom študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno opravila pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka, mag. farm.

Kity Požek

# KAZALO VSEBINE

KAZALO PREGLEDNIC .....	II
KAZALO SLIK .....	II
POVZETEK .....	IV
ABSTRACT .....	V
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VI
1. UVOD.....	1
1.1. Alzheimerjeva bolezen .....	1
1.2. Amiloid beta .....	2
1.3. Cistatin C .....	4
1.3.1. Delovanje cistatina C na amiloid beta .....	5
1.3.2. Delovanje cistatina C na katepsine .....	5
1.3.3. Povezava med nivojem cistatina C in Alzheimerjevo boleznijo .....	6
2. NAMEN DELA .....	8
3. MATERIALI IN METODE .....	9
3.1. Materiali.....	9
3.1.1. Reagenti .....	9
3.1.2. Gojišča .....	10
3.1.3. Pufri .....	11
3.1.4. Vzorci .....	12
3.1.5. Laboratorijska oprema in aparature.....	13
3.2. Metode .....	14
3.2.1. Gojenje in štetje celic PC12.....	14
3.2.2. Priprava vzorcev .....	15
3.2.3. Test ELISA .....	16
3.2.4. Merjenje proteinov po Lowry-ju .....	19

3.2.5. Statistična obdelava podatkov .....	19
4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	20
4.1. Preverjanje delovanja testa ELISA za določanje CC.....	20
4.2. Ugotavljanje optimalne redčitve celičnih lizatov za test ELISA .....	22
4.3. Izpostavitev celic PC12 A $\beta$ (25-35).....	23
6. SKLEP .....	28
7. LITERATURA .....	29
7.1. VIRI SLIKOVNEGA GRADIVA .....	31

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Cistatin C in protitelesa proti cistatinu C .....	9
Preglednica II: Drugi reagenti. ....	9
Preglednica III: Laboratorijska oprema in aparature, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge in njihov proizvajalec ter tip. ....	13
Preglednica IV: Postopek izvajanja testa ELISA. ....	17
Preglednica V: Koncentracije standardnih raztopin rekombinantnega CC (rCC), uporabljene za preverjanje delovanja testa ELISA.....	20
Preglednica VI: Časovna shema eksperimenta.....	25
Preglednica VII: Shema primerjave normaliziranih množin CC v kontrolnih celicah (K) in celicah izpostavljenih A $\beta$ (PC12 + A $\beta$ (25-35)), znotraj istih časovnih točk.....	26

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Tridimenzionalna struktura zvitega A $\beta$ , dolgega 42 aminokislin - A $\beta$ 42. ....	2
<b>Slika 2:</b> Shema tvorbe topnih oligomernih agregatov in netopnih fibril (proti desni), ki nastanejo z agregacijo topnega A $\beta$ (na levi).....	3
<b>Slika 3:</b> Tridimenzionalna struktura cistatina C.....	4
<b>Slika 4:</b> Shema interakcij med dejavniki, udeleženimi v Alzheimerjevi bolezni (⊕ pomeni stimulacijo, ⊖ pomeni zaviranje, ? je predmet raziskovanja diplomske naloge).....	8
<b>Slika 5:</b> Shema priprave vzorcev.....	16

<b>Slika 6:</b> Shema testa ELISA.....	17
<b>Slika 7:</b> Nelinearni odziv testa ELISA na standardne raztopine rCC v območju od 0,3-38,4 ng/mL .....	21
<b>Slika 8:</b> Linearni odziv testa ELISA na standardne raztopine rCC v zoženem območju od 0,3-4,8 ng/mL .....	21
<b>Slika 9:</b> Odziv različnih redčitev celičnega lizata na testu ELISA. ....	22
<b>Slika 10:</b> Redčitve celičnega lizata v območju od 1:2 do 1:128 so v linearni povezavi. ....	23
<b>Slika 11:</b> Mikroskopska slika celic PC12 na kolagenski podlagi, kontrolnih in izpostavljenih A $\beta$ (25-35) za čas 24 in 48 ur.....	24
<b>Slika 12:</b> V testu ELISA uporabljene redčitve 1:2 in 1:4 so se poleg neredčenega lizata izkazale za linearno odvisne v primeru, da so bili lizati pripravljeni iz celic, izpostavljenih A $\beta$ (25-35). .....	25
<b>Slika 13:</b> Izraženost gena za CC, izmerjena na proteinskem nivoju, kot delež glede na kontrolne celice po različnih časih izpostavitve A $\beta$ (25-35). ....	26

## POVZETEK

Alzemerjeva bolezen je kronična nevrodegenerativna bolezen in je najpogostejši vzrok demence pri starejši populaciji. Zanjo je značilno patološko kopičenje amiloidnih plakov v izvenceličnem prostoru, kopičenje nevrofibrilarnih pentelj znotraj celic (nevronov), izguba nevronov in posledično atrofija specifičnih delov možganov ter zmanjšanje števila sinaps v preživelih nevronih. Amiloidni oziroma senilni plaki so sestavljeni pretežno iz amiloida beta, ki je glavni razgradni produkt amiloidnega prekurzorskega proteina v amiloidnih plakih. Tam je prisoten tudi cistatin C, inhibitor cisteinskih proteaz, ki ima antiamiloidogeno funkcijo, saj se veže na amiloid beta ter inhibira formacijo njegovih nevrotoksičnih oblik (fibril in oligomerov).

V diplomski nalogi smo preučili izražanje gena za cistatin C v celicah PC12, ki so uveljavljen celični model Alzheimerjeve bolezni. Naša hipoteza je, da se ob prisotnosti amiloida beta, izražanje gena za cistatin C poveča, saj na podlagi ugotovitev, da cistatin C pripomore k zmanjšanju nevrotoksičnosti amiloida beta, sklepamo, da je to eden od načinov celične obrambe. Primerjali smo njegovo izražanje v odsotnosti in prisotnosti stimulacije celic z nevrotoksičnim fragmentom amiloida beta, v različnih časovnih intervalih. Z metodo encimsko imunskega testa na trdni podlagi (test ELISA) smo v lizatih celic izmerili izraženost gena za cistatin C.

Z eksperimenti smo dokazali, da pride do porasta nivoja cistatina C v celicah PC12 že znotraj prvih 12 ur po izpostavitvi amiloidu beta in s tem potrdili hipotezo, da se ob prisotnosti amiloida beta inducira izražanje gena za cistatin C.

### Ključne besede

Alzheimerjeva bolezen, demenca, amiloid beta, cistatin C, celična linija PC12

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is a chronic neurodegenerative disorder which is the most common cause of dementia in the elderly. Its neuropathological hallmarks are extracellular amyloid plaque deposition, intracellular neurofibrillary tangle deposition, neuronal loss, consequential specific brain area atrophy and loss of synapses in surviving neurons. Amyloid or so called 'senile' plaques consist predominantly of amyloid beta, a major degradation product of amyloid precursor protein in amyloid plaques. Another important component of amyloid plaques is cystatin C, a cysteine protease inhibitor which shows an anti-amyloidogenic function by binding to amyloid beta and inhibiting formation of its neurotoxic forms (fibrils and oligomers).

In our thesis, we studied cystatin C gene expression in a PC12 cell line, an established Alzheimer's disease cell model. Our hypothesis is that cystatin C gene expression increases in the presence of amyloid beta. Based on findings that cystatin C helps reduce amyloid beta neurotoxicity, we hypothesized that this is one of the cell's protection mechanisms. Its expression in PC12 cells was compared in the absence and presence of neurotoxic amyloid beta fragment stimulus in different time intervals. We used enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich ELISA assay) to measure cystatin C gene expression in cell lysates.

In our experiment we proved that the level of cystatin C in PC12 cells increases in the first 12 hours after exposure to amyloid beta. We confirmed our hypothesis that the presence of amyloid beta induces cystatin C gene expression.

### **Key words**

Alzheimer's disease, dementia, amyloid beta, cystatin C, PC12 cell line

## SEZNAM OKRAJŠAV

A $\beta$	amiloid beta
AD	ang. "Alzheimer's disease", Alzheimerjeva bolezen
ADAM10	ang. " a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10", $\alpha$ -sekretaza
APP	amiloidni prekurzorski protein
BACE1	ang. "beta-site APP cleaving enzyme 1", $\beta$ -sekretaza
BSA	ang. "Bovine Serum Albumine", goveji serumski albumin
CC	cistatin C
Da	dalton
dH <sub>2</sub> O	deionizirana voda
DMEM	po Dulbeccu spremenjeno Eaglovo gojišče
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina
ELISA	ang. "enzyme-linked immunosorbent assay", encimskoimunski test na trdni podlagi
HRP	hrenova peroksidaza
mAb	monoklonsko protitelo
pAb	poliklonsko protitelo
PBS	ang. "Phosphate Buffered Saline", fosfatni pufer
rCC	rekombinantni cistatin C
rpm	ang. "rounds per minute", obratov na minuto
RPMI	večnamensko, splošno uporabljeno gojišče, primerno za sesalske celice
RSM	ang. "Reduced Serum Medium", gojišče za sesalske celice z manj seruma
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

# 1. UVOD

Demenca je v sodobni družbi pomemben zdravstveni, socialni in ekonomski problem (1). Populacija se stara in s tem strmo narašča število bolnikov z demenco, za katero je najpogostejši vzrok Alzheimerjeva bolezen (ang. "Alzheimer's disease", AD). To je nepovratna, napredajoča nevrodegenerativna bolezen, ki se običajno pojavi po 65. letu starosti in postopoma vodi v upad kognitivnih sposobnosti, v vedenjske motnje in spremembe osebnosti (2). Kljub temu, da bolezen poznamo od leta 1906 in je po ocenah danes na svetu približno 50 milijonov ljudi z Alzheimerjevo demenco, še ne poznamo natančnega mehanizma njenega nastanka in poteka ter posledično primanjkuje zdravilnih učinkovin za lajšanje simptomov, preprečevanje in predvsem za vzročno zdravljenje bolezni (3, 4). Pomembno je, da odkrijemo oz. razumemo patološke mehanizme, ki so odgovorni za nastanek in potek bolezni, saj je to pogoj za razvoj ustreznih učinkovin za vzročno zdravljenje. V naši raziskavi se bomo osredotočili na vlogo cistatina C (CC), zaviralca cisteinskih proteaz, v patofiziologiji AD. Z razumevanjem njegove vloge se približamo razumevanju mehanizma bolezni in s tem prispevamo k usmeritvi raziskav novih zdravilnih učinkovin ter novih pristopov za zdravljenje AD.

## 1.1. Alzheimerjeva bolezen

AD je poimenovana po kliničnem psihiatru in nevroanatomu dr. Aloisu Alzheimerju, ki je leta 1906, po smrti duševne bolnice Auguste Deter, opisal spremembe v njenem možganskem tkivu. Odkril je značilne spremembe, na katerih še danes temelji potrditev diagnoze AD in sicer amiloidne oz. senilne plake ter nevrotibrilarne pentlje. Bolnica je umrla v starosti 55 let, zaradi takrat nepoznane bolezni, katere simptomi so vključevali izgubo spomina, jezikovne težave, motnje spanja in nepredvidljivo vedenje. Primerov take klinične slike je bilo malo, saj je bila pričakovana življenska doba okrog 45 let, AD pa se navadno pojavi v višji starosti, dedna oblika AD z zgodnjim nastopom pa je redka (2, 5, 6). Danes je zaradi AD dementnih 6-8 % ljudi starejših od 65 let in skoraj 30 % starejših od 80 let. Pogosteje zbolijo ženske (7). Poleg sporadične oblike, poznamo tudi dedne oblike AD, ki so posledica mutacij v genih in se pojavijo zgodaj, med 45. in 65. letom. Te predstavljajo do 5% vseh oblik AD (8, 9).

