## UNIVERZA V LJUBLJANI

# FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA HRASTAR

# MEHANIZEM DELOVANJA KATEPSINA X V PROCESU NEVRITOGENEZE

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

## UNIVERZA V LJUBLJANI

# FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA HRASTAR

# MEHANIZEM DELOVANJA KATEPSINA X V PROCESU NEVRITOGENEZE THE MECHANISM OF CATHEPSIN X INVOLVEMENT IN NEURITE OUTGROWTH

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Anje Pišlar, mag. farm. Eksperimentalno delo sem opravljala v laboratorijih na Katedri za farmacevtsko biologijo. Konfokalno mikroskopijo sem opravljala na Inštitutu Jožef Stefan.

#### ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Anji Pišlar, mag. farm. za ves trud, vedno nudeno strokovno pomoč in pozitivno naravnanost pri delu v laboratoriju ter za skrbnost in potrpežljivost pri izdelavi magistrske naloge. Hvala tudi za vso prijaznost in številne spodbudne besede.

Najlepša hvala predsedniku komisije prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. in članu komisije asist. dr. Zoranu Lavriču, mag. farm. za pregled magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi mojim puncam, Katji, Simoni, Luciji, Jerneji, Tini, Ines in Nini Evelini za prijateljstvo, podporo in vsa lepo preživeta študentska leta.

Iskrena hvala Alešu, sestri Barbari, bratu Nejcu, Heleni, Bojanu in starim staršem za vso podporo in spodbudne besede. Hvala, ker ste vedno verjeli vame.

Posebna zahvala pa gre mojim staršem, ki so me skozi celoten študij podpirali in mi stali ob strani. Iskrena hvala za vso potrpežljivost, razumevanje in ljubezen.

#### IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Anje Pišlar, mag. farm. Naloga je del programa Farmacevtska biotehnologija: znanost za zdravje, pod vodstvom prof. dr. Janka Kosa, dipl. biokem.

Janja Hrastar

# **KAZALO VSEBINE**

KAZALO V	/SEBINE	i
KAZALO S	LIK	iii
KAZALO P	REGLEDNIC	iv
KAZALO E	NAČB	iv
POVZETEK	ζ	v
ABSTRAC	Γ	vi
KLJUČNE I	BESEDE	vii
SEZNAM C	DKRAJŠAV	viii
OZNAKE A	MINOKISLIN	x
1 UVOD		1
1.1 NE	EVROTROFIČNI DEJAVNIKI	2
1.1.1	Signalne poti	2
1.1.2	Retrogradni transport	4
1.1.3	γ-Enolaza	6
1.2 CIS	STEINSKI KATEPSINI	7
1.2.1	Katepsin X	7
1.2.2	Katepsin X in diferenciacija celic	9
1.2.3	Katepsin X in nevrodegenerativni procesi	
2 NAME	N DELA	
3 MATE	RIALI IN METODE	
3.1 MA	ATERIALI	
3.1.1	Reagenti	
3.1.2	Standardi	14
3.1.3	Protitelesa	14
3.1.4	Laboratorijska oprema	
3.1.5	Gojišča	17
3.1.6	Pufri in raztopine	
3.1.7	Delo s celicami	
3.2 MI	ETODE	
3.2.1	Vrednotenje celičnega preživetja s testom MTS	
3.2.2	Določanje aktivnosti katepsina X	
3.2.3	Encimsko imunski test na trdni podlagi (ELISA)	

	3.2.4	Vrednotenje rasti nevritov celic PC12
	3.2.5	Konfokalna mikroskopija
	3.2.6 (NaDS I	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata PAGE)
	3.2.7	Pretočna citometrija
	3.2.8	Statistično vrednotenje rezultatov
4	REZUL	TATI
	4.1 VR NEVRITO	EDNOTENJE CELIČNEGA MODELA ZA PROUČEVANJE OGENEZE
	4.1.1	Vpliv NGF na preživetje celic PC12
	4.1.2	Vpliv NGF na izraščanje nevritov celic PC12
	4.1.3	Vpliv NGF na polimerizacijo aktinskih filamentov celic PC12
	4.2 VP	LIV NGF NA IZRAŽANJE IN LOKALIZACIJO KATEPSINA X
	4.2.1	Nivo izražanja in aktivnost katepsina X v diferenciranih celicah PC12 39
	4.2.2	Lokalizacija katepsina X v diferenciranih celicah PC12
	4.2.3	Vpliv NGF na vezikularni transport katepsina X v celicah PC1242
	4.3 VP AKTIVNO	LIV ZAVIRANJA NGF-POSREDOVANIH SIGNALNIH POTI NA OST KATEPSINA X
	4.4 VP DELOVA	LIV REKOMBINATNEGA KATEPSINA X NA NEVROTROFIČNO NJE NGF
	4.4.1	Vpliv NGF na rast nevritov ob prisotnosti rekombinantnega katepsina X 46
	4.4.2 rekombi	Vpliv NGF-posredovane aktivacije signalnih poti ob prisotnosti nantnega katepsina X
	4.5 VP UČINKE,	LIV POVEČANEGA IZRAŽANJA KATEPSINA X NA NEVROTROFIČNE POSREDOVANE Z NGF49
	4.5.1	Vpliv nadizraženega katepsina X na rast nevritov, posredovano z NGF 49
	4.5.2 poti	Vpliv nadizraženega katepsina X na NGF-posredovano aktivacijo signalnih 51
5	RAZPR	AVA
6	SKLEP.	
7	LITERA	ATURA

# KAZALO SLIK

Slika 1.1: Shematski prikaz celic v CŽS1
Slika 1.2: Shematski prikaz z NGF-spodbujenih signalnih poti, in sicer MAPK, PI3K in
ROCK signalne poti
Slika 1.3: Shematski prikaz retrogradnega transporta in udeleženih signalnih poti
Slika 1.4: Shematska predstavitev katepsina X in prikaz mini zanke, označena s črno
puščico
Slika 3.1: Prikaz morfologije suspenzijskih celic PC12. Leva slika prikazuje nizko gostoto
celic PC12, desna slika pa prikazuje visoko gostoto celic PC12
Slika 3.2: Strukturna formula tetrazolijeve spojine MTS in njenega formazanskega produkta.
Slika 3.3: Shematski prikaz poteka direktnega ELISA testa
Slika 3.4: Shematski prikaz konfokalnega mikroskopa
Slika 3.5: Levo je prikaz aparature za NaDS PAGE, desno pa potovanje molekul v
diskontinuiranem sistemu
Slika 3.6: Shematski prikaz hitrega prenosa (iBlot)
Slika 3.7: Shema strukture pretočnega citometra
Slika 4.1: Celično preživetje celic PC12 po stimulaciji z NGF
Slika 4.2: Rast nevritov po stimulaciji celic PC12 z NGF
Slika 4.3: Relativna polimerizacija F-aktina v celicah PC12 po stimulaciji z NGF
Slika 4.4: Polimerizacija aktinskih filamentov v izrastkih celic PC12 po stimulaciji z NGF.
Slika 4.5: Nivo izražanja katepsina X v celicah PC12 po stimulaciji z NGF
Slika 4.6: Aktivnost katepsina X v celicah PC12 po stimulaciji z NGF
Slika 4.7: Površinsko izražanje katepsina X na membrani celic PC12 po stimulaciji z NGF.
Slika 4.8: Lokalizacija katepsina X v lizosomih, zgodnjih endosomih in pozih endosomih v
celicah PC12 po stimulaciji z NGF
Slika 4.9: Aktivnost katepsina X v prisotnosti zaviralcev signalnih kinaz po stimulaciji celic
PC12 z NGF
Slika 4.10: Aktivnost katepsina X v prisotnosti zaviralcev Y27632 in GGTI-298 po
stimulaciji celic PC12 z NGF

Slika 4.11: Vpliv katepsina X na polimerizacijo aktinskih filamentov v izrastkih celic PC12
po stimulaciji z NGF
Slika 4.12: Vpliv katepsina X na fosforilacijo ERK1/2 in Akt v celicah PC12 po stimulaciji
z NGF
Slika 4.13: Rast nevritov celic PC12 z nadizraženim katepsinom X po stimulaciji z NGF.
Slika 4.14: Polimerizacija aktina celic PC12 z nadizraženim katepsinom X po stimulaciji z
NGF
Slika 4.15: Aktivacija kinaz ERK1/2 in Akt v celicah PC12 z nadizraženim katepsinom X
po stimulaciji z NGF

# **KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica I: Seznam uporabljenih reagentov in topil z navedenim proizvajalcem
Preglednica II: Seznam uporabljenih zaviralcev s tarčami in z navedenimi proizvajalci 14
Preglednica III: Seznam uporabljenih standardov z navedenim proizvajalcem14
Preglednica IV: Seznam uporabljenih primarnih in sekundarnih protiteles z navedenim
proizvajalcem14
Preglednica V: Seznam laboratorijske opreme z navedenim proizvajalcem16
Preglednica VI: Sestava gelov za izvedbo NaDS PAGE