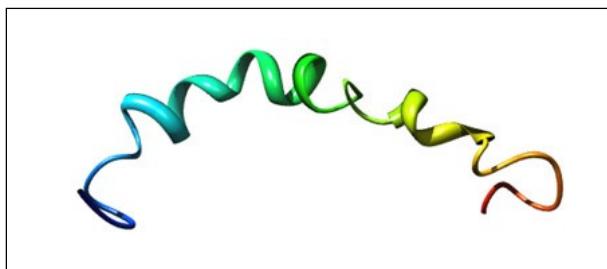
Prvi znaki bolezni so pozabljivost, neurejenost, nemirnost in motnje v presoji. Sledi upad spoznavnih (kognitivnih) sposobnosti, kot so pomnenje nedavnih dogodkov

(epizodični spomin), dejstev, ki niso povezana s časom in prostorom (semantični spomin), lahko pa so v ospredju tudi motnje vidno-prostorske zaznave (ocenjevanje razdalje, hitrosti ipd.). Nato pride do upada sposobnosti govora in razumevanja jezika, čustvenih motenj, zmedenosti in agresije. Z napredovanjem bolezni človek postopoma izgublja sposobnost opravljanja osnovnih vsakodnevnih nalog. V zadnjem stadiju postanejo pacienti povsem odvisni od pomoči okolice. Od prvih kliničnih znakov do smrti mine v povprečju 8 do 10 let (8-11).

Natančnega patološkega mehanizma nastanka AD še ne poznamo, prav tako njen napredovanje ni vedno predvidljivo. Za razvoj ustreznih zdravilnih učinkovin bodo potrebne bazične raziskave, ki bodo definirale dejavnike, ki bolezen sprožijo in zaradi katerih pride do nevrodegeneracije. Zunajcelični amiloidni plaki in znotrajcelične nevrfibrilarne pentlje v možganih se še vedno smatrajo za glavne značilnosti AD. Poleg amiloidogeneze je za AD značilna tudi izguba povezav (sinaps) med živčnimi celicami in propad nevronov. Posledično pride do atrofije asociacijskih predelov možganske skorje - frontalnega, temporalnega in parietalnega režnja. Prisotno je tudi vnetje in oksidativni stres. Do motenj prehajanja kratkotrajnega v dolgoročni spomin pride zaradi nevrodegenerativnih sprememb in znižanja holinergičnega prenosa v hipokampusu (2, 9).

## 1.2. Amiloid beta

Amiloidni plaki (lehe) so sestavljeni pretežno iz amiloida  $\beta$  ( $A\beta$ ), razpadnega produkta transmembranskega proteina - amiloidnega prekurzorskoga proteina (APP) (12).  $A\beta$ , odkrit leta 1984, je topen polipeptid, najpogosteje dolg 40 ( $A\beta40$ ) ali 42 ( $A\beta42$ ) aminokislin (Slika 1), ki nastane s proteolitičnim razcepom APP z  $\beta$ -sekretazo (BACE1), ki ji sledi cepitev z encimskim kompleksom, imenovanim  $\gamma$ -sekretaza (2, 9).

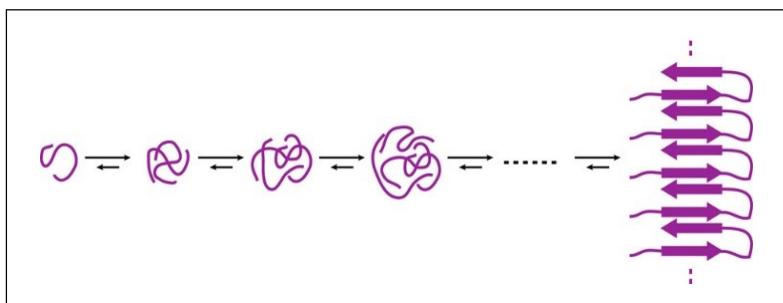


Slika 1: Tridimenzionalna struktura zvitega  $A\beta$ , dolgega 42 aminokislin -  $A\beta42$ .

Topni  $A\beta$  je široko zastopan v možganih in najdemo ga tudi v drugih delih telesa. Količinsko prevladuje oblika  $A\beta40$ . Nekatere raziskave so pokazale, da ima v fizioloških

koncentracijah pozitivne učinke na sinaptične funkcije, rast in preživetje nevronov ter da ščiti pred oksidativnim stresom, toksini in patogeni. A $\beta$ 42 predstavlja le 10% vsega A $\beta$ , a kljub temu prevladuje v amiloidnih plakih, verjetno zato, ker je bolj hidrofoben in s tem nagnjen k agregaciji in tvorbi fibril (9, 13).

Z nalaganjem A $\beta$  se tvorijo topni oligomerni agregati in netopne fibrile s končno strukturo  $\beta$ -listov (*Slika 2*). Agregati A $\beta$  imajo močne nevrotoksične učinke, kot so npr. okvara homeostaze kalcijevih ionov, aktivacija kinaze proteina tau, nastajanje prostih radikalov (oksidativni stres), oksidacija proteinov, peroksidacija lipidov in pospeševanje prepisovanja genov za apoptozo nevronov (12, 14, 15).



*Slika 2: Shema tvorbe topnih oligomernih agregatov in netopnih fibril (proti desni), ki nastanejo z agregacijo topnega A $\beta$  (na levi).*

Kljub temu, da amiloidni plaki, sestavljeni pretežno iz fibril A $\beta$ , še danes veljajo za eno glavnih značilnosti AD, ni jasno ali so vzrok ali posledica mehanizma bolezni. Zanimivo je predvsem to, da časovno napredovanje amiloidnih plakov ni preprosto povezano s kliničnim napredovanjem AD. Plaki se namreč najprej pojavijo na periferiji, v možganski skorji, prvi klinični znaki pa so v glavnem posledica okvare hipokampusa, ki se nahaja globoko v možganih (9, 14, 16). Poleg tega amiloidne plake najdemo tudi pri zdravih starostnikih, med tem ko so se na mišjih modelih AD spominske težave nakazale že pred pojavom amiloidnih plakov v njihovih možganih (16-18).

Novejša odkritja kažejo, da je najbolj nevrotoksična topna oligomerna oblika A $\beta$ , ki dobro korelira s stopnjo AD. Poleg tega se danes večji pomen kot zunajceličnim amiloidnim plakom, pripisuje znotrajceličnim oblikam A $\beta$  in spremembam razmerja med A $\beta$ 40 in A $\beta$ 42 v možganih (9, 14, 16, 19).

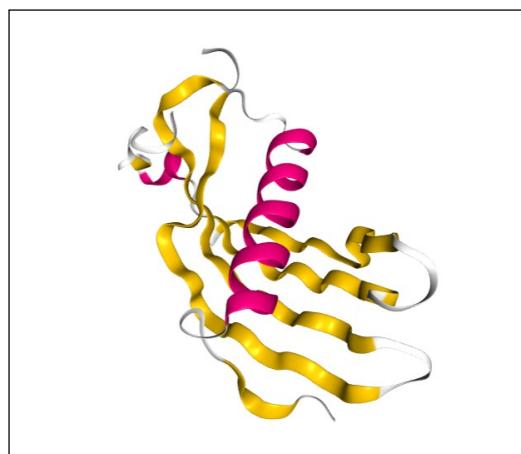
Sposobnost vpliva na kognitivne procese ni značilna le za A $\beta$ 40 in A $\beta$ 42, temveč tudi za nekatere njune fragmente. To velja zlasti za 11 aminokislín dolg fragment A $\beta$  (25-35), ki velja za dejansko biološko aktivno območje A $\beta$ , odgovorno za njegove nevrotoksične lastnosti. Od vseh doslej izvedenih derivatov je A $\beta$  (25-35) najkrajši fragment, ki agregira

v fibrile in ohranja toksičnost, značilno za celoten peptid A $\beta$ . Dokazali so tudi, da je ta fragment prisoten v nevronih bolnikov z AD (20).

### 1.3. Cistatin C

CC je endogeni zaviralec (inhibitor) cisteinskih proteaz, ki se je izkazal kot pomemben pri regeneraciji živčevja po poškodbah oziroma boleznih. Raziskave kažejo, da ima pomembno vlogo tudi pri AD (12).

CC, imenovan tudi  $\gamma$ -sled, je približno 14 kDa velik glikoprotein, ki ga sintetizirajo vse celice z jedrom (*Slika 4*). Je tipičen sekrecijski protein, ki se iz nevronskih celic v okolico izloča po dveh poteh in sicer po klasični sekretorni poti ter v eksosomih – stabilnih ekstracelularnih veziklih, ki služijo prenosu snovi in komunikaciji med celicami. CC je prisoten v vseh tkivih in telesnih tekočinah sesalcev, pomembno vlogo pa odigra tudi znotraj celic, predvsem v lizosomih (21).



*Slika 3: Tridimenzionalna struktura cistatina C.*

CC ima širok spekter bioloških vlog, med drugim deluje protibakterijsko, protivirusno, modulira vnetne procese, celično proliferacijo, oksidativni stres itd. Pomembno fiziološko vlogo ima tudi v možganih, na kar kaže že dejstvo, da je njegova koncentracija v likvorju 5-krat višja kakor v serumu. CC deluje nevrotrofično, tako da spodbuja rast in ohranjanje nevronskih celic. Kot zaviralec lizosomskih proteaz, vzdržuje ravnotežje med proizvodnjo proteinov in njihovo razgradnjo s cisteinskimi proteazami, med katere sodijo tudi katepsini. Uravnotežena proteolitična aktivnost je ključna za normalno staranje, brez nevrodegenerativnih obolenj (12, 14, 22, 23).

Mnenja glede vloge CC pri AD se razhajajo. Nekatere starejše študije kažejo na nevrotoksičnost CC, nasprotno pa vse več študij potrjuje njegovo nevroprotективno vlogo

(12, 22). V nadaljevanju bomo predstavili ugotovitve, ki kažejo na nevropotekativno delovanje CC in vključujejo predvsem njegov odnos z A $\beta$  ter katepsini.

### **1.3.1. Delovanje cistatina C na amiloid beta**

CC ščiti nevrone pred nevrotoksičnostjo A $\beta$ , tako posredno kot neposredno. Neposredno nevropotekativno deluje tako, da zaščiti celice pred toksičnim delovanjem že nastalih agregatov A $\beta$ . Posredno pa CC ščiti nevrone na več načinov. Eden od načinov je, da preklopi amiloidogeno procesiranje APP z  $\beta$ -sekretazo v ne-amiloidogeno procesiranje z  $\alpha$ -sekretazo (ADAM10) in s tem zmanjša nastajanje A $\beta$  ter poveča nastajanje topnih fragmentov APP, ki na nevrone delujejo zaščitno. Do tega pride, ker CC spodbudi razgradnjo BACE1 in transkripcijo ADAM10 (24). Poleg tega se v eksosomih CC veže na A $\beta$ 40 in A $\beta$ 42, s tem zavre tvorbo oligomerov in fibril ter prepreči aktivacijo kaspaze-2. Na ta način zmanjša apoptozo, ki jo preko aktivacije iste kaspaze povzroča A $\beta$ . Z vezavo tudi prepreči odlaganje A $\beta$  in nastanek amiloidnih plakov (12).

Dokazano je, da lahko CC izzove autofagijo, kataboličen proces razgradnje celici lastnih snovi v lizosому. S tem se iz celice odstrani akumuliran A $\beta$ . Poleg tega zaščiti celice pred apoptozo, saj se z autofagijo odstranijo poškodovani organeli, ki jo lahko sprožijo (25, 26).

Na zaščitno delovanje CC kaže tudi dejstvo, da dodatek CC v celično kulturo s prisotnim oligomernim in fibrilarnim A $\beta$ , poveča celično preživetje. Poleg tega so pri mišjem *in vivo* modelu AD, z genom za pretirano sintezo CC, opazili manjšo obremenitev z A $\beta$ , v primerjavi z mišjim modelom AD z normalnim izražanjem gena za CC (14, 25, 27).

### **1.3.2. Delovanje cistatina C na katepsine**

Katepsini so cisteinske, aspartatne ali serinske proteaze, ki se najpogosteje nahajajo in delujejo v kislem endosomalno-lizosomskejem sistemu, na katerega pa niso omejene. V primeru, da se sprostijo iz lizosomov v citosol nevronov, pride do nevrodgenerativnih sprememb in do uhajanja katepsinov v zunajcelični prostor. Vir katepsinov v zunajceličnem prostoru je predvsem aktivirana mikroglia. Do aktivacije mikroglie pride verjetno zaradi spremenjenega izražanja katepsinov med staranjem možganov. V zunajceličnem prostoru odigra pomembno vlogo predvsem katepsin B, cisteinska proteaza, ki naj bi bil vpletен v proizvodnjo interlevkina 1 $\beta$ , v odgovor na A $\beta$ . Posledica proizvodnje

tega citokina je vnetje možganskega tkiva, ki je značilno prisotno pri AD. V povezavi z vnetjem so dokazali tudi povišano izražanje gena za katepsin X, ki prav tako sodi med cisteinske proteaze. Ta je vključen tudi v regulacijo možganske funkcije, prek procesiranja  $\gamma$ -enolaze, ki deluje nevrotrofično in zaščitno proti toksičnosti A $\beta$ . Katepsin X cepi  $\gamma$ -enolazo in s tem okrni njen zaščitno delovanje, kar pospeši nevrodegeneracijo in napredovanje AD. Aktivirana mikroglia pospešeno izloča tudi katepsin S. To je cisteinska proteaza, povezana z motnjami spanja, ki sodijo med simptome AD (25, 28, 29).

Aktivnost teh katepsinov mora biti strogo regulirana, za kar je odgovornih več mehanizmov. Smiselno je omeniti predvsem nadzor s strani endogenih zaviralcev cisteinskih proteaz, med katere sodi tudi CC. Ta se nahaja skupaj s katepsini v lizosomih, kjer regulira njihovo aktivnost. Prisoten je tudi v likvoru, zato lahko zmanjša škodo zaradi izpusta katepsinov v zunajcelični prostor (25).

Aktivnost CC je nadzorovana, saj pretirano zaviranje cisteinskih proteaz povzroča škodo celicam. Za nadzor nad aktivnostjo CC je odgovoren katepsin D, ki sodi med aspartatne proteaze in je sposoben razgradnje CC. Med staranjem se lahko poveča izražanje gena za katepsin D in s tem naraste njegova aktivnost, kar vodi do pretiranega zaviranja aktivnosti CC. Posledično se zmanjša zaščitno delovanje CC v povezavi z nevrotoksičnostjo A $\beta$  in se pospeši oblikovanje amiloidnih plakov (25).

### 1.3.3. Povezava med nivojem cistatina C in Alzheimerjevo boleznijo

Izločeni CC lahko detektiramo v telesnih tekočinah, kot so likvor in serum. Spremembe v serumski koncentraciji CC so lahko posledica različnih stanj, kot so npr. kronična ledvična bolezen, rak, revmatoidni artritis in AD (12).

Študija na starostnikih je pokazala, da je nizka serumska koncentracija CC povezana z večjim tveganjem za razvoj AD, neodvisno od drugih dejavnikov tveganja, kot so starost, spol, genotip apolipoproteina E, sladkorna bolezen, visok krvni tlak, holesterol itd. Na podlagi te ugotovitve so sklepali, da je lahko nizka koncentracija CC zgodnji označevalc AD, ki se pojavi pred kliničnimi znaki bolezni. Nasprotno pa so v drugi študiji ugotovili, da so se preiskovanci z višjimi serumskimi vrednostmi CC slabše izkazali na testih spoznavnih sposobnosti, kakor preiskovanci z nizkimi in srednjimi vrednostmi CC. Zaključimo lahko, da so nenormalne vrednosti CC, povišane ali znižane, periferni označevalci za motnje spoznavnih sposobnosti in/ali AD. Za oceno občutljivosti in napovedne vrednosti CC kot zgodnjega označevalca AD, bodo potrebne nadaljnje

raziskave (12).

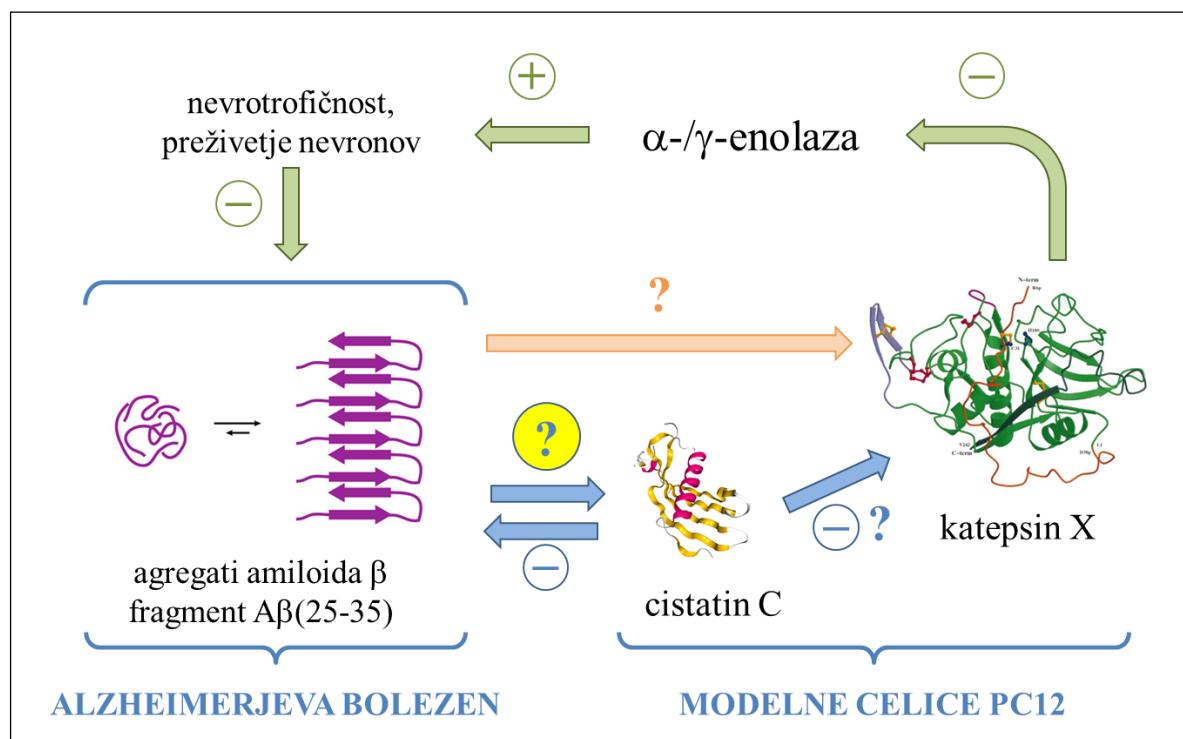
Kljub zaščitnem delovanju CC, moramo torej upoštevati, da so visoke koncentracije CC lahko prav tako škodljive, kot prenizke. Zato je pri razvoju zdravilnih učinkovin z delovanjem na izražanje gena za CC, potrebno vključiti tudi mehanizem za nadzor nad količino izraženega CC, da se doseže optimalno zaščitno delovanje CC.

## 2. NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo preučevali izražanje gena za CC v celicah PC12, ki so uveljavljen celični model AD. Primerjali bomo njegovo izražanje v odsotnosti in prisotnosti stimulacije celic s toksičnim fragmentom A $\beta$  (25-35), po različnih časovnih inkubacijah. Izraženost gena za CC v vzorcih bomo izmerili z metodo encimsko imunskega testa na trdni podlagi (test ELISA).

Naša hipoteza je, da se ob prisotnosti A $\beta$  (25-35) izražanje gena za CC poveča, saj na podlagi ugotovitev, da CC pripomore k zmanjšanju nevrotoksičnosti A $\beta$ , sklepamo, da je to lahko eden od načinov celične obrambe.

Na celičnem modelu želimo potrditi zaščitno vlogo CC pri AD, posredovani z A $\beta$ . Zanima nas, kako se celice odzovejo na prisotnost toksičnega A $\beta$  v rastnem mediju, z izražanjem gena za CC in sicer ali se izražanje poveča, zmanjša ali ne spremeni (*Slika 5*). Te ugotovitve lahko dodatno razjasnijo vlogo CC pri napredovanju AD in nakažejo možnost za nove terapevtske pristope pri zdravljenju le-te.



*Slika 4: Shema interakcij med dejavniki, udeleženimi v Alzheimerjevi bolezni (⊕ pomeni stimulacijo, ⊖ pomeni zaviranje, ? je predmet raziskovanja diplomske naloge).*

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. Materiali

##### 3.1.1. Reagenti

###### ANTIGEN IN PROTITELESA

Preglednica I: Cistatin C in protitelesa proti cistatinu C.

OZNAKA	OPIS	OSNOVNA KONCENTRACIJA
rCC	rekombinantni cistatin C	3 mg/mL
pAb antiCC	kunčja poliklonska protitelesa proti cistatinu C	1,6 mg/mL
mAb antiCC-HRP	mišja monoklonska protitelesa proti cistatinu C, konjugirana s hrenovo peroksidazo (maj 2001; subklon 1A2)	nedoločena (redčenje 1:1500)
mAb antiCC-HRP	mišja monoklonska protitelesa proti cistatinu C, konjugirana s hrenovo peroksidazo (december 2016; subklon 1A2)	nedoločena (redčenje 1:500)

###### DRUGI REAGENTI

Preglednica II: Drugi reagenti.

OZNAKA	OPIS	PROIZVAJALEC
BSA	goveji serumski albumin	Sigma
Advanced DMEM	po Dulbeccu spremenjeno Eaglovo gojišče	ICN Biomedicals Inc.
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina	Promega
FBS	fetalni goveji serum	Gibco
HS	konjski serum	Gibco
KCl	kalijev klorid	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev hidrogenfosfat	Sigma
L-glutamin	esencialna aminokislina	ICN Biomedicals Inc.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	natrijev karbonat	Kemika

<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</b>	natrijev hidrogenfosfat	Riedel-deHaën
<b>NaCl</b>	natrijev klorid	Kemika
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</b>	natrijev dihidrogenfosfat	Riedel-deHaën
<b>NaN<sub>3</sub></b>	natrijev azid	Riedel-deHaën
<b>nigrozin</b>	barvilo	Sigma
<b>penicilin</b>	antibiotik	Sigma
<b>RPMI 1640</b>	osnova za gojišče RPMI	Gibco BRL (Invitrogen)
<b>Reagent A</b>	za metodo po Lowry-ju	Bio-Rad
<b>Reagent B</b>	za metodo po Lowry-ju	Bio-Rad
<b>Substrat S</b>	za metodo po Lowry-ju	Bio-Rad
<b>streptomycin</b>	antibiotik	Sigma
<b>TMB</b>	substrat pri metodi ELISA	Sigma
<b>Tween 20</b>	površinsko aktivna snov	Serva

### 3.1.2. Gojišča

#### Kompletno gojišče za celice PC12 – DMEM:

83% Advanced DMEM  
 10% HS  
 5% FBS  
 1% penicilin/streptomicin  
 1% L-glutamin

Premešamo in do uporabe hranimo v hladilniku pri 4 °C.

#### Kompletno gojišče za celice PC12 – RPMI:

83% Advanced RPMI  
 10% HS  
 5% FBS  
 1% penicilin/streptomicin  
 1% L-glutamin

Premešamo in do uporabe hranimo v hladilniku pri 4 °C.

### **RSM (reduced serum medium) – RPMI:**

90,5%	Advanced RPMI
5%	HS
2,5%	FBS
1%	penicilin/streptomycin
1%	L-glutamin

Premešamo in do uporabe hranimo v hladilniku pri 4 °C.

### **3.1.3. Pufri**

#### **Pufer A (za vezavo primarnih protiteles pri testu ELISA)**

1,60 g (15 mM)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
2,94 g (35 mM)	NaHCO <sub>3</sub>
0,20 g (3 mM)	NaN <sub>3</sub>

Dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 1 L in uravnamo pH na 9,6 ter pufer filtriramo.

#### **Pufer B (za spiranje mikrotitrsko plošče pri testu ELISA; WASH pufer)**

8,50 g (0,15 mM)	NaCl
1,34 g (7,5 mM)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
2,94 g (2,5 mM)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
0,50 g (0,05 %)	Tween 20

Dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 1 L in uravnamo pH na 7,2.

#### **Pufer C (za blokiranje prostih mest na mikrotitrski plošči, za redčenje standardov, vzorca in konjugiranih sekundarnih protiteles pri testu ELISA)**

2 g	BSA
-----	-----

Dopolnimo s puferom B do 100 mL.

#### **Pufer za TMB (za redčenje substrata TMB)**

21,0 g (0,1 M)	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> x H <sub>2</sub> O
17,8 g (0,1 M)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O

Dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 1 L in uravnamo na pH 6,0.