# KAZALO ENAČB

enačba 1	21
enačba 2	22

# POVZETEK

Katepsin X je cisteinska proteaza, ki cepi C-terminalni dipeptid γ-enolaze in tako onemogoči njeno nevrotrofično delovanje. Na ta način v nevronskih celicah posredno zmanjšuje nevritogenezo, ki je ključni dogodek pri regeneraciji poškodovanih nevronov. Kljub temu pa ostaja natančen mehanizem delovanja katepsina X v procesu nevritogeneze in celičnega preživetja nepojasnjen. V sklopu magistrske naloge smo z eksperimentalnim delom na celicah PC12 ovrednotili vlogo in mehanizem delovanja katepsina X v procesu nevritogeneze, t. i. procesu rasti nevritov. Najprej smo pokazali, da stimulacija celic PC12 z nevrotrofičnim dejavnikom NGF poveča celično preživetje, izraščanje nevritov in polimerizacijo F-aktina, kar vpliva na reorganizacijo aktinskega citoskeleta, ki je nujna za nadaljnjo diferenciacijo celic. V nadaljevanju smo dokazali, da stimulacija celic z NGF vpliva na nivo izražanja in aktivnost ter lokalizacijo katepsina X v stimuliranih celicah PC12. Na podlagi pridobljenih slik s konfokalnim mikroskopom smo ugotovili, da se katepsin X z vezikularnim transportom prenese v območje rasti nevritov, in sicer vezikularno, v obliki zgodnjih in poznih endosomov. Hkrati smo dokazali, da zavrtje NGF-posredovanih signalnih poti vpliva na zmanjšano aktivnost katepsina X v celicah PC12, stimuliranih z NGF. V nadaljevanju smo z vrednotenjem morfologije celic PC12 ugotovili, da se polimerizacija aktinskih filamentov in posledično nevritogeneza v diferenciranih celicah PC12 ob dodatku rekombinantnega katepsina X zmanjša. Dokazali smo tudi da, rekombinantni katepsin X zmanjša nevrotrofično delovanje NGF, in sicer preko zaviranja fosforilacije kinaz ERK1/2 in Akt. Proučevali smo tudi celice PC12 z nadizraženim katepsinom X, ki smo jih stimulirali z nevrotrofičnim dejavnikom NGF. Dokazali smo, da je nadizraženi katepsin X odgovoren za zmanjšanje nevrotrofičnega delovanja NGF, in sicer smo opazili zmanjšano polimerizacijo F-aktina in rast nevritov celic PC12. Ugotovili smo tudi, da nadizraženi katepsin X v celicah PC12 zavre z NGF-povzročeno fosforilacijo kinaz ERK1/2 in Akt, ključnih kinaz v procesu nevritogeneze. Rezultati magistrske naloge nakazujejo, da je katepsin X pomemben dejavnik pri uravnavanju procesa nevritogeneze in zato primerna tarča pri načrtovanju učinkovin, ki bi spodbudile regeneracijo poškodovanih nevronov.

#### ABSTRACT

Cathepsin X is a cysteine protease that sequentially cleaves C-terminal dipeptide of gammaenolase and therefore abolishes its neurotrophic activity. In this way cathepsin X indirectly reduces neuritogenesis in neuronal cells, which is a key event in the regeneration of damaged neurons. However, the exact mechanism of cathepsin X in neuritogenesis and cell survival is still unknown. In our experimental work on PC12 cells we have evaluated the role and mechanism of cathepsin X in neuritogenesis, i.e. neurite outgrowth process. First we have shown that neurotrophic stimulation of PC12 cells by NGF promotes neurite outgrowth, increases cell survival and polymerization of F-actin, which results in reorganization of actin cytoskeleton, which is necessary for further cell differentiation. We have further demonstrated that cell stimulation with NGF affects the level of expression, activity and localization of cathepsin X in stimulated PC12 cells. On the basis of images from confocal microscopy, we have found that cathepsin X is translocated to growing cones of neurite extensions through vesicular trafficking, namely vesicular, in the form of early and late endosomes. At the same time, we have proved that the inhibition of NGF-mediated signaling pathways has an effect on the decreased activity of cathepsin X in NGF-stimulated PC12 cells. With the evaluation of the morphology of PC12 cells, we have found that the polymerization of actin filaments and consequently neuritogenesis in the stimulated PC12 cells is reduced by the addition of recombinant cathepsin X. We have also proved that recombinant cathepsin X reduces the neurotrophic action of NGF by inhibiting the phosphorylation of ERK1/2 and Akt kinases. Further, we have examined PC12 cells with an over-expressed cathepsin X, which were stimulated by neurotrophic factor NGF. We have proved that overexpressed cathepsin X is responsible for the decrease in neurotrophic activity of NGF, as observed by the reduced polymerization of F-actin and the growth of neurites in PC12 cells. It has also been found that over-expressed cathepsin X in PC12 cells inhibits NGF-induced phosphorylation of ERK1/2 and Akt kinases, which play a key role in neuritogenesis. In conclusion, based on these results we suggest that cathepsin X is an important factor in regulating neuritogenesis and therefore a suitable target in developing new substances that would stimulate the regeneration of damaged neurons.

# KLJUČNE BESEDE

Živčni rastni dejavnik	»ang. Nerve growth factor«
Nevritogeneza	»ang. Neuritogenesis«
Katepsin X	»ang. Cathepsin X«
Signalne poti	»ang. Signalling pathways«
Vezikularno razmeščanje	»ang. Vesicular trafficking«

# SEZNAM OKRAJŠAV

ure tislina est na
ure cislina est na
ure kislina est na
ure cislina est na
ure cislina est na
cislina est na
kislina est na
cislina est na
cislina est na
est na
est na
im
nolekula
ovezani
ocita

МАРК	»ang. mitogen-activated protein kinase«, z mitogenom aktivirana
	proteinska kinaza
MEK	»ang. mitogen-activated protein kinase kinase«, z mitogenom aktivirana
	kinaza kinaza
MTS	»ang. (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-
	sulfophenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium)«, 3-(4,5-dimetiltiazol-il)-5-(3-
	karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
m/v	masno-volumski
NaDS	»ang. sodium lauryl sulfate«, natrijev dodecil sulfat
NaN <sub>3</sub>	»ang. sodium azide«, natrijev azid
NGF	»ang. nerve growth factor«, živčni rastni dejavnik
PAGE	»ang. polyacrylamide gel electrophoresis«, poliakrilamidna gelska
	elektroforeza
PBS	»ang. phosphate buffered saline«, fosfatni pufer z NaCl
PI3K	»ang. phosphatidilinozitol-3-kinase«, fosfatidilinozitol-3-kinaza
Rap1	»ang. Ras-related protein 1«, z Ras povezan protein 1
ROCK	»ang. Rho-associated protein kinase«, z Rho povezana protein kinaza
TBS	»ang. Tris-buffered saline«, Tris pufer z NaCl
TEMED	»ang. tetramethylethylenediamine«, tetrametiletilendiamin
TMB	»ang. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine«, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TrkA	»ang. tyrosine-kinase receptor A«, tirozin-kinazni receptor A
Tris	»ang. tris(hydroxymethyl)aminomethane«, tris(hidroksimetil)aminometan
TTBS	»ang. Tris-buffered saline, 0,1% Tween 20», Tris pufer z dodanim 0,1 %
	Tween 20

# **OZNAKE AMINOKISLIN**

Arg	R	arginin
Asp	D	asparaginska kislina
Cys	С	cistein
Gln	Q	glutamin
Glu	E	glutaminska kislina
Gly	G	glicin
His	Н	histidin
Ile	Ι	izolevcin
Lys	Κ	lizin
Phe	F	fenilalanin
Pro	Р	prolin

# 1 UVOD

Nevron ali živčna celica je osnovni gradnik živčevja. Rast nevrona je kompleksen proces, pri katerem se iz nevrita razvije dolg in ozek akson, ki posreduje signale ter več kratkih dendritov, ki sprejemajo te signale. Takšna morfologija nevronu omogoča natančno oblikovanje visoko specifičnih stikov in povezovanje z drugimi nevroni. To je ključnega pomena za pravilno in ustrezno delovanje centralnega živčnega sistema (CŽS) (1).

Poleg nevronov so v človeških možganih prisotne tudi glija celice, ki predstavljajo najštevilčnejše celice v možganih in so sestavljene iz oligodendrocitov, astrocitov in mikroglije (Slika 1.1). Pri nevrodegenerativnih boleznih in posledično poškodovanih nevronskih celicah se oblika in količina astrocitov ter mikroglije močno spremeni. Zanje je značilna nevrodestruktivna vloga, saj sproščajo vnetne citokine in proste radikale ter hkrati nevroprotektivna vloga, saj sproščajo antioksidante in nevrotrofične dejavnike (2, 3).



Slika 1.1: Shematski prikaz celic v CŽS (4).

Nevrotrofični dejavniki so v procesu nevritogeneze ključni, saj nudijo trofično podporo nevronskim celicam (5). Zavirajo apoptotične procese in spodbujajo izražanje genov, ključnih za preživetje, zato so zelo pomembni pri nevrodegenerativnih boleznih, saj delujejo nevroprotektivno (6, 7). Tekom razvoja nastaja prekomerno število nevronov, zato so slednji primorani tekmovati za omejene količine nevrotrofičnih dejavnikov. Nevroni, ki dobijo zadostno količino nevrotrofičnih dejavnikov preživijo, drugi pa v procesu programirane

celične smrti umrejo (6). Na ta način se uravnava število nevronov in nevronskih povezav v razvijajočem se CŽS (7).