**Pufer PBS** (fosfatni pufer z dodatkom NaCl):

1,8 g (0,10 mM)       $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

0,2 g (1,47 mM)       $\text{KH}_2\text{PO}_4$

8,0 g (136 mM)      NaCl

0,2 g (2,68 mM)      KCl

Dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 1 L in uravnamo pH na 7,4.

**Lizirni pufer** (za pripravo celičnih lizatov)

1190 mg (50 mM)      HEPES

877 mg (150 mM)      NaCl

200  $\mu\text{L}$  (1 mM)      EDTA

1000  $\mu\text{L}$  (1%)      Triton

Dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 100 mL in uravnamo pH na 6,5 ter pufer filtriramo.

### 3.1.4. Vzorci

Naši vzorci so lizati celic PC12, ki smo jih gojili na podlagi iz kolagena tipa IV, v prisotnosti in v odsotnosti A $\beta$  (25-35), v različnih časovnih intervalih (12h, 24h, 36h, 48h, 60h in 72h).

Celice PC12 (ATCC® CRL-1721™) so uveljavljen celični model Alzheimerjeve bolezni. PC12 je nevronska celična linija podganjega feokromocitoma. Te celice so okroglaste in sposobne tvoriti nevrite (izrastke), v prisotnosti živčnega rastnega dejavnika. Na njihovo rast vpliva podlaga, na katero so pritrjene. Atmosfera gojenja je 95 % zraka in 5 % CO<sub>2</sub>, temperatura 37 °C (30).

Gojenje celic in priprava vzorcev so opisani v nadaljevanju.

### 3.1.5. Laboratorijska oprema in aparature

*Preglednica III: Laboratorijska oprema in aparature, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge in njihov proizvajalec ter tip.*

OPREMA	TIP IN PROIZVAJALEC
analizna tehtnica	AB104, Mettler-Toledo
aparatura za ultrafiltracijo	BÜCHI
avtomatske pipete	e10 in e120, Biohit
avtomatske večkanalne pipete	e1200, Biohit
avtomatski spiralec mikrotitrskih ploščic	Wellwash Versa Microplate Washer, Thermo Scientific
celični inkubator	Binder
centrifuga	Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific
čitalec mikrotitrskih ploščic (spektrofotometer)	TECAN Safire 2
čitalec mikrotitrskih ploščic (spektrofotometer)	BIOTEK
gojiščne plastenke	TPP Tissue Culture Flasks; 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>
gojiščne ploščice	Transwell; z 12 vdolbinicami (MTP12), s 96 vdolbinicami (MTP96)
hladilnik (+4°C)	Gorenje, LTH
invertni mikroskop	Nikon TMS-F
komora z laminarnim pretokom zraka	PIO SMBC 183, PIO LFVP9; Iskra
konično mešalo (vortex)	Vibromix 104EV, Tehnica
krmilnik pipetiranja	Midi Plus, Biohit/Sartorius
krovna stekelca	Alltra d.o.o.
magnetno mešalo	Rotamix 550 MM, Tehnica; Heidolph Polymax 1040
membranski filter za ultrafiltracijo	AMICON, YM3 24 in 62 mm
mikrotitrska ploščica za test ELISA	Thermo Scientific
mini centrifuga	Capsulefuge PMC-060, Tomy
mini centrifuga	IKA mini G, IKA Centrifuges
nastavki za pipete	Biosphere

objektno steklo	Thermo Scientific, Menzel Gläser
pH meter	HANNA HI9321 microprocessor pH meter
pipete	0,1-2 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL mLINE, Biohit/Sartorius
ploščica za štetje celic	Tiefe Depth Profounder 0,100 mm 0,0025 mm <sup>2</sup> , THOMA
polavtomatske pipete	0,2-2 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, Eppendorf
posoda za filtracijo (nuča)	Sartorius
suhi inkubator	WTB Binder
ultrazvočna kadička	Sonis3, Iskra PIO
zamrzovalnik (-20°C)	Gorenje
zamrzovalnik (-80°C)	VIP series -86°C, Sanyo

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Gojenje in štetje celic PC12

Celice smo gojili v gojiščni plostenki ( $75 \text{ cm}^2$ ), pri sterilnih pogojih, v celičnem inkubatorju, pri temperaturi  $37^\circ\text{C}$  in v vlažni atmosferi s 5 %  $\text{CO}_2$ . S pomočjo invertnega mikroskopa smo redno opazovali rast celic. Postopoma smo dodajali gojišče in celice prenesli v dodatne plostenke, ko so prerasle 70 do 80 % površine gojiščne plostenke. Celice smo šteli s hemocitometrom, pri čemer smo jih 2-krat redčili s tripanskim modrilom (nigrozin) in njihovo število izračunali po enačbi (*Enačba 1*). Ko smo dobili zadostno količino celic, smo jih uporabili za poskuse.

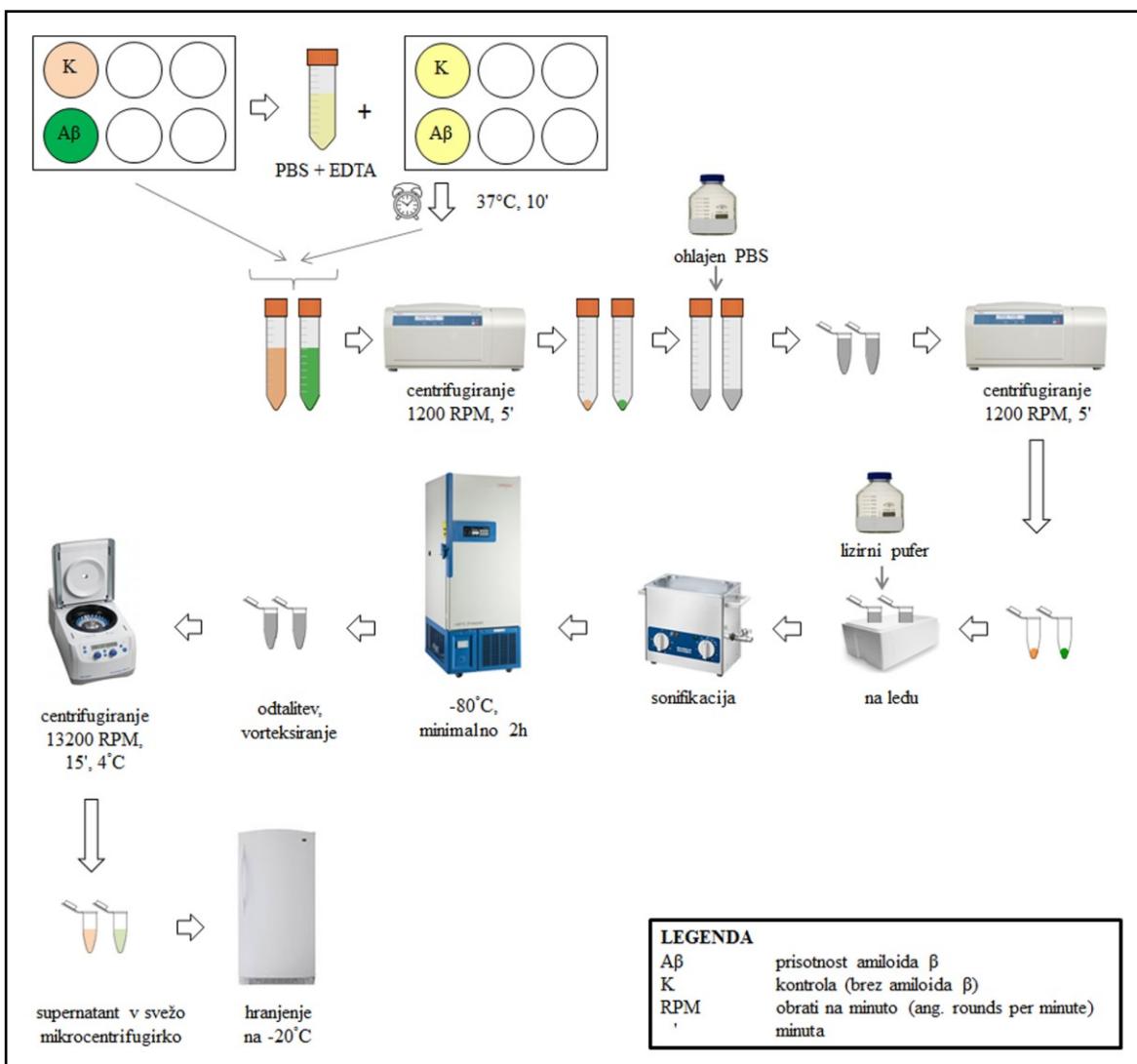
$$\text{Enačba 1: število celic} = \frac{(A + B)}{2} \times R \times 10^4 \text{ celic/mL}$$

A, B = število celic v vsakem polju

R = faktor redčenja

### **3.2.2. Priprava vzorcev**

Vzorce smo pripravljali sterilno, v laminariju. Najprej smo pripravili podlago za pritrjevanje celic na mikrotitrsko ploščo. V jamice dveh mikrotitrskih plošč smo nanesli po 1,5 mL raztopine kolagena v pufru A, s koncentracijo 20 ng/mL. Plošči smo inkubirali 2h pri 37 °C in nato iz jamic odpipetirali preostali pufer A. V jamice s kontrolami smo napipetirali po 1,5 mL suspenzije celic PC12, ki smo jih gojili v gojišču DMEM, pri ustreznih pogojih. V vsako jamico smo nanesli po 1 milijon celic, resuspendiranih v 1,5mL gojišča RSM, ki smo ga predhodno inkubirali 24h pri 37 °C. V jamice z vzorci smo napipetirali po 1 milijon celic PC12, resuspendiranih v 1,5 mL 5 µM raztopine Aβ (25-35) v gojišču RSM, ki smo ga predhodno inkubirali 24h pri 37 °C. Namen inkubacije gojišča brez in z Aβ je, da Aβ zavzame ustrezeno konformacijo, hkrati pa zagotovimo enako temperaturo gojišč za nanos na plošči in izključimo možnost vpliva povisane temperature na gojišče RSM, ki bi lahko posledično vplivalo na izid poskusa. Tako pripravljeni mikrotitrski plošči smo inkubirali pri 37 °C in vzorčili po 12h, 24h, 36h, 48h, 60h in 72h. Ob vsaki časovni postavki smo celice pogledali pod mikroskopom, da smo v grobem preverili gostoto pritrjenih celic. Nato smo celice sprali s kolagenske podlage tako, da smo s pomočjo pipete podlago sprali z vsebino jamice ter vsebino prenesli v centrifugirko. S pomočjo pufra PBS z dodanim EDTA smo odstranili celice, ki so bile močneje pritrjene na podlago in sicer tako, da smo jih 10 minut inkubirali pri 37 °C in nato vsebino združili v ustrejni centrifugirki. Sledila je 5-minutna centrifugacija pri 1200 rpm. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v 1 mL hladnega pufra PBS z dodanim EDTA in jih prenesli v epice ter ponovno centrifugirali. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v 150 µL lizirnega pufra in jih takoj postavili na led. Nato smo kontrole in vzorce sonicirali v ultrazvočni kadički, dvakrat po 6 sekund in enkrat po 8 sekund, v razmaku 10 sekund ter jih shranili na -80 °C do konca poskusa. Na koncu smo vse vzorce odtalili, centrifugirali 15 minut pri 4 °C, 13200 rpm in za meritev vsebnosti CC in celokupnih proteinov uporabili supernatant (*Slika 5*).



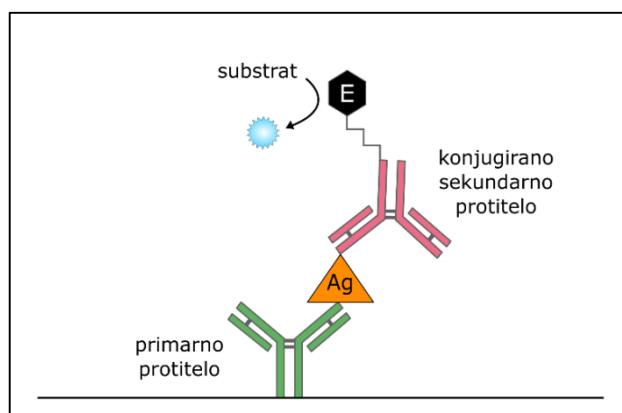
Slika 5: Shema priprave vzorcev.