## 1.1 NEVROTROFIČNI DEJAVNIKI

Nevrotrofični dejavniki so molekule, ki so odgovorne za rast in regeneracijo nevronov, ter diferenciacijo in preživetje celic, poleg tega pa pomagajo tudi pri vzpostavitvi sinaptičnih povezav, ki so nujno potrebne za normalno delovanje nevronskih celic (8). V razvoju živčnega sistema sta ključnega pomena regeneracija poškodovanih in uničenih nevronskih celic ter diferenciacija nevronov. Temeljna morfološka značilnost slednje je začetno brstenje nevritov, ki mu sledi podaljševanje aksonov in razrast dendritov. Poleg tvorjenja stikov med nevronskimi celicami, so z nevrotrofičnimi dejavniki spodbujene tudi številne znotrajcelične signalne poti, kar se odraža v reorganizaciji citoskeleta in formaciji nevritov. Aktivacija signalnih procesov je nepogrešljiva, vendar ni dovolj za to, da povzroči rast nevritov, t. i. nevritogenezo (9). Proces tvorbe in rasti nevritov je večinoma uravnavan z nevrotrofičnimi dejavniki. Mednje uvrščamo živčni rastni dejavnik (NGF), nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (BDNF), nevrotrofin 3 (NT 3) in nevrotrofin 4 (NT 4) (10). Ti se vežejo na specifične receptorje družine tirozin-kinaznih receptorjev (TrkA, TrkB, TrkC), ki se nahajajo na distalnih aksonih nevronov ter jih z vezavo aktivirajo (11). NGF je specifičen ligand za receptor TrkA, ki je transmembranski protein s tirozin-kinazno aktivnostjo in ima dve vezavni mesti; eno je nespecifično, drugo pa specifično za interakcijo z NGF. Po vezavi NGF na receptor TrkA, pride do dimerizacije samega receptorja ter do fosforilacije znotrajceličnih tirozinskih ostankov receptorja in posledične aktivacije bližnjih kinaz, ki sprožijo nadaljno aktivacijo signalne kaskade (12).

## 1.1.1 Signalne poti

Najpomembnejši signalni poti pri izkazovanju nevrotrofičnih učinkov, sproženi z vezavo NGF na receptor, sta z mitogenom aktivirana kinazna pot (MAPK) in fosfatidilinozitol-3-kinazna pot (PI3K) (12), za izkazovanje nevritogenih učinkov pa je pomembna tudi signalna pot RhoA/ROCK (Slika 1.2).

Signalna pot MAPK je ključna za diferenciacijo in rast aksonov, uravnava pa tudi celično proliferacijo in apoptozo (8). Aktivacija omenjene signalne poti se začne z vezavo NGF na receptor TrkA. Na ta receptor se nato veže adapterski protein SHC, kar privede do

fosforilacije tirozina v SHC in posledično vezave z receptorjem-rastnega dejavnikapovezanega proteina 2 (GRB2). Nadalje pride do aktivacije SOS in posledično do aktivacije Ras (13). Omenjena aktivacija privede do fosforilacije in aktivacije kinaze Raf (Raf-1, B-Raf) (14). Slednja nato fosforilira in aktivira z mitogenom aktivirano kinazo kinazo (MEK), ki nadalje fosforilira in aktivira z zunajceličnim signalom regulirano proteinsko kinazo (ERK) (8). To pa preko aktivacije transkripcijskih faktorjev vodi do spodbujene tvorbe in rasti nevritov, diferenciacije in preživetja nevronov (15).

Druga, z NGF-spodbujena signalna pot, je signalna pot PI3K, ki je prav tako ključna za preživetje in diferenciacijo nevronskih celic, rast distalnih aksonov ter nevritogenezo (8). Tudi aktivacija te signalne poti se začne z vezavo NGF na receptor TrkA, kar povzroči, da se PI3K veže s fosforiliranimi tirozinskimi ostanki. PI3K najprej pretvori lipidni prenašalec fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>) v fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP<sub>3</sub>) (16). Na PIP<sub>3</sub> se veže serin/treonin kinaza (Akt), ki se nato iz citoplazme transportira k plazemski membrani, kjer se aktivira. Akt je ključna pri aktivaciji signalne poti PI3K, saj preko zaviranja pro-apoptotičnih proteinov omogoča preživetje celic (15). Kinaza PI3K hkrati uravnava tudi signalno pot ROCK, ki je ključna za reorganizacijo aktinskega citoskeleta in rast nevritov (17).

NGF uravnava torej tudi signalno pot RhoA/ROCK, ki je pomemben regulator procesa nevritogeneze. RhoA, ki spada v družino Rho GTP-az, uravnava številne celične procese, kot so celična proliferacija, diferenciacija, migracija, transkripcija ter organizacija aktinskih filamentov, in je negativni regulator rasti nevritov oz. nevritogeneze (14). Aktivacija kinaze RhoA in navzdoljne efektorske kinaze, z Rho povezane protein kinaze (ROCK) zavira podaljševanje nevritov in rast aksonov ter negativno uravnava polimerizacijo aktina, ki je eden izmed zgodnjih dogodkov v procesu nevritogeneze (8). Obstajata dve izoobliki kinaze ROCK, in sicer ROCK1, ki je večinoma izražena v ne-nevronskih tkivih in ROCK2, ki je močno izražena v možganih, njeno izražanje pa se s starostjo povečuje. ROCK2 ima glavno vlogo v uravnavanju preživetja nevronov, stabilnosti in regeneraciji aksonov (18). Aktivacija signalne poti RhoA/ROCK se začne z vezavo NGF na receptor TrkA, kar sproži aktivacijo proteina Rap1, ki povzroči povečano izražanje od Rap1-odvisnega RhoGAP proteina (ARAP3). To privede do inaktivacije kinaze RhoA in njenega prenosa s plazemske membrane v citosol ter posledično nezmožnostjo aktivacije kinaze ROCK in zavrtja nevritogeneze (14).



Slika 1.2: Shematski prikaz z NGF-spodbujenih signalnih poti, in sicer MAPK, PI3K in ROCK signalne poti (19).

#### 1.1.2 Retrogradni transport

Receptorji nevrotrofičnih dejavnikov niso prisotni samo na površini membrane celice, ampak tudi v signalnih endosomih, ki so prav tako ključnega pomena pri signalni kaskadi, ki vodi do nevrotrofičnega delovanja (11). Nevrotrofični dejavniki in njihovi receptorji se v obliki zgodnjih endosomov retrogradno prenesejo od distalnih aksonov proti somi in v nekaterih primerih celo do dendritov, kjer pomembno vplivajo na rast, preživetje, diferenciacijo nevronskih celic ter na nastanek in izoblikovanje sinaps (6).

Po vezavi NGF na receptor TrkA, pride do avtofosforilacije receptorja in nadaljnje internalizacije v distalnih aksonih, kar je nujno potrebno za retrogradno signaliziranje (Slika 1.3). Z receptorjem uravnavana internalizacija je lahko klatrinsko odvisna ali pa klatrinsko neodvisna. Internalizacija, uravnavana z receptorjem TrkA, poteka preko obeh omenjenih mehanizmov. V primeru klatrinsko odvisne internalizacije NGF povzroči premik klatrinskih težkih verig k plazemski membrani in tako spodbudi nastanek proteinskih kompleksov, imenovanih tudi klatrinski vezikli. Ena izmed klatrinsko neodvisnih internalizacij je

makropinocitoza, za katero je značilno intenzivno izvihavanje plazemske membrane ter nastanek multivezikularnih telesc, imenovanih makropinosomi (6). Klatrinski vezikli in makropinosomi se najprej transportirajo v bližino zgodnjih endosomov, ter se nato z njimi zlijejo (20). Na tako novo nastale endosome se veže z Ras-povezani C3 botulinusni toksin substrat 1 (Rac1), ki se nato aktivira in v prisotnosti kofilina povzroči depolimerizacijo aktina, ter na ta način endosomom olajša prehod skozi aktinski citoskelet. Hkrati poteka tudi zorenje endosomov. Za posamezno fazo zorenja endosomov je značilna prisotnost določenih GTP-az iz Rab družine, na primer Rab5, ki je značilni kazalec zgodnjih endosomov in Rab7, ki je značilni kazalec poznih endosomov in lizosomov. Nadalje se endosomi, s pomočjo retrogradnega motornega proteina dineina vežejo na mikrotubule in se retrogradno transportirajo proti negativnemu koncu mikrotubulov, torej proti somi celice (6). Tu je Rab7 ključen, saj nadzira funkcijo dineina, uravnava transport tako zgodnjih kot tudi poznih endosomov, poleg tega pa tvori interakcije s TrkA (11). Sočasno s transportiranjem endosomov proti somi celice, se aktivirajo zgoraj omenjene signalne poti, med katerimi sta najpomembnejši PI3K in MAPK. Ko signalni endosomi prispejo v somo celice, sprožijo fosforilacijo in posledično aktivacijo raznih transkripcijskih dejavnikov, ki nadalje uravnavajo celično preživetje, nevritogenezo in diferenciacijo celic (6).

Življenjski cikel endosomov se konča z zlitjem z lizosomi in končno razgradnjo. Za nahajanje lizosomov v celicah je ključna signalna pot RhoA/ROCK, ki uravnava membranski transport lizosomov, ROCK pa povzroči disperzijo lizosomalnih veziklov v citoplazmi (21). Lizosomi, ki se disperzirajo proti celični periferiji, ohranjajo kislost in niso kolokalizirani z zgodnjimi endosomi, v njih pa se nahajajo razne proteaze, ki so poleg nevrotrofičnih dejavnikov prav tako udeležene pri uravnavanju rasti nevritov in diferenciacije (22).

5



Slika 1.3: Shematski prikaz retrogradnega transporta in udeleženih signalnih poti (6).

#### 1.1.3 γ-Enolaza

Nevrotrofičnim dejavnikom podobno delovanje izkazuje tudi izoencim enolaze,  $\gamma$ -enolaza (23). Enolaza je citoplazemski encim, ki je vključen v metabolični proces glikolize in katalizira pretvorbo 2-fosfo-D-glicerata v fosfoenolpiruvat. Poleg encimskega delovanja enolazo označujejo kot večfunkcijski protein, ki se nahaja v različnih tkivih (24, 25). Izoencim  $\gamma\gamma$ , t. i. nevron specifična enolaza (NSE), se nahaja specifično le v nevronih in perifernih nevroendokrinih celicah ter možganskih tumorjih (23, 26). Pokazali so, da je  $\gamma$ -enolaza znantno prisotna le v diferenciranih in zrelih nevronih (20, 21), kjer izkazuje nevrotrofičnim dejavnikom podobno delovanje, saj poveča preživetje kortikalnih nevronov (23). Pri tem je ključnega pomena prenos  $\gamma$ -enolaze iz citosola do plazemske membrane z ogrodnim proteinom  $\gamma$ 1-sintropinom, kjer le-ta izkazuje nevrotrofično delovanje (5). Po prenosu do plazemske membrane  $\gamma$ -enolaza preko aktivacije dveh signalnih poti, PI3K in MAPK, vodi v uravnavano reorganizacijo aktinskega citoskeleta, s tem pa vpliva na razraščanje in podaljševanje nevritov ter tvorjenje povezav med njimi, kar vodi v povečano celično preživetje (8).

Nevrotrofično delovanje  $\gamma$ -enolaze je v nevronskih celicah uravnavano s katepsinom X, ki ga uvrščamo med cisteinske katepsine. Slednji s proteolitično cepitvijo zadnjih dveh aminokislin na C-terminalnem koncu  $\gamma$ -enolaze izniči njeno delovanje, saj je ohranjeni C-terminalni del proteina nujen za ohranitev nevrotrofične aktivnosti, posredovane z  $\gamma$ -enolazo (27). Hkrati pa je s cepitvijo dipeptida s katepsinom X moten tudi prenos  $\gamma$ -enolaze do plazemske membrane in s tem njeno nevrotrofično signaliziranje (5).

#### 1.2 CISTEINSKI KATEPSINI

Katepsine uvrščamo v skupino lizosomskih cisteinskih proteaz. Za njih je značilna ireverzibilna cepitev peptidnih vezi v polipeptidni verigi, in sicer preko nukleofilnega napada na karbonilno skupino v amidni vezi, pri čemer sta ključnega pomena aminokislini Cvs in His. Glede na mesto proteolitične cepitve delimo proteaze na eksopeptidaze, ki cepijo na N ali C koncu polipeptidne verige, in endopeptidaze, ki cepijo znotraj polipeptidne verige. Proteaze lahko delimo tudi glede na tip katalitičnega mehanizma, in sicer poznamo aspartatne, serinske, treoninske, metalo in cisteinske proteaze (28). Cisteinske proteaze spadajo v družino C1 papainu podobnih encimov, kamor uvrščamo 11 katepsinov (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W in X), ta pa je del klana CA cisteinskih proteaz (klasifikacija MEROPS). Nekateri izmed katepsinov so tkivno nespecifični in jih najdemo v vseh tkivih (B, C, H in L), medtem ko so drugi tkivno specifični in jih najdemo samo v specifičnih celicah (K, F, S, O, V, W in X) (28, 29). Cisteinski katepsini imajo poleg znotrajcelične in zunajcelične razgradnje proteinov v endosomih/lizosomih še številne druge vloge, in sicer sodelujejo pri zorenju hormonov, antigenski predstavitvi poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa-II, reorganizaciji citoskeleta in vezikularnem transportu, procesih diferenciacije, apoptozi ter resorpciji v kosteh (30). Pomembna je tudi njihova vloga v patofizioloških procesih, ki so prisotni pri mišični distrofiji, artritisu, raku, psoriazi, aterosklerozi, revmatoidnem artritisu, osteoporozi, akutnem pankreatitisu in nevrodegenerativnih boleznih (28, 30).

#### 1.2.1 Katepsin X

Katepsin X, imenovan tudi katepsin Z, P ali Y, je lizosomska cisteinska proteaza, ki se nahaja predvsem v celicah imunskega sistema in v skoraj vseh celicah CŽS, še posebej v celicah glije, v mikrogliji in astrocitih (30, 31). Katepsin X je protein, ki je sestavljen iz 303

aminokislinskih ostankov (30), gen za človeški katepsin X pa se nahaja na 20. kromosomu v regiji q13 (31). Kot ostali katepsini, se katepsin X najprej sintetizira v obliki neaktivnega pre-proencima, nato pa se tekom prenosa do endoplazemskega retikuluma pre-peptid odcepi. Iz nastalega pro-katepsina se s pomočjo številnih proteolitičnih procesov v lizosomih oblikuje zrel encim ter se nato ob pomoči kislih pogojev, ki vladajo v lizosomu tudi aktivira (32). Najbolj učinkovita pretvorba iz prokatepsina X v zrelo obliko pa poteče ob prisotnosti katepsina L (33).

Katepsin X je monomerni protein, ki je strukturno precej podoben ostalim cisteinskim katepsinom. Sestavljen iz dveh domen, med katerima je katalitični ostanek iz Cys na eni strani in His na drugi strani domene. Interakcija med domenama je tako hidrofilna kot hidrofobna in je specifična za posamezni katepsin (34). Leva domena je sestavljena iz treh  $\alpha$ -vijačnic, desna domena pa tvori  $\beta$ -sodček. Na vrhu se obe domeni ločita in ustvarita žep v obliki črke V (Slika 1.4). Novonastali žep je sestavljen iz Cys31 in His180, pri čemer vsak pride iz svoje domene (29).



Slika 1.4: Shematska predstavitev katepsina X in prikaz mini zanke, označena s črno puščico (29).

Poleg podobnosti z ostalimi katepsini, pa primarna struktura katepsina X vsebuje nekaj posebnosti. Prva posebnost katepsina X je kratka proregija, sestavljena le iz 38 aminokislin, vsebuje pa cisteinski ostanek Cys10p, ki igra pomembno vlogo v uravnavanju katalitične aktivnosti katepsina (30). Druga posebnost je peptidni vključek iz treh aminokislinskih ostankov (Ile24-Pro25-Gln26), ki se v visoko ohranjeni obliki nahaja med glutaminom (Gln22) oksianionske luknje in aktivne strani cisteina (Cys31). Omenjeni vključek se nahaja v zanki, ki ustreza aminokislinskima ostankoma His23-Try27 in se imenuje mini zanka, ter je prikazana na sliki 1.4 (29, 33). Ugotovili so, da je aminokislinski ostanek His23, ki se nahaja na mini zanki, vključen v prepoznavanje in povezovanje C-terminalnega dela karboksilne skupine vezavnega substrata. To je ključni mehanizem na podlagi katerega

lahko katepsin X izkazuje tako karboksimonopeptidazno kot tudi karboksidipeptidazno aktivnost (29).

Sprva so katepsinu X pripisovali le vlogo v lizosomski razgradnji proteinov, kasneje pa se je izkazalo, da je katepsin X zaradi zgoraj omenjenih značilnosti pomembno udeležen tudi v regulacijo številnih fizioloških in patoloških procesov. Katepsin X uravnava proliferacijo, zorenje, migracijo in adhezijo imunskih celic, prav tako pa je udeležen pri fagocitozi imunskih celic in pri prenosu signala (35). Povišane vrednosti katepsina X so zaznali tudi v tumorskih celicah, v celicah raka prostate in želodca ter v makrofagih želodčne sluznice, po okužbi s *Helicobacter Pylori* (36). V nevronskih celicah in celicah mikroglije katepsin X s proteolitično cepitvijo izniči nevrotrofično aktivnost  $\gamma$ -enolaze, hkrati pa uravnava procese, ki vodijo v nevrodegeneracijo (37).