### 3.2.3. Test ELISA

Test ELISA ali encimsko-imunski test na trdni podlagi (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) je imunološka metoda za detekcijo antigenov ali protiteles v vzorcu. Je občutljiva in visoko specifična metoda, kar pomeni, da omogoča merjenje izredno nizkih koncentracij analitov v kompleksnih mešanicah snovi. Danes poznamo številne različice te metode, s katerimi lahko kvalitativno in (semi)kvantitativno določimo antigene in protitelesa v vzorcu (31).

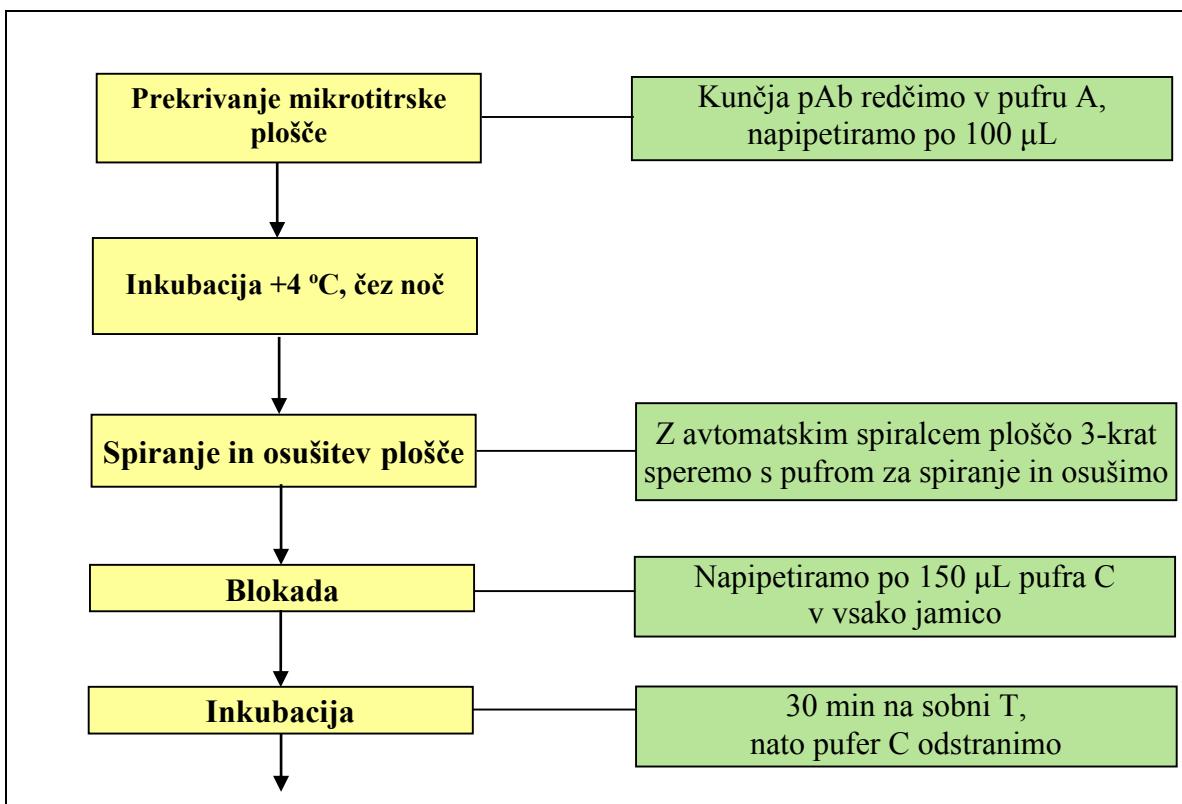
Test ELISA je prirejen za kvantitativno določanje antigenov v vzorcu, v našem primeru smo določali cistatin C (*Slika 6*). Na mikrotitrsko ploščo smo najprej vezali kunčja pAb antiCC, nato smo nanje vezali cistatin C (bodisi iz standardne raztopine, bodisi iz vzorca) in nazadnje še protitelesa z vezanim encimom, ki omogoči spremembo barve

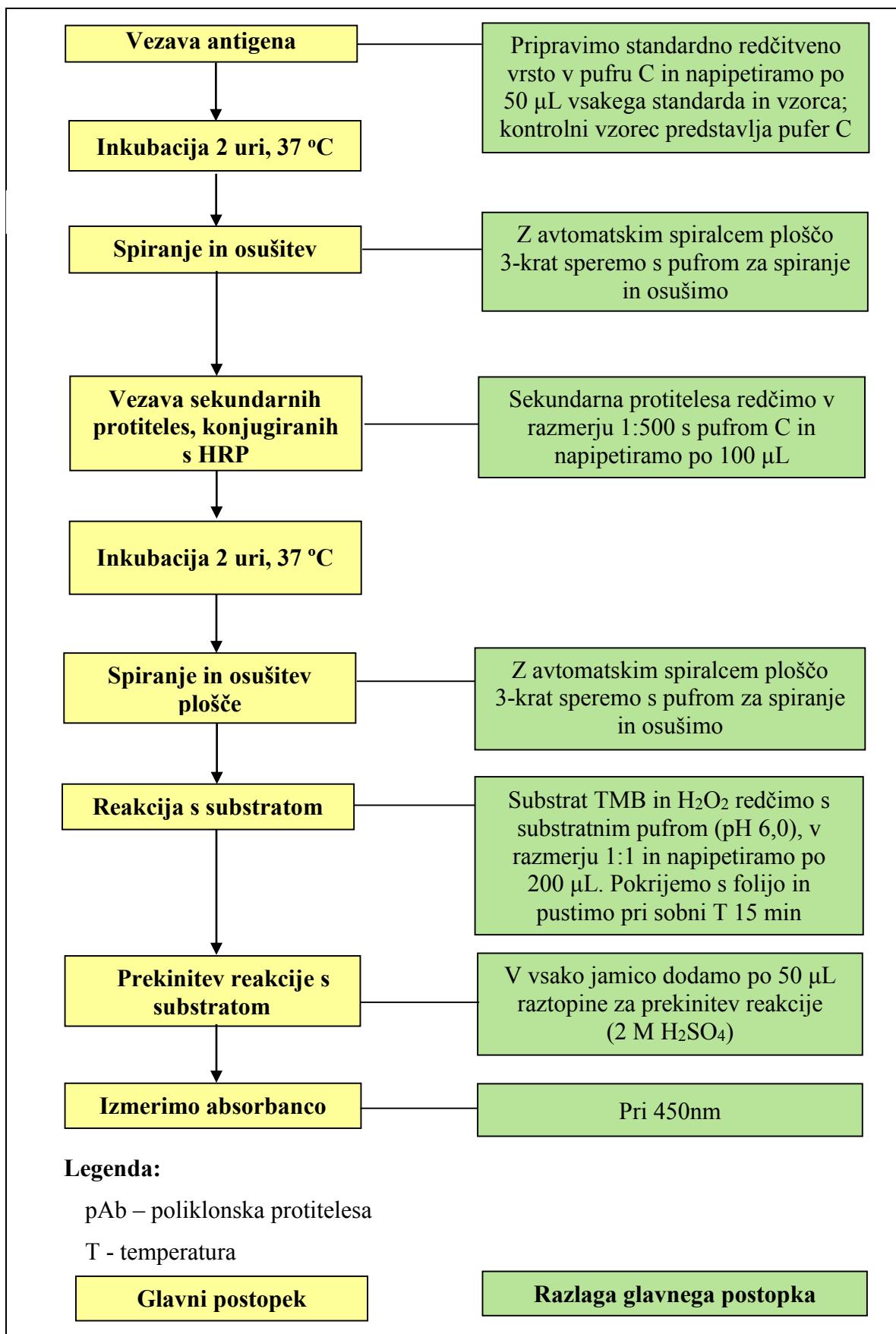
substrata in detekcijo prisotnosti preiskovanega antiga, v našem primeru cistatina C. Detekcijo omogoči encimska reakcija, ki jo katalizira na protitelo konjugiran encim, v našem primeru je to hrenova peroksidaza (HRP), ki pretvori substrat TMB in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v temno modro obarvan produkt. Množina nastalega produkta je sorazmerna množini protitelesa ter indirektno sorazmerna množini antiga v vzorcu. Encimsko reakcijo HRP prekinemo z dodatkom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nastali produkt je rumene barve in ga kvantificiramo spektrofotometrično pri 450 nm. Natančna shema postopka testa ELISA je prikazana v preglednici (*Preglednica IV*).



*Slika 6: Shema testa ELISA.*

*Preglednica IV: Postopek izvajanja testa ELISA.*





### **3.2.4. Merjenje proteinov po Lowry-ju**

Koncentracijo celokupnih proteinov v vzorcu smo določali z metodo po Lowry-ju. Meritev smo izvedli zato, ker je potrebno upoštevati možnost napak pri nanašanju in spiranju celic z mikrotitrske plošče, saj število celic vpliva na količino proizvedenega CC v vzorcu. Predpostavili smo, da koncentracija proteinov v vzorcu korelira s številom celic v vzorcu in na podlagi tega preračunali koncentracije CC.

Vsak celični lizat smo 4-krat redčili z lizirnim pufrom. Pripravili smo standarde, tako da smo BSA štirikrat zaporedno redčili z dH<sub>2</sub>O do koncentracij od 0,2 do 1,5 mg/mL. Kot slepo probo smo uporabili dH<sub>2</sub>O. Reagent A' smo pripravili z mešanjem reagenta S in A v razmerju 1:50. Na mikrotitrsko ploščo smo nanesli standarde in vzorce ter jim dodali reagente A' in B v ustreznih količinah. Ploščo smo stresali, inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi in nato pomerili absorbanco pri 750 nm.

### **3.2.5. Statistična obdelava podatkov**

Rezultate meritev smo obdelali v programu Microsoft Excel. Izračunali smo aritmetično sredino vrednosti večkratnih meritev ter relativno standardno deviacijo, da bi ugotovili ali so bile naše meritve ponovljive.

Iz meritev standardov, ki so vsebovali znano količino CC, smo izdelali standardno umeritveno krivuljo, ji določili determinacijski koeficient ( $R^2$ ) in enačbo, po kateri smo izračunali koncentracijo CC v vzorcih.

Primerjali smo količino CC v celicah, izpostavljenih A $\beta$  (25-35) in v kontrolnih celicah ter izdelali graf, ki prikazuje izraženost gena za CC, kot delež glede na kontrolne celice, po različnih časih izpostavitve A $\beta$  (25-35).

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. Preverjanje delovanja testa ELISA za določanje CC

Preden smo začeli meriti izražanje gena za CC v celicah PC12, smo preverili delovanje testa ELISA. Preverili smo ali obe protitelesi, uporabljeni v testu ELISA, prepoznavata rekombinantni CC (rCC). Obarvan produkt pri testu ELISA dobimo le, kadar pride do povezave med poliklonskim kunčjim protitelesom (lovilno pAb antiCC), rCC in monoklonskim protitelesom 1A2, konjugiranim s hrenovo peroksidazo (detekcijskim mAb antiCC-HRP), ki pretvori substrat TMB v obarvan produkt. Kot antigen smo uporabili osem standardnih raztopin rCC, kot prikazuje preglednica (*Preglednica V*).

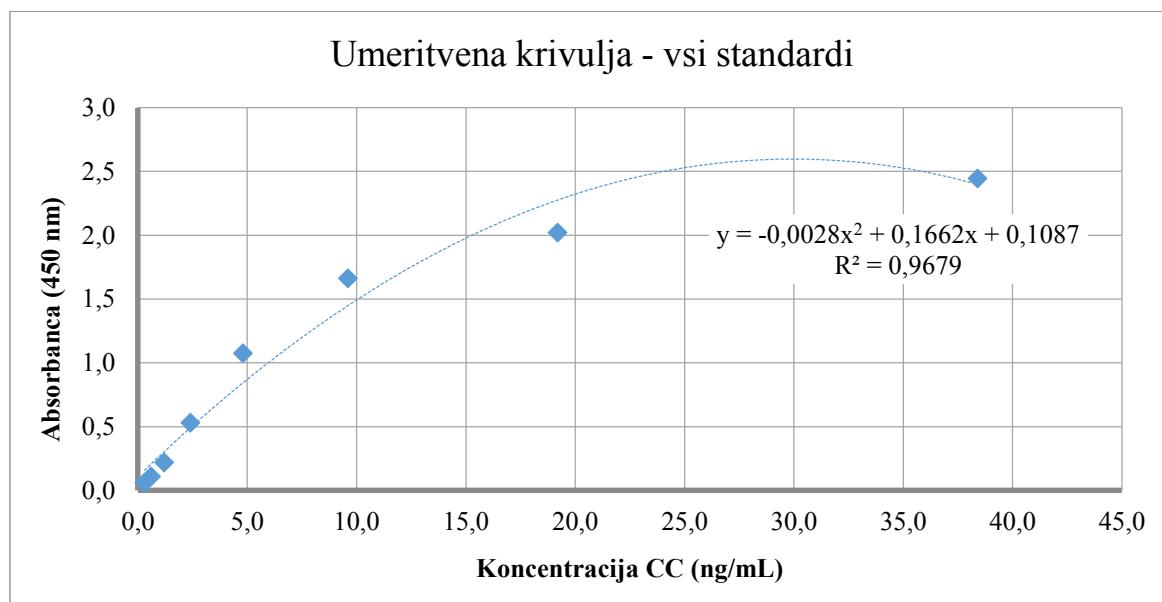
*Preglednica V: Koncentracije standardnih raztopin rekombinantnega CC (rCC), uporabljene za preverjanje delovanja testa ELISA.*

	rCC (ng/mL)
c1	38,4
c2	19,2
c3	9,6
c4	4,8
c5	2,4
c6	1,2
c7	0,6
c8	0,3

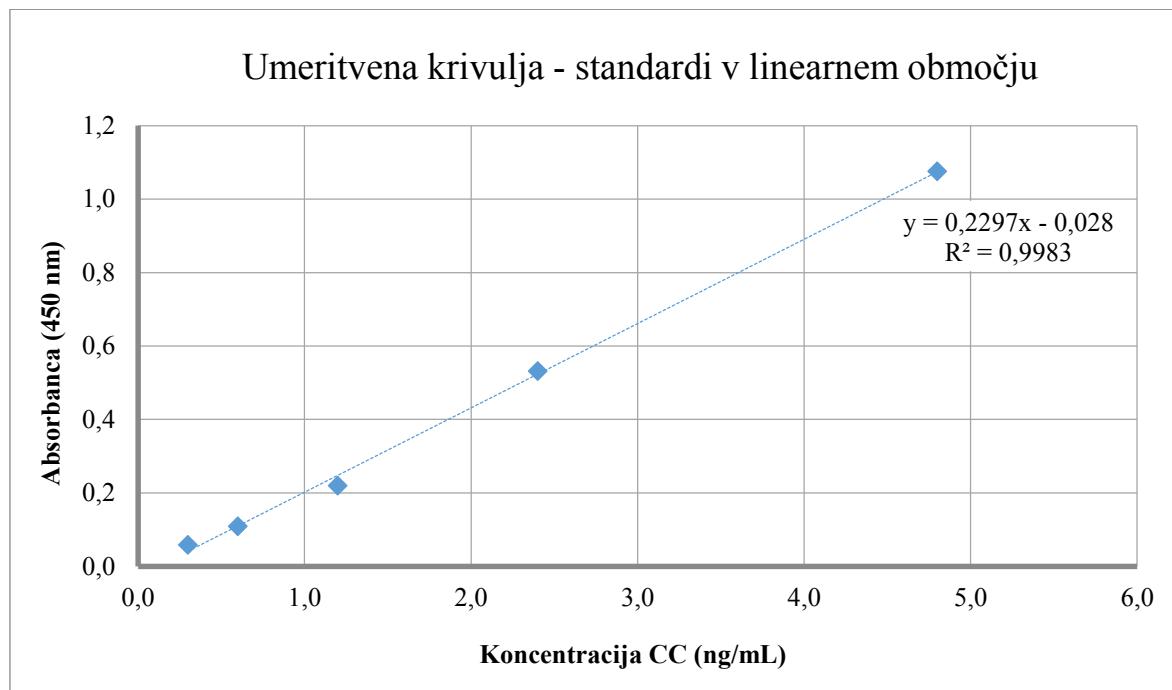
Pri testu ELISA je zaželeno uporabljati takšno koncentracijsko območje antigena, da je odziv pri testu linearno odvisen od koncentracije standarda. Pri uporabljenih osmih standardih, smo dobili odzive, ki smo jim poskusili prilegati polinomska krivulja 2. reda (*Slika 7*). Odzivi v celotnem koncentracijskem območju c1-c8 torej niso bili linearni. Zato smo izbrali le tiste standarde, ki dajejo premico. Temu kriteriju ustrezajo koncentracije rCC c4-c8 (0,3-4,8 ng/mL). Omenjenih pet točk leži na prilegajoči premici, ki se s točkami dobro ujema ( $R^2=0,9983$ ) (*Slika 8*).

Iz umeritvene premice lahko enostavno "odčitamo" koncentracijo našega analita CC, ki ga bomo kvantificirali v lizatih celic PC12. Pri izvedbi testa ELISA smo na vsaki uporabljeni mikrotitrski ploščici nanesli omenjene standarde in iz rezultatov izrisali

umeritveno premico, ki smo ji določili smerni koeficient ( $k$ ) in odsek na ordinati ( $n$ ).



Slika 7: Nelinearni odziv testa ELISA na standardne raztopine rCC v območju od 0,3-38,4 ng/mL.



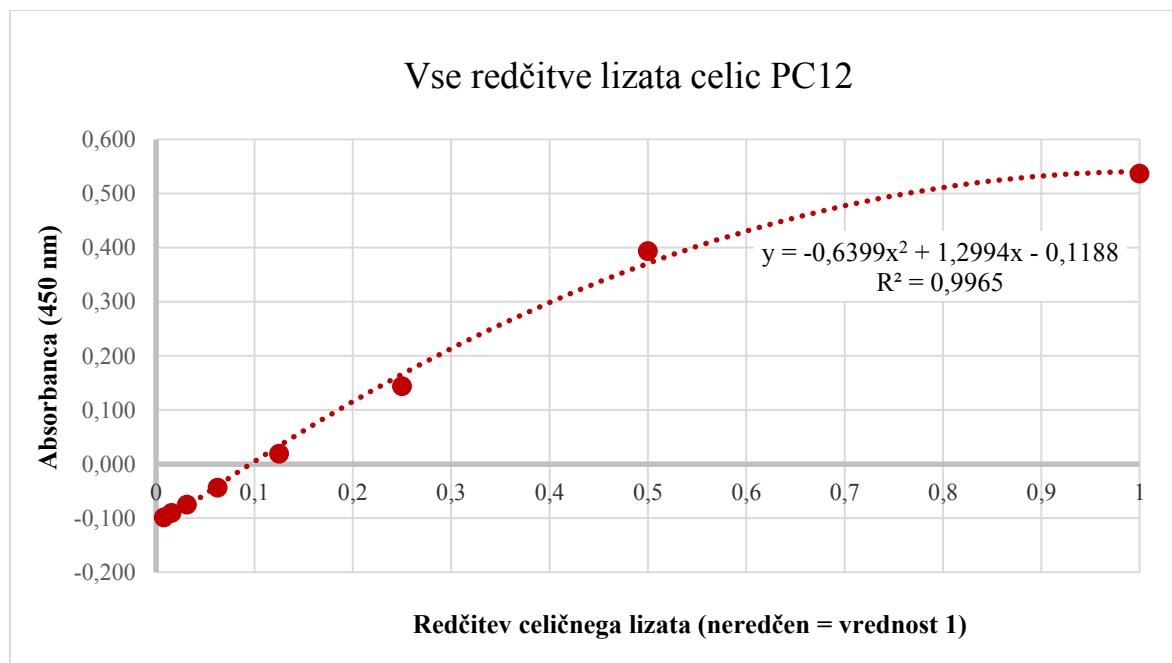
Slika 8: Linearni odziv testa ELISA na standardne raztopine rCC v zoženem območju od 0,3-4,8 ng/mL.

Med poskusi nam je zmanjkalo mAb antiCC-HRP (2001), zato smo pripravili novo zалого z glutaraldehidno metodo in preverili njihovo delovanje (rezultati le-tega niso prikazani).

#### 4.2. Ugotavljanje optimalne redčitve celičnih lizatov za test ELISA

Z liziranjem celic PC12 z lizirnim pufrom in zamrzovanjem na -80 °C smo iz  $10^6$  celic dobili lizate, ki so vsebovali od 0,5-1 mg celokupnih proteinov (določenih z metodo po Lowry-ju). Težava je v tem, da je CC znotraj celic zelo malo - v naših poskusih smo ga določili nekje med 1-10 ng na 1 mg celokupnih proteinov, saj je primarno ekskrecijski protein. Test ELISA za CC ima sicer relativno nizko mejo detekcije, vendar je bilo tudi število celic v posameznem poskusu relativno majhno. Celice smo namreč že leli spremljati v daljših časovnih obdobjih (do 72 ur), zato smo jih v jamicah mikrotitrskih plošč, prekritih s kolagenom bili primorani gojiti v majhnih količinah, da potrebe po dodajanju svežega gojišču v daljšem časovnem obdobju ne bi bile velike. Za vsak poskus smo na začetku uporabili okrog  $10^6$  celic. Ker smo proučevali nevrotoksični učinek A $\beta$  (25-35) na izražanje gena za CC, smo se že leli izogniti drugim stresnim dejavnikom na celice, kot je npr. pomanjkanje hranilnih snovi v gojišču.

Da smo kljub omenjenim dejstvom lahko določili CC v lizatih tako, da bodo odzivi znotraj koncentracijskega območja umeritvene premice, smo pripravili lizat iz  $3 \times 10^6$  celic v  $300 \mu\text{L}$  lizirnega pufra in ga za test ELISA uporabili v osmih različnih koncentracijah (neredčen, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) (*Slika 9*).

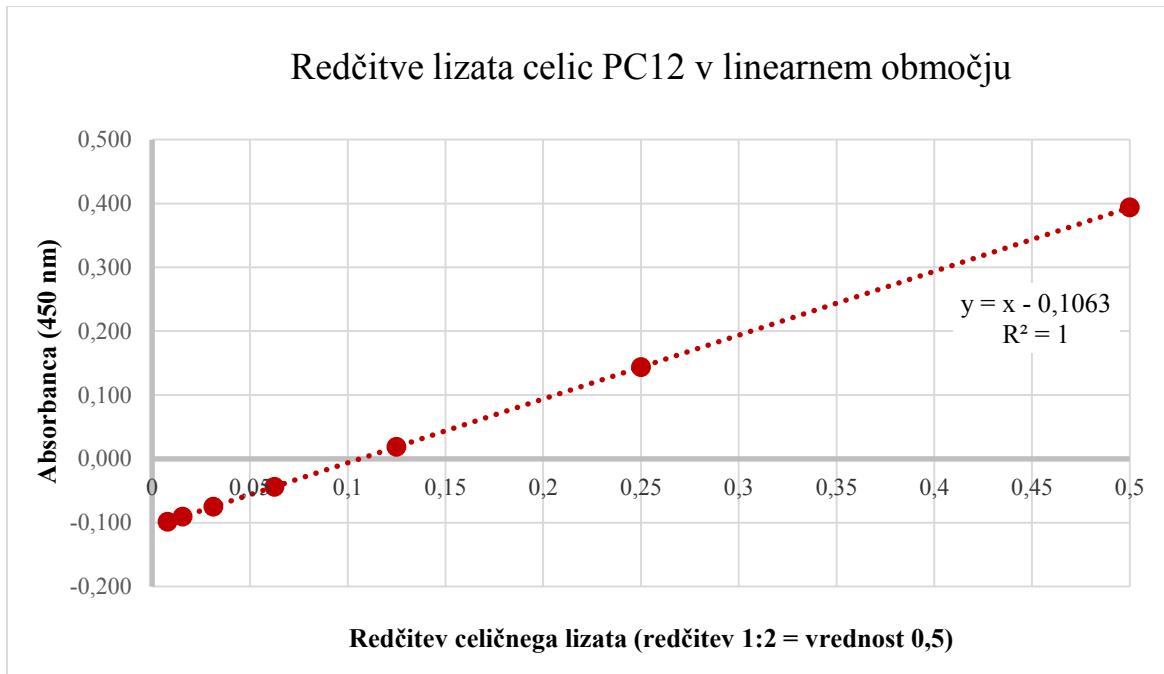


*Slika 9: Odziv različnih redčitev celičnega lizata na testu ELISA.*

Podobno, kot rCC, je tudi celični CC mogoče kvantificirati z imunskim testom. CC, ki je glikoprotein, bi lahko protitelo drugače prepoznavalo kot rCC, v primeru, da bi bilo

protitelo usmerjeno proti epitopu glikanskega izvora.