#### 1.2.2 Katepsin X in diferenciacija celic

Katepsin X je udeležen v proces diferenciacije imunskih celic, kjer uravnava procese, kot so adhezija celic, reorganizacija citoskeleta, aktivacija T-limfocitov in fagocitoza preko interakcije z  $\beta_2$  integrini (36).

Katepsin X v svoji strukturi vsebuje zaporedja za prepoznavanje integrinov, in sicer so le-ti prisotni pri prokatepsinu X (Arg-Gly-Asp) in zrelem katepsinu X (Glu-Cys-Asp) ter so ključni za interakcijo z integrinskimi podenotami. Integrini spadajo v družino glikolitičnih heterodimernih transmembranskih receptorjev in so zgrajeni iz nekovalentno povezanih  $\alpha$  in  $\beta$  podenot. Imajo ključno vlogo v celični adheziji, saj predstavljajo celične receptorje in uravnavajo interakcije s komponentami zunajceličnega matriksa (36).

V povezavi s katepsinom X sta najpomembnejša dva  $\beta_2$ -integrinska receptorja, specifična za celice imunskega odziva, in sicer makrofagni antigen 1 (Mac-1) in s funkcijo limfocita povezani antigen 1 (LFA-1) (36). Katepsin X preko aktivacije receptorja Mac-1, ki se nahaja na makrofagih spodbuja adhezijo in fagocitozo ter zavira T-celično proliferacijo. Mac-1 se nahaja tudi na dendritičnih celicah, ki so pomembne antigen predstavitvene celice. Katepsin X aktivira receptor Mac-1 in tako pomembno sodeluje pri zorenju dendritičnih celic, ki je povezano s številnimi spremembami v morfologiji in strukturi citoskeleta. V procesu zorenja se dendritične celice adherirajo na zunajcelični matriks, postanejo polarizirane in tvorijo z aktinom bogate strukture, imenovane podosomi. Istočasno pa se katepsin X prenese proti

plazemski membrani zrelih dendritičnih celic, kjer aktivira Mac-1. Po končanem zorenju dendritičnih celic, se katepsin X sprosti z receptorja, ki preide v neaktivno stanje, zrele dendritične celice pa se odcepijo. Slednji rezultati umeščajo katepsin X med pomembne dejavnike uravnavanja zorenja in diferenciacije imunskih celic (35).

 $\beta_2$ -Integrinski receptorji zelo pomembno vplivajo tudi na funkcijo limfocitov T. LFA-1 je prevladujoči  $\beta_2$ -integrinski receptor v limfocitih T, ki vezan na medcelično adhezivno molekulo-1 (ICAM-1) uravnava migracijo limfocitov T in sodeluje v homotipski agregaciji celic. Katepsin X se skupaj z LFA-1 kolokalizira v uropodih (35), značilnih morfoloških in funkcionalnih izrastkih, ki se nahajajo na skrajnem koncu celice in imajo ključno vlogo pri migraciji limfocitov T (37). Tu katepsin X cepi aminokisline na C-terminalnem koncu  $\beta_2$ verige receptorja LFA-1, kar privede do nastanka visoko afinitetne konformacije receptorja in posledično njegove aktivacije ter vezave na ICAM-1 (36). Omenjena interakcija stabilizira uropode in omogoča njihovo podaljševanje, kar sčasoma privede do oblikovanja medceličnih povezav in nastanka nanocevk. Predpostavlja se, da so nanocevke povezane z aktivacijo limfocitov T, brez da bi prišlo do direktnega stika z antigen predstavitvenimi celicami (35). Hkrati je bilo pokazano, da katepsin X preko aktivacije  $\beta_2$ -integrina spodbuja polimerizacijo aktina in reorganizacijo aktinskega citoskeleta, kar vodi v nastanek nanocevk in omogočenega medceličnega komuniciranja (37).

#### 1.2.3 Katepsin X in nevrodegenerativni procesi

Katepsin X je v CŽS prisoten v nevronih, astrocitih, oligodendrocitih in ependimskih celicah, v največjem obsegu pa se izraža v celicah glije. Ima pomembno vlogo v procesu razvoja, plastičnosti in nevrodegeneraciji možganov (28). Katepsin X je pomemben dejavnik v degenerativnih procesih, ki so povezani z normalnim staranjem možganov in patološkimi stanji (38). Staranje možganov povezujemo s progresivnim upadom kognitivnih in spominskih funkcij, poleg tega pa se količina, izražanje in aktivnost katepsina X v možganih s starostjo povečuje (28). Predvsem slednje povečano izražanje in aktivnost katepsina X v možganskih celicah, ki so podvržene degeneraciji, nakazuje na pomembno vlogo katepsina X v nevrodegenerativnih procesih (38).

Povečano aktivnost katepsina X so opazili v degeneriranih področjih možganov transgenih miši z amiotrofično lateralno sklerozo in v okolici senilnih plakov pri pacientih z Alzheimerjevo boleznijo, pri čemer so proučevali predvsem vzorec izražanja in aktivnost katepsina X (38). Na mišjem modelu Alzheimerjeve bolezni so v okolici amiloidnih plakov na možganskih rezinah pokazali medsebojno interakcijo katepsina X in  $\gamma$ -enolaze ter hkrati pokazali, da katepsin X prepreči nevroprotektivno delovanje  $\gamma$ -enolaze napram toksičnemu delovanju peptida amiloid- $\beta$  (39). Na celičnem modelu Parkinsonove bolezni so v dopaminergičnih celicah, ki so bile izpostavljene 6-hidroksidopaminu, opazili spremembe v nivoju izražanja katepsina X kot tudi njegove aktivnosti in pokazali mehanizem delovanja katepsina X v nevrodegeneraciji (40). Katepsin X ima pomembno vlogo tudi pri aktivaciji mikroglije, ki spodbuja nevrodegeneracijo in tako prispeva k propadu nevronskih celic in nastanku nevrodegenerativnih bolezni (41).

Pri nevrodegeneraciji imajo pomembno vlogo tako nevrotrofični dejavniki, ki s svojim delovanjem omogočajo regeneracijo poškodovanih nevronov ter njihovih povezav, kot tudi proteaze, ki bodisi s svojim delovanjem preprečujejo tvorbo in rast nevritov ter njihovih povezav in diferenciacijo bodisi s spodbujanjem degenerativnih procesov pospešijo propad nevronov in s tem nastanek nevrodegenerativnih obolenj. Katepsin X ima pomembno vlogo pri uravnavanju diferenciacije imunskih kot tudi nevronskih celic, kljub temu pa ostajata vloga in natančen mehanizem delovanja katepsina X v procesu nevritogeneze nepojasnjena.

# 2 NAMEN DELA

Katepsin X je cisteinska proteaza, ki v nevronskih celicah posredno zmanjšuje rast nevritov in celično preživetje preko proteolitične cepitve C-terminalnega dipeptida γ-enolaze. Vključevanje katepsina X neposredno v samo signalno kaskado, ki vodi do tvorbe in rasti nevritov, pa ostaja nepojasnjeno.

Namen magistrske naloge je opredeliti vlogo in mehanizem delovanja katepsina X v nevritogenezi, t. i. procesu rasti nevritov, ključnemu dogodku pri regeneraciji poškodovanih nevronov. Na celičnem modelu nevronskih celic PC12 bomo najprej opredelili vpliv z NGF spodbujene diferenciacije celic na izražanje in aktivnost katepsina X ter njegovo lokalizacijo. Nato bomo z ustreznimi označevalci veziklov, lizosomov ter zgodnjih in poznih endosomov, proučevali vpliv NGF na vezikularni transport katepsina X. Hkrati bomo preverili vpliv zaviranja NGF-posredovanih signalnih poti na aktivnost katepsina X z uporabo specifičnih zaviralcev signalnih kinaz.

V nadaljevanju bomo proučili vpliv katepsina X na tvorbo in rast nevritov ter nadaljnjo diferenciacijo celic PC12, spodbujeno z NGF. Z določevanjem polimerizacije aktinskih filamentov bomo ovrednotili vpliv rekombinantnega katepsina X na tvorbo in rast nevritov. Vpliv slednjega bomo ovrednotili tudi na nevrotrofično signaliziranje v celicah PC12 po stimulaciji z NGF z določevanjem stopnje fosforilacije kinaz ERK1/2 in Akt. V zadnjem delu magistrske naloge pa bomo vpliv katepsina X na diferenciacijo celic PC12 potrdili z uporabo celic PC12 z nadizraženim katepsinom X. Z morfološkim opazovanjem tvorbe in rasti nevritov ter določevanjem polimerizacije aktinskih filamentov bomo ovrednotili vpliv nadizraženega katepsina X v celicah PC12 na izkazovanje nevritogenih učinkov dejavnika NGF. Vpliv nadizraženega katepsina X na nevrotrofično delovanje NGF bomo ovrednotili tudi z določevanjem stopnje fosforilacije kinaz ERK1/2 in Akt, aktiviranih po stimulaciji celic z NGF.

# **3** MATERIALI IN METODE

# 3.1 MATERIALI

## 3.1.1 Reagenti

Reagenti in topila (navedeni v Preglednici I) in zaviralci (navedeni v Preglednici II), ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge.