Iz krivulje je razvidno, da daje neredčen lizat navidezno nižje vrednosti CC, kot bi pričakovali. Iz grafa smo izpustili neredčen vzorec in ugotovili, da se ostale redčitve lizata popolnoma ( $R^2 = 1$ ) prilegajo premici (Slika 10).

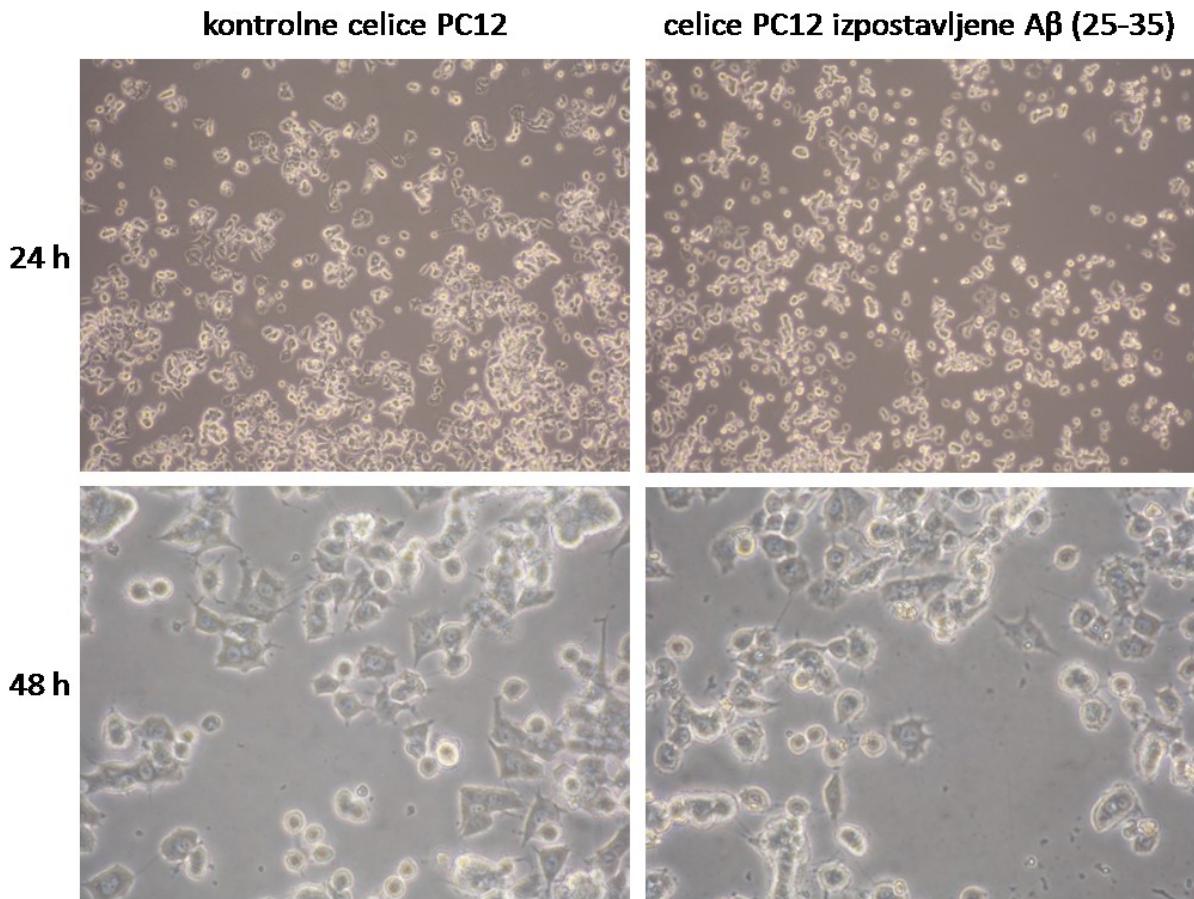


Slika 10: Redčitve celičnega lizata v območju od 1:2 do 1:128 so v linearni povezavi.

Zelo visoke redčitve (1:16 ali več) lahko padejo pod mejo zanesljive kvantifikacije, saj so izmerjene absorbance zelo blizu absorbanci slepega vzorca (na grafu so vidne kot negativne vrednosti), in seveda za kvantifikacijo niso uporabne. Vsekakor pa so redčitve dobrodošle z vidika, da lahko z majhno količino lizata, ki nam je na voljo, opravimo več analiz, ne da bi zato morali ponoviti celoten eksperiment izpostavitev celic A $\beta$  (25-35).

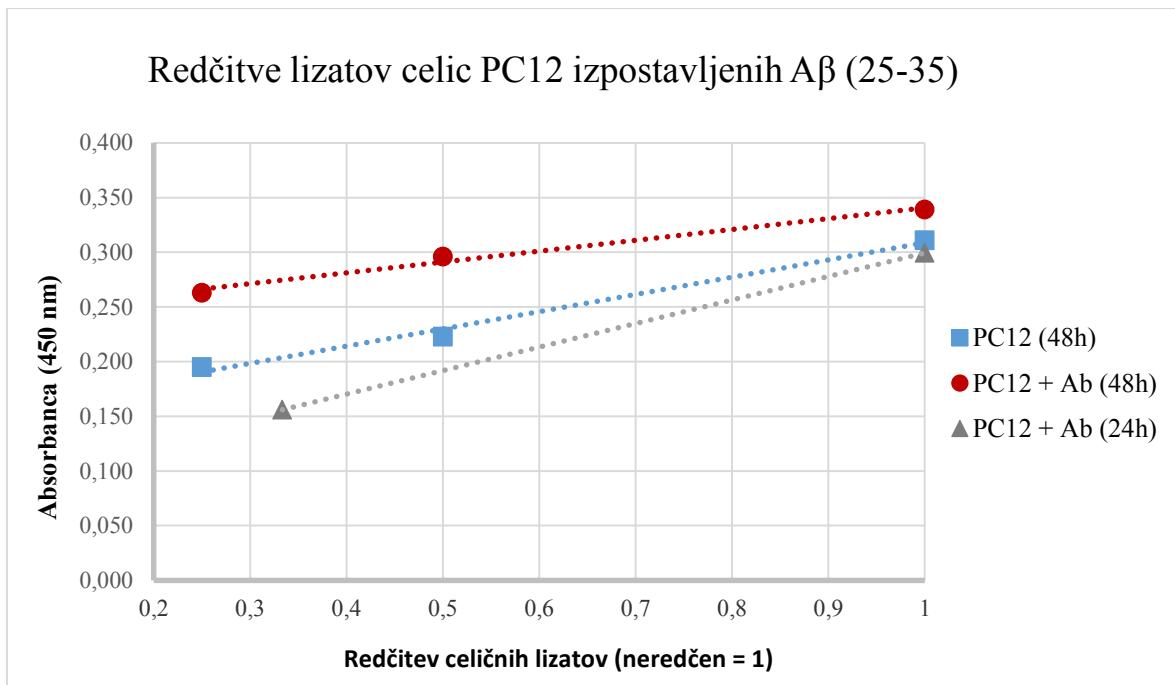
#### 4.3. Izpostavitev celic PC12 A $\beta$ (25-35)

Celice PC12 smo za lažje odstranjevanje rastnega gojišča pustili 24 ur priraščati na podlago iz kolagena. Za popolno ujemanje *in vivo* razmer bi bilo potrebno dodajati dejavnike, kot je npr. živčni rastni dejavnik, pod vplivom katerega celice hitro in močneje diferencirajo (izraščajo nevrite). Vendar je na tej stopnji ugotavljanja vpliva A $\beta$  (25-35) dovolj, če so celice imobilizirane preko kolagena. Pod mikroskopom smo opazili, da je del celic na kolagenu izraščal živčne končiče (Slika 11).



*Slika 11: Mikroskopska slika celic PC12 na kolagenski podlagi, kontrolnih in izpostavljenih A $\beta$  (25-35), za čas 24 in 48 ur.*

Najprej smo preverili, ali se CC v lizatih celic PC12 drugače detektira, če so celice izpostavljenje A $\beta$  (25-35), zlasti glede redčitev, uporabljenih za test ELISA (*Slika 12*). Uporabili smo enake redčitve kot pri lizatu celic, ki niso bile izpostavljenie A $\beta$  (25-35). V linearinem odnosu so se tokrat izkazali le neredčeni lizat in redčitve do največ 1:4. Glede na to, smo vse nadaljnje lizate uporabili v največ treh koncentracijskih točkah (neredčen, 1:2 in 1:4).



*Slika 12: V testu ELISA uporabljene redčitve 1:2 in 1:4 so se poleg neredčenega lizata izkazale za linearno odvisne v primeru, da so bili lizati pripravljeni iz celic, izpostavljenih A $\beta$  (25-35).*

Glede na to, da časovna dinamika nevrotoksičnega delovanja A $\beta$  (25-35) na celice PC12 v literaturi še ni opisana, smo poskušali celice izpostaviti A $\beta$  (25-35) najprej za obdobje 24 ur in 48 ur. Sklepali smo, da lahko pride do izražanja gena za CC, ki na celice deluje dokazano zaščitno že v nekaj urah po izpostavitvi, a nas je zanimal tudi srednjeročnejši odziv celic na A $\beta$  (25-35).

Izvedli smo šest neodvisnih poskusov izpostavite celic A $\beta$  (25-35), tako, da smo v vsaki časovni točki pripravili lizat kontrolnih celic PC12, ki so uspevale pri enakih pogojih v ločeni jamici, ravno tako pritrjene na kolagen (*Preglednica VI*). Ker se je končno število celic, iz katerih je bil pripravljen lizat lahko razlikovalo, smo vsakemu lizatu izmerili koncentracijo celokupnih proteinov, ki so sorazmerni izhodiščnemu številu celic. Koncentracija proteinov je bila izražena v mg/mL, koncentracija CC v lizatih pa v ng/mL. Da smo množino izraženega gena za CC lahko primerjali med vzorci, smo koncentracijo "normalizirali" na proteine in celični CC izrazili kot (ng CC)/(mg celokupnih proteinov).