REAGENT	PROIZVAJALEC	REAGENT	PROIZVAJALEC
Advanced DMEM	Gibco	Metanol	Fluka
Akrilamid	Sigma-Aldrich	Mleko	Pomurske mlekarne
Amonijev persulfat	Sigma-Aldrich	MTS	Promega
Bromfenol modro	Merck	NaCl	Riedel-de Haën
1-butanol (izo- propanol)	Riedel-de Haën	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Fluka
$C_6H_8O_7 \ge 2H_2O$	Riedel-de Haën	NaDS	Sigma-Aldrich
DMSO	Gibco	NaHCO <sub>3</sub>	Riedel-de Haën
DTT	Sigma-Aldrich	NaHPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Riedel-de Haën
EDTA	Serva	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Riedel-de Haën
FBS	Gibco	NaN <sub>3</sub>	Merck
Formalin (10%)	Sigma-Aldrich	Nigrozin	Sigma-Aldrich
Glicerol	Fluka	PBS	Sigma-Aldrich
Glicin	Riedel-de Haën	PBS Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich	PEG 8000	Sigma-Aldrich
$H_2SO_4$	Merck	Penicilin/streptomicin	Sigma-Aldrich
KCl	Carlo Erba	Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	J. T. Baker	ProLong Antifade	Molecular Probes
Komplet reagentov Bio-Rad DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories	TEMED	Sigma-Aldrich
Komplet reagentov za kemiluminiscenco	Thermo Fischer Scientific	ТМВ	Sigma-Aldrich
HS	Gibco	Tris	Riedel-de Haën
L-glutamin	Sigma-Aldrich	Triton X-100	Serva
Lipofectamine 2000	Thermo Fischer Scientific	Tween 20	Fluka
Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich		

Preglednica I: Seznam uporabljenih reagentov in topil z navedenim proizvajalcem.

ZAVIRALEC	TARČA	PROIZVAJALEC
BIX02189	kinaza MEK5	Santa Cruz Biotechnology
GGTI-298	GTPaza Rap1	Calbiochem
K252a	receptor Trk	Sigma-Aldrich
Y27632	kinaza ROCK	Sigma-Aldrich
U0126	kinaza MEK	Sigma-Aldrich
Wortmannin	kinaza PI3K	Sigma-Aldrich

Preglednica II: Seznam uporabljenih zaviralcev s tarčami in z navedenimi proizvajalci.

#### 3.1.2 Standardi

Standardi, ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedeni v Preglednici III.

Preglednica III: Seznam uporabljenih standardov z navedenim proizvajalcem.

STANDARD	PROIZVAJALEC
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Označevalec velikosti proteinov	Invitrogen

## 3.1.3 Protitelesa

Protitelesa, ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedeni v Preglednici IV.

Preglednica IV: Seznam uporabljenih primarnih in sekundarnih protiteles z navedenim proizvajalcem.

PRIMARNA PROTITELESA	PROIZVAJALEC
Kozja poliklonska protitelesa, specifična za katepsin X	R&D Systems
Kunčja monoklonska protitelesa, specifična za β-aktin	Sigma-Aldrich
Kunčja poliklonska protitelesa, specifična za celokupno obliko ERK1/2	Santa Cruz Biotechnology
Kunčja poliklonska protitelesa, specifična za fosforilirano obliko ERK1/2	Cell Signaling Technology
Kunčja poliklonska protitelesa, specifična za fosforilirano obliko Akt	Cell Signaling Technology
Kunčja poliklonska protitelesa, specifična za fosforilirano obliko Akt	Santa Cruz Biotechnology
Kunčja poliklonska protitelesa, specifična za celokupno obliko Akt	Cell Signaling Technology

Kunčja poliklonska protitelesa, specifična za EEA1	Abcam
Kunčja poliklonska protitelesa, specifična za LAMP1	Sigma-Aldrich
Kunčja poliklonska protitelesa, specifična za Rab7	Sigma-Aldrich
Mišja monoklonska protitelesa, specifična za fosforilirano obliko ERK1/2	Santa Cruz Biotechnology
SEKUNDARNA PROTITELESA	PROIZVAJALEC
Kozja protitelesa proti kunčjim, označena s HRP	Millipore
Kozja protitelesa proti kunčjim, označena z Alexa Fluor 555	Invitrogen
Kozja protitelesa proti mišjim, označena z Alexa Fluor 488	Invitrogen
Kozja protitelesa proti mišjim, označena z Alexa Fluor 555	Invitrogen
Mišja monoklonska protitelesa 3B10, specifična za katepsin X, konjugirana s HRP	Proizvedena na Fakulteti za farmacijo
Oslova protitelesa proti kozjim, označena z Alexa Fluor 555	Invitrogen
Oslova protitelesa proti kunčjim, označena z Alexa Fluor 488	Invitrogen

## 3.1.4 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, je navedena v Preglednici V.

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Analizna tehtnica EXACTA 610 EB	Tehtnica Železniki
Aparatura za NaDS PAGE	Bio-Rad Laboratories
Avtoklav A-63	Kambič Laboratorijska oprema
Avtomatske pipete	Eppendorf
Avtomatski spiralec mikrotitrskih plošč	Tecan
Centrifuga 5804R	Eppendorf
Centrifugirke	TPP
Inkubator za gojenje celic CB 201	BINDER
Čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Safire <sup>2</sup>	Tecan
G-box	Sygene
Gojiščne plastenke	TPP
Hladilnik (+4°C)	LTH
Inkubator WTB	BINDER
Invertni mikroskop	Olympus
Kadička za termostatiranje vode	Keison Products
Komora z laminarnim pretokom zraka SMBC 183 AV	Iskar PIO
Konfokalni mikroskop LSM 710	Carl Zeiss
Magnetno mešalo Rotamix 550 MM	Tehtnica Železniki
Mikrotitrske plošče	TPP
Nitrocelulozna membrana za prenos western	GE Healthcare Life Sciences
Naprava za hitri prenos iBlot® 2 Gel Transfer Device	Thermo Fisher Scientific
Naprava za sonificiranje	Mikro+Polo
Nastavki za pipete	Sarstedt
pH meter HI 9321	HANNA
Plastenke za gojenje celični linij	TPP
Plošče s 6, 12, 24 vdolbinicami	TPP
Pretočni citometer FACS Calibur	BD Biosciences
Programska oprema FlowJo	FlowJo
Serološke pipete	Sarsdtedt
Ultrafiltracijske centrifugirke YM10	Amicon
Vibracijsko mešalo VIBRIMIX 104ev	Tehtnica Železniki
Zamrzovalnik (-20°C)	Gorenje
Zamrzovalnik (-80°C)	Gorenje

Preglednica V: Seznam laboratorijske opreme z navedenim proizvajalcem.

# 3.1.5 Gojišča

# *Gojišče za celice PC12:*

- 83 mL aDMEM
- 10 mL HS
- 5 mL FBS
- 1,0 mL penicilin/streptomicin
- 1,0 mL L-glutamin

# Zamrzovalno gojišče:

- 50% aDMEM
- 40% FBS
- 10% DMSO

# 3.1.6 Pufri in raztopine

# 3.1.6.1 Pufri in raztopine za NaDS PAGE in prenos western

10-kratni elektroforezni pufer:

- 29,0 g Tris-baze
- 144,0 g glicina
- 10,0 g NaDS

Dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 1 L. Pred uporabo pufer redčimo 10-krat z dH<sub>2</sub>O.

## Brez-serumsko gojišče za celice PC12:

- 98 mL aDMEM
- 1,0 mL penicilin/streptomicin
- 1,0 mL L-glutamin

- <u>Nanašalni pufer:</u>
  - 1,25 mL 0,5 M Tris-HCl, pH = 6,8
  - 1,0 mL glicerola
  - 2,0 mL 10% (m/v) NaDS
  - 0,25 mL 0,4% (m/v) bromfenol modro

Dopolnimo z dH2O do 5,0 mL.

## Tris pufer z dodatkom Tweena 20 (TTBS):

- 250 mM Tris baza
- 1370 mM NaCl
- 30 mM KCl

Dopolnimo z  $dH_2O$  do 1 L in uravnamo pH na 7,4. Pred uporabo pufer redčimo 10-krat z  $dH_2O$  in dodamo Tween 20 (0,1%).

## 3.1.6.2 Pufri za ELISA test

<u>Pufer A:</u>

- 1,6 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 2,94 g NaHCO<sub>3</sub>
- 0,2 g NaN<sub>3</sub>

Dopolnimo z  $dH_2O$  do 1 L in uravnamo pH na 9,6.

<u>Pufer C:</u>

• 2 g BSA

Dopolnimo s pufrom B do 100 mL.

Pufer za odstranjevanje protiteles (»stripping buffer«):

- 5,0 g NaDS (2%)
- 1,89 g Tris-HCl, pH = 6,8 (62,5 mM)
- 1,75 mL merkaptoetanola (100 mM)

Dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 250 mL.

# <u>Pufer B (za spiranje mikrotitrske</u> <u>plošče):</u>

- 8,5 g NaCl
- 1,34 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O
- 2,94 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O
- 0,5 g Tween 20

Dopolnimo z  $dH_2O$  do 1 L in uravnamo pH na 7,2.

## Pufer D (substratni pufer za TMB):

- 21 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O
- 17,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

Dopolnimo z  $dH_2O$  do 1 L in uravnamo pH na 6,0.

# 3.1.6.3 Ostali pufri

PBS (fosfatni pufer z dodatkom NaCl):

- 1,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O
- 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl

Dopolnimo z  $dH_2O$  do 1 L in uravnamo pH na 7,4.

# Aktivacijski pufer za katepsin X:

- 100 mM Na-acetat, pH = 5,5
- 0,1% PEG 8000
- 5 mM DTT
- 1,5 mM EDTA

# Lizirni pufer za katepsin X:

- 0,05 M Na-acetat, pH = 5,5
- 1 mM EDTA
- 0,1 M NaCl
- 0,25 % Triton X-100

# Lizirni pufer za signalizacijo:

- 50 mM HEPES, pH = 6,5
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1% Triton X-100

#### 3.1.7 Delo s celicami

#### 3.1.7.1 Celična linija PC12

Pri delu smo uporabili nesmrtno celično linijo PC12, ki je izolirana iz podganjega feokromocitoma, tumorja sredice nadledvične žleze. Celice PC12 so široko uporabljen model za proučevanje celičnega preživetja in diferenciacije nevronov (42).



Slika 3.1: Prikaz morfologije suspenzijskih celic PC12. Leva slika prikazuje nizko gostoto celic PC12, desna slika pa prikazuje visoko gostoto celic PC12 (43).

#### 3.1.7.2 Odmrzovanje celične linije

Celice, ki so bile shranjene v tekočem dušiku, smo hitro odtalili v vodni kopeli pri temperaturi 37°C. Odmrznjene celice smo resuspendirali v 8 mL ustreznega gojišča, predhodno ogretega na 37°C. Suspenzijo celic v gojišču smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih na minuto. Po končanem centrifugiranju smo supernatant zavrgli in celice ponovno resuspendirali v ustreznem gojišču ter jih prenesli v gojiščno plastenko. Sveže gojišče smo pred uporabo segreli na temperaturo 37°C.

## 3.1.7.3 Gojenje celične linije

Gojenje celičnih linij vedno poteka v aseptičnih pogojih, sterilni pa morajo biti tudi vsi reagenti ter ves pribor, ki ga uporabljamo pri delu. Gojiščne plastenke, v katerih gojimo celice, shranjujemo v celičnem inkubatorju pri  $37^{\circ}$ C. Atmosfera v inkubatorju mora biti nasičena z vlago ter s 5% CO<sub>2</sub> in 95% O<sub>2</sub>. Vedno pazimo, da uporabimo zamašek s filtrom, saj na ta način omogočimo vstop zraka v gojiščno plastenko. Celice PC12 prerastejo 70 – 80% gojiščne plastenke v približno 3 do 4 dneh, v izrabljenem gojišču začne primanjkovati hranilnih snovi ter rastnih dejavnikov za celice in v njem se začnejo kopičiti razgradni produkti celic, zato moramo gojišče dovolj pogosto menjati, z namenom, da se izognemo odmrtju celic. To smo storili tako, da smo celično suspenzijo prestavili iz gojiščne plastenke

v centrifugirko, centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih na minuto, odlili izrabljeno gojišče, ter celice resuspendirali v ustreznem volumnu svežega gojišča. Na tem mestu smo celice prešteli in vzeli število celic, potrebno za določen eksperiment. Ostale smo vrnili v gojiščno plastenko in jih vzdrževali v celičnem inkubatorju pri 37°C.

#### 3.1.7.4 Transfekcija celic PC12

Celice PC12 za nadizražanje katepsina X smo transfecirali s konstruktom pcDNA3/CatX, ob pomoči reagenta Lipofectamine 2000 po navodilih proizvajalca. Stabilno celično linijo z nadizraženim katepsinom X smo gojili ob dodatku geneticina (400 µg/mL), povišano aktivnost katepsina X pa smo potrdili s fluorimetričnim določanjem aktivnosti katepsina X v celičem lizatu.

#### 3.1.7.5 Štetje celic

Za štetje celic, smo celice sprali z dna gojiščne plastenke in jih homogeno suspendirali. 50  $\mu$ L celične suspenzije smo dodali 50  $\mu$ L 0,2% raztopine nigrozina, ki črno obarva le mrtve celice, ki jih pri štetju nismo upoštevali. Dobro smo premešali in pod invertnim mikroskopom prešteli vse žive celice. Nato smo izračunali število celic na mL gojišča s spodnjo enačbo.

$$N = N' \times 2 \times 10^4 / mL \qquad \dots enačba l$$

N.... število celic na mL gojišča

N'.... povprečno število pod mikroskopom preštetih celic

#### 3.1.7.6 Zamrzovanje celične linije

Za ustrezno shranjevanje celic skozi daljši čas, smo celice centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih na minuto, zavrgli supernatant in celice resuspendirali v 1 mL gojišča za zamrzovanje. Pri zamrzovanju smo osnovnemu gojišču dodali še 10% DMSO, ki ima vlogo krioprotektanta. Njegova naloga je, da med zamrzovanjem prepreči tvorbo kristalov, ki bi lahko poškodovali celice. Suspenzijo celic smo prenesli v kriovialo, zamrznili najprej pri - 70°C čez noč, nato pa shranili v tekočem dušiku pri temperaturi -196°C.

#### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Vrednotenje celičnega preživetja s testom MTS

Za vrednotenje celičnega preživetja smo uporabili test z uporabo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazolijeve soli (MTS), kolorimetrično metodo za določevanje deleža živih celic. Reagent je sestavljen iz tetrazolijeve spojine MTS in elektron sklopitvenega reagenta (fenazin etosulfata), ki poveča kemijsko stabilnost. MTS se v celici s pomočjo dehidrogenaznih encimov spremeni v obarvani formazanski produkt, ki je topen v gojišču. Absorbanca, ki jo pomerimo pri valovni dolžini 492 nm, je sorazmerna številu živih celic v kulturi (44).



Slika 3.2: Strukturna formula tetrazolijeve spojine MTS in njenega formazanskega produkta (44). *Izvedba:* 

V vdolbinice mikrotitrske plošče s 96 vdolbinicami, predhodno prekrite s poli-L-lizinom (10  $\mu$ g/mL) v pufru A, smo nanesli celice PC12 (1 x 10<sup>4</sup> celic/100  $\mu$ L) in inkubirali preko noči pri 37°C. Nato smo celice stimulirali z naraščajočimi koncentracijami NGF (0-100 ng/mL) v brez-serumskem gojišču in jih inkubirali 24, 48 in 72 ur pri 37°C. Preživetje celic smo določili z merjenjem absorbance produkta formazana po redukciji MTS v celici pri valovni dolžini 492 nm po enačbi:

A vzorčne celice, A kontrolne celice ... izmerjeni absorbanci formazana za posamezne celice

#### 3.2.2 Določanje aktivnosti katepsina X

## 3.2.2.1 Priprava lizatov

Pred določanjem koncentracije proteinov in izvedbo merjenja aktivnosti katepsina X v celicah PC12 smo morali najprej pripraviti ustrezne celične lizate.

## <u>Izvedba:</u>

Celice PC12 (1 x 10<sup>6</sup> celic/2 mL) smo priraščali tekom noči v ploščah s 6-imi vdolbinicami, predhodno prekritimi s poli-L-lizinom (10 µg/mL) v pufru A. Nato smo celice stimulirali z NGF koncentracije 50 ng/mL ter inkubirali v različnih časovnih točkah (3, 6, 24, 48, 72 in 120 ur). Pri določevanju vpliva signalnih kinaz na aktivnost katepsina X v celicah PC12, smo celice pred-tretirali 1 uro z zaviralci K252a (200 nM), Wortmannin (2 µM), Y27632 (10 µM), GGTI-298 (10 µM), U0126 (5 µM) ali BIX02189 (1 µM) v brez-serumskem gojišču pri 37°C. Nato pa smo celice stimulirali z NGF pri koncentraciji 50 ng/mL in inkubirali nadaljnjih 3, 6, 24, 48, 72 oz. 120 ur pri 37°C. Po končani inkubaciji smo celično suspenzijo prenesli v epice, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto in zavrgli supernatant. Celice smo nato sprali z 1 mL hladnega PBS, jih ponovno centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto, supernatant zavrgli ter usedlino resuspendirali v 75-100 µL lizirnega pufra za katepsin X. Tako pripravljene vzorce smo dali preko noči v zamrzovalnik na -80°C. Naslednji dan smo celične lizate za kratek čas prestavili na led (15 - 30 min), jih sonicirali (10 sekund), dobro vorteksirali in centrifugirali 15 minut pri 15000 obratih na minuto pri 4°C. Po končanem centrifugiranju smo supernatant posameznih vzorcev prenesli v svežo epico in določili koncentracije proteinov, usedlino pa zavrgli.

## 3.2.2.2 Določanje koncentracije proteinov po Bradfordu

»DC (ang. detergent compatible) Protein Assay« je kolorimetrična metoda za določevanje koncentracije proteinov. Test temelji na dvostopenjski reakciji, ki privede do nastanka modro obarvanega kromofora, katerega absorbanco izmerimo s pomočjo spektrofotometra pri valovni dolžini 750 nm. Večja kot je količina proteinov, intenzivnejše je modro obarvanje (45, 46, 47).

## Izvedba:

Celokupne koncentracije proteinov smo določali s pomočjo reagentov kita Bio-Rad DC Protein Assay po navodilih proizvajalca. V vdolbinice mikrotitrske plošče smo nanesli po 5
μL pripravljenih standardnih raztopin BSA različnih koncentracij v območju 0,2-1,5 mg/mL. Vzorce smo dvakratno redčili z lizirnim pufrom ter jih tako pripravljene po 5 μL nanesli v ostale vdolbinice. V vdolbinice s standardi in vzorci smo nanesli po 25 μL reagenta A' (20 µl reagenta S/1000 µl reagenta A) in nato še 200 µL reagenta B. Ploščo smo zaščitili pred svetlobo in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Absorbanco smo spektrofotometrično pomerili pri valovni dolžini 750 nm. S pomočjo izmerjenih vrednosti standardov smo določili umeritveno krivuljo. Na podlagi dobljene enačbe umeritvene krivulje in izmerjenih vrednosti absorbance posameznega vzorca smo nato izračunali koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu.

## 3.2.2.3 Merjenje aktivnosti katepsina X

Aktivnost katepsina X smo določali s pomočjo metode, ki temelji na reakciji katepsina X s specifičnim substratom Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH. Katepsin X, ki je prisoten v celičnih lizatih, cepi substrat, pri tem pa se sprosti fluorogeni Abz, katerega fluorescenco merimo pri ekscitacijski valovni dolžini 320 nm in emisijski valovni dolžini 420 nm (48).

Za primerjanje aktivnosti katepsina X v različnih vzorcih, moramo predhodno zagotoviti enako celokupno koncentracijo proteinov v vseh med seboj primerjanih vzorcih, pri čemer smo koncentracijo proteinov v posameznih vzorcih izmerili s pomočjo zgoraj omenjene metode po Bradfordu.

## Izvedba:

Celični lizat smo redčili v aktivacijskem pufru za katepsin X, da je bila končna koncentracija proteinov v lizatu 0,25 mg/mL. Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 10 minut pri 37°C. V vdolbinice črne mikrotitrske plošče smo napipetirali po 5 µl substrata za katepsin X, ki smo ga predhodno redčili 200x v lizirnem pufru za katepsin X. Po končani inkubaciji smo v vse vdolbinice napipetirali še 95 µL aktiviranega lizata. Nemudoma smo začeli z merjenjem fluorescence s spektrofotometričnim čitalcem plošč pri ekscitacijski valovni dolžini 320 nm in emisijski valovni dolžini 420 nm. Aktivnost katepsina X smo podali kot naklon linearnega dela krivulje spremembe intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa.

#### 3.2.3 Encimsko imunski test na trdni podlagi (ELISA)

ELISA je imunokemijska tehnika, s katero dokazujemo prisotnost antigena ali protiteles v vzorcu. Merjenje celokupnega katepsina X smo izvedli s pomočjo direktnega (»sendvič«) ELISA testa, kjer površino prekrijemo z visoko specifičnim ali monoklonskim protitelesom ter ga izpostavimo vzorcu, ki vsebuje preiskovani antigen. Imunski kompleks nato izpostavimo referenčnemu konjugatu protitelesa ali pa neoznačenemu specifičnemu protitelesu proti antigenu, ki ga nato detektiramo s sekundarnimi protitelesi, označenimi z encimom, pri čemer je količina obarvanega produkta sorazmerna količini vezanega antigena (49).



Slika 3.3: Shematski prikaz poteka direktnega ELISA testa (50).

#### Izvedba:

Vdolbinice mikrotitrske plošče smo prekrili s primarnimi kozjimi poliklonskimi protitelesi proti katepsinu X, ki smo jih redčili v pufru A, pH 9,6 (2 µg/mL). V vsako vdolbinico smo nanesli po 50 µL te raztopine in inkubirali preko noči pri 4°C. Naslednji dan smo ploščo sprali z avtomatskim spiralcem plošč, nato pa dodali 130 µL blokirnega pufra C in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. V vdolbinice smo nato nanesli po 100 µL raztopin standardov (0 – 65 ng/mL) in vzorcev (55 µg/220 µL), ki smo jih predhodno redčili v pufru C. Plošče smo inkubirali 2 uri pri 37°C ter nato ploščo sprali z avtomatskim spiralcem plošč. Z avtomatsko multikanalno pipeto smo v vsako vdolbinico nanesli po 100 µL raztopine sekundarnih mišjih monoklonskih protiteles proti katepsinu X, 3B10, konjugiranih s HRP, ki smo jih predhodno redčili v pufru C (1/3000). Nato smo inkubirali 1 uro in 30 min pri temperaturi 37°C ter ploščo sprali z avtomatskim spiralcem plošč. V vsako vdolbinico smo nato nanesli po 200 µL raztopine substrata TMB, ki smo ga predhodno redčili v pufru D v razmerju 1:1. To smo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo

v vdolbinice nanesli po 50  $\mu$ L 2 M raztopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> za prekinitev encimske reakcije. Nato smo nemudoma pomerili absorbanco na spektrofotometričnem čitalcu plošč pri valovni dolžini 450 nm. S pomočjo izmerjenih vrednosti standardov smo določili umeritveno krivuljo. Na podlagi dobljene enačbe umeritvene krivulje in izmerjenih vrednosti absorbance posameznega vzorca smo nato izračunali koncentracijo katepsina X v posameznem vzorcu.

# 3.2.4 Vrednotenje rasti nevritov celic PC12

Nevritogenezo oz. rast nevritov smo vrednotili s pomočjo invertnega mikroskopa, ki smo ga uporabljali pri delu s celičnimi kulturami, saj omogoča direktno opazovanje celic v gojiščnih posodah ali ploščah. Preparat je osvetljen od zgoraj, posebne prizme v spodnjem delu mikroskopa pa svetlobne žarke, ki prihajajo iz preparata skozi objektiv, usmerijo zopet poševno navzgor v cev mikroskopa (tubus) z okularjem (51).

## Izvedba:

V vdolbinice plošče s 6 vdolbinicami, predhodno prekrite s poli-L-lizinom (10 µg/mL) v pufru A, smo v kompletnem gojišču nanesli intaktne celice PC12 (PC12wt) in transfecirane celice PC12 s povečanim izražanjem katepsina X (pcDNA3/CatX) pri koncentraciji 1 x 10<sup>6</sup> celic/2 mL ter jih priraščali preko noči pri 37°C. Nato smo celice stimulirali z naraščajočimi koncentracijami NGF (0 - 100 ng/mL) v brez-serumskem gojišču in jih inkubirali 24 ur pri 37°C. Celice smo opazovali pod invertnim mikroskopom ter posneli slike posameznega vzorca.

## 3.2.5 Konfokalna mikroskopija

Lokalizacijo in kolokalizacijo katepsina X smo spremljali s pomočjo fluorescenčno konfokalne mikroskopije, pri kateri z laserskim žarkom po točkah pregledujemo preparat v določeni optični ravnini. V gorišču za lečo objektiva (konfokalno) sta nameščeni dve zaslonki, ki omogočata skeniranje preparata, samo v izbrani ravnini z nastavljivo globino. Detektor sprejme vzbujeno fluorescentno svetlobo iz posameznih točk in informacijo s pomočjo računalnika spremeni v sliko (51, 52).



Slika 3.4: Shematski prikaz konfokalnega mikroskopa (53).

# 3.2.5.1 Določevanje lokalizacije katepsina X

Za določevanje lokalizacije katepsina X v celicah PC12 smo celice označili s specifičnimi protitelesi proti katepsinu X in označevalci vezikularnega transporta ter pripravili trajne preparate, ki smo jih nato pogledali s konfokalnim mikroskopom.

## <u>Izvedba:</u>

V vdolbinice gojiščne plošče s 24 vdolbinicami smo položili krovna stekelca ter jih prekrili s poli-L-lizinom (10 µg/mL) v pufru A. Nato smo v kompletnem gojišču nanesli celice PC12 (5 x10<sup>4</sup> celic/750 µL) in jih priraščali preko noči pri 37°C. Celice smo stimulirali z NGF pri koncentraciji 50 ng/mL v brez-serumskem gojišču in jih inkubirali 24 ur pri 37°C. Pritrjenim celicam smo najprej odvzeli gojišče, jim dodali 500 µL 5% (m/v) formalina v PBS in fiksirali 15 minut pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo celice sprali z 1 mL PBS, jim dodali 500 µL 0,5% raztopine Tween 20 v PBS ter permeabilizirali 10 minut pri sobni temperaturi. Nato smo celice sprali z 1 mL PBS, jim dodali 700 µL 3% BSA v PBS ter blokirali nespecifična vezavna mesta 30 minut pri sobni temperaturi. Iz vdolbinic smo odstranili blokirni pufer in v vsako vdolbinico dodali po 200 µL pripravljene raztopine primarnih protiteles proti katepsinu X ter