*Preglednica VI: Časovna shema eksperimenta.*

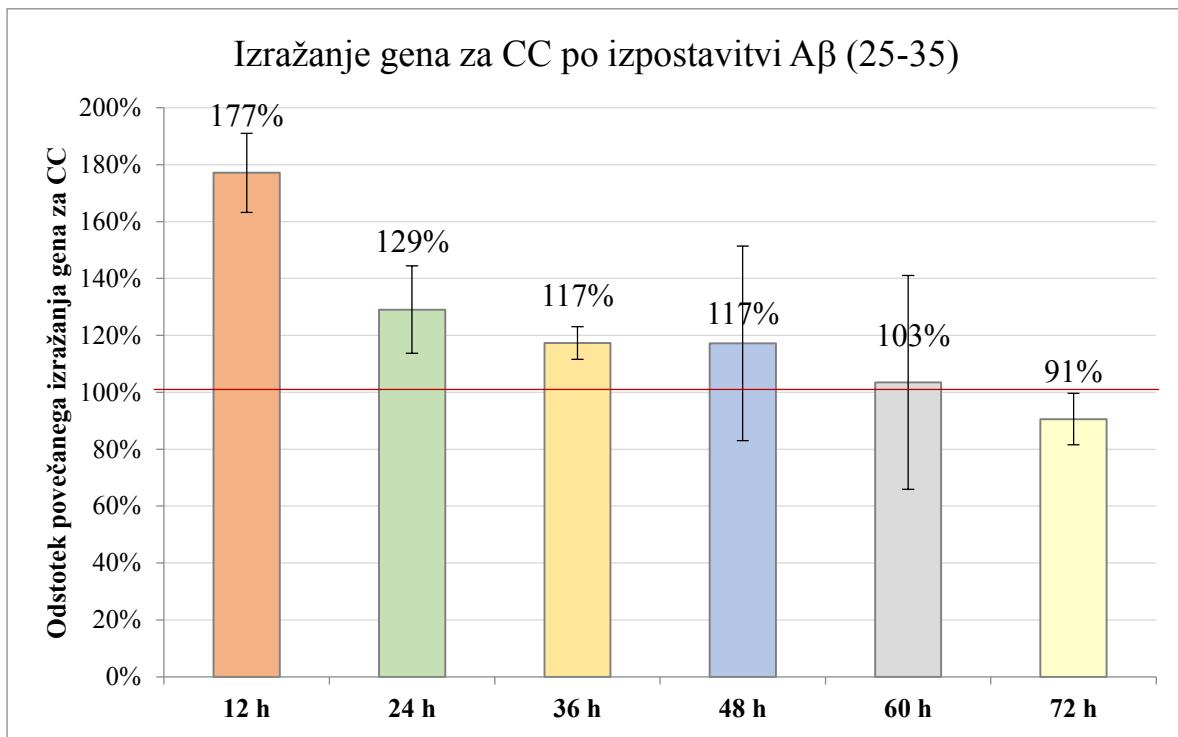
Trajanje izpostavitve celic PC12 A $\beta$ (25-35):	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
---	------	------	------	------	------	------

Normalizirane množine CC smo nato znotraj istih časovnih točk primerjali med kontrolnimi celicami (K) in izpostavljenimi celicami (PC12 + A $\beta$  (25-35)), po naslednji shemi (*Preglednica VII*).

*Preglednica VII: Shema primerjave normaliziranih množin CC v kontrolnih celicah (K) in celicah izpostavljenih A $\beta$  (PC12 + A $\beta$  (25-35)), znotraj istih časovnih točk.*

K (12 h)	:	PC12 + A $\beta$ (25-35) (12h)
K (24 h)	:	PC12 + A $\beta$ (25-35) (24h)
K (36 h)	:	PC12 + A $\beta$ (25-35) (36h)
K (48 h)	:	PC12 + A $\beta$ (25-35) (48h)
K (60 h)	:	PC12 + A $\beta$ (25-35) (60h)
K (72 h)	:	PC12 + A $\beta$ (25-35) (72h)

Porast sinteze CC v izpostavljenih celicah smo prikazali v odstotkih, glede na kontrolne celice (*Slika 13*).



*Slika 13: Izraženost gena za CC, izmerjena na proteinskem nivoju, kot delež glede na kontrolne celice po različnih časih izpostavitve A $\beta$  (25-35).*

Rezultati kažejo, da pride do porasta CC, prisotnega znotraj celic PC12, že znotraj prvih 12 ur po izpostavitvi A $\beta$  (25-35). Zaščitno delovanje CC torej nastopi zelo zgodaj. Seveda je kvantificirana le oblika CC, ki je prisotna v celicah ali pa je nanje vezana, mogoče preko celične membrane. Ni pa zajeta oblika, ki se izloči iz celic in ostane raztopljena v rastnem gojišču. Zanimivo bi bilo nadalje kvantificirati celokupen CC, kar bi še dodatno razjasnilo vpliv A $\beta$  (25-35) na preživetje tega celičnega modela.

V diplomskem delu smo tako dokazali, da se celice PC12 ob prisotnosti fibril A $\beta$  (25-35) odzovejo s povečanim izražanjem gena za CC. Glede na podobnost dogajanj v možganih bolnikov z AD, bi lahko celice PC12 uporabili za iskanje novih zdravilnih učinkovin, ki bi še dodatno stimulirale izražanje gena za CC in tako upočasnile, če ne ustavile napredovanje te bolezni.

## 5. SKLEP

V okviru diplomskega dela smo preverjali izražanje gena za CC, v prisotnosti A $\beta$ , na celičnem modelu Alzheimerjeve bolezni. Celice PC12 smo izpostavili A $\beta$  (25-35), fragmentu, odgovornem za nevrotoksične lastnosti A $\beta$ . Izraženi CC smo kvantificirali s testom ELISA in količino sintetiziranega proteina, ki je prisoten v ali vezan na membrano celic PC12, primerjali med celičnimi lizati z odsotnim in prisotnim A $\beta$  (25-35), v različnih časovnih intervalih (12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h in 72 h).

Za kvantifikacijo CC smo uporabili linearni del umeritvene krivulje a standardnimi koncentracijami rCC, v območju 0,3-4,8 ng/mL. Redčitev vzorcev lizatov smo optimizirali tako, da so bile absorbance znotraj linearEGA območja umeritvene krivulje (neredčen, 1:2, 1:4). Z metodo po Lowry-ju smo določili tudi celokupno količino proteinov v celičnih lizatih in količino CC (v ng CC) navajali na mg celokupnih proteinov.

Celice PC12 so se pred samo izpostavljivo A $\beta$  (25-35) 24 ur priraščale na podlago iz kolagena, kjer so se že delno diferencirale v nevronski fenotip.

V šestih neodvisnih poskusih smo dokazali, da se celice PC12 ob prisotnosti fibril A $\beta$  (25-35), odzovejo s povečanim izražanjem gena za CC. Do porasta CC pride že znotraj prvih 12 ur po izpostavitvi in sicer na 177 % glede na ne-izpostavljenе celice PC12. V nadaljnjih časovnih obdobjih pa se vrednost CC počasi zmanjšuje in po 72 urah pada pod vrednostjo pri kontroli (91 %).

Celice PC12 so se izkazale za primeren model za nadaljnje študije izražanja gena za CC v prisotnosti A $\beta$  (25-35), s končnim ciljem razviti nove terapevtske pristope pri zdravljenju Alzheimerjeve bolezni, preko zaščitne vloge CC.

## 6. LITERATURA

1. Pirtošek Z. Socialno ekonomsko breme Alzheimerjeve bolezni. Farm Vestn 2013;64(3):208-10.
2. Pirkmajer S. Patološka fiziologija : učbenik za študente farmacije / [urednik Sergej Pirkmajer]. 1. Let. 2015. Ljubljana: Ljubljana : Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2015 ([Ljubljana] : Littera picta); 269-273 str.
3. Dementia statistics. Alzheimer's Disease International. Dostopno na: <https://www.alz.co.uk/research/statistics> (datum zadnjega dostopa: 19.8.2017).
4. Emeršič A, Pirtošek Z, Štrukelj B. Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni. Farm Vestn 2013;64(3):202-7.
5. Alzheimer's & Brain Research Milestones. Research Center. Alzheimer's Association. Dostopno na: [http://www.alz.org/research/science/major\\_milestones\\_in\\_alzheimers.asp](http://www.alz.org/research/science/major_milestones_in_alzheimers.asp) (datum zadnjega dostopa: 19.8.2017).
6. Hippius H, Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease. Dialogues Clin Neurosci 2003;5(1):101–8.
7. Klarendić M, Stokin GB. Smernice zdravljenja z zdravili za Alzheimerjevo bolezen. Farm Vestn 2015;66:3–8.
8. Kogoj A. Etiologija Alzheimerjeve bolezni in drugih najpogostejših demenc. Farm Vestn 2008;59:55-8.
9. Emeršič A, Pirtošek Z. Nastanek, razvoj in diagnostika Alzheimerjeve bolezni. Farm Vestn 2013;64(3):191-201.
10. The progression of Alzheimer's disease and other dementias – Factsheet 458, April 2015. Dostopno na: [https://www.alzheimers.org.uk/download/downloads/id/1772/factsheet\\_the\\_progression\\_of\\_alzheimers\\_disease\\_and\\_other\\_dementias.pdf](https://www.alzheimers.org.uk/download/downloads/id/1772/factsheet_the_progression_of_alzheimers_disease_and_other_dementias.pdf) (datum zadnjega dostopa: 24.8.2017).
11. World Alzheimer Report 2016. Alzheimer's Disease International. Dostopno na: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016> (datum zadnjega dostopa: 19.8.2017).
12. Mathews PM, Levy E. Cystatin C in aging and in Alzheimer's disease. Ageing Res Rev 2016;32:38–50.
13. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2(5):a006270.

14. Tizon B, Ribe EM, Mi W, Troy CM, Levy E. Cystatin C protects neuronal cells from amyloid-beta-induced toxicity. *J Alzheimers Dis* 2010;19(3):885–94.
15. Demuro A, Mina E, Kayed R, Milton SC, Parker I, Glabe CG. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 2005; 280:17294–17300.
16. Pimplikar SW. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(6):1261–8.
17. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of neurology* 1991;30:572–580.
18. Lesne S, Kotilinek L, Ashe KH. Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function. *Neuroscience* 2008;151:745–749.
19. Kayed R, Lasagna-Reeves CA. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis* 2013;33 Suppl 1:S67-78.
20. Millucci L, Ghezzi L, Bernardini G, Santucci A. Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr Protein Pept Sci* 2010;11(1):54–67.
21. Ghidoni R, Paterlini A, Albertini V, Glionna M, Monti E, Schiaffonati L, et al. Cystatin C is released in association with exosomes: a new tool of neuronal communication which is unbalanced in Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 2011;32(8):1435–42.
22. Levy E, Jaskolski M, Grubb A. The role of cystatin C in cerebral amyloid angiopathy and stroke: cell biology and animal models. *Brain Pathol* 2006; 16:60–70.
23. Nishiyama K, Konishi A, Nishio C, Araki-Yoshida K, Hatanaka H, Kojima M, et al. Expression of cystatin C prevents oxidative stress-induced death in PC12 cells. *Brain Res Bull* 2005;67(1–2):94–9.
24. Wang X-F, Liu D-X, Liang Y, Xing L-L, Zhao W-H, Qin X-X, et al. Cystatin C Shifts APP Processing from Amyloid- $\beta$  Production towards Non-Amyloidogenic Pathway in Brain Endothelial Cells. *PLoS ONE* 2016;11(8):e0161093.
25. Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 2016;32:22–37.
26. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, et al. Extensive

- involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64(2):113–22.
27. Mi W, Pawlik M, Sastre M, Jung SS, Radvinsky DS, Klein AM, et al. Cystatin C inhibits amyloid-beta deposition in Alzheimer's disease mouse models. *Nat Genet* 2007;39(12):1440–2.
28. Wu Z, Sun L, Hashioka S, Yu S, Schwab C, Okada R, et al. Differential pathways for interleukin-1 $\beta$  production activated by chromogranin A and amyloid  $\beta$  in microglia. *Neurobiol Aging* 2013;34(12):2715–25.
29. Pišlar AH, Kos J. C-terminal peptide of  $\gamma$ -enolase impairs amyloid- $\beta$ -induced apoptosis through p75(NTR) signaling. *Neuromolecular Med* 2013;15(3):623–35.
30. PC-12 ATCC ® CRL-1721TM Rattus norvegicus adrenal gland pheochromocytoma. Dostopno na: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1721.aspx?geo\\_country=si#generalinformation](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1721.aspx?geo_country=si#generalinformation) (datum zadnjega dostopa: 22.8.2017).
31. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. V: Immunology. 5. izd. New York: W. H. Freeman; 2003; 148–50 str.

## 6.1. VIRI SLIKOVNEGA GRADIVA

Slike so last diplomanta, z izjemo slik, ki so citirane v nadaljevanju.

**Slika 1:** Nelson TJ. What Causes Alzheimer's Disease? Science notes. (Slika PNG, 450 × 178 pik). Dostopno na: <http://www.randombio.com/alz.html> (datum zadnjega dostopa: 21.8.2017).

**Slika 2:** Carulla N. IRB Barcelona. (Slika JPEG, 945 × 311 pik). Dostopno na: <https://www.irbbarcelona.org/es/news/un-estudio-del-irb-barcelona-contradice-una-premisa-cientifica-sobre-la-beta-amiloide-proteina> (datum zadnjega dostopa: 21.8.2017).

**Slika 3:** Crystal structure of monomeric human cystatin C stabilized against aggregation. RCSB PDB - NGL Viewer for 3GAX. Dostopno na: <https://www.rcsb.org/pdb/ngl/ngl.do?pdbid=3GAX&bionumber=1> (datum zadnjega dostopa: 21.8.2017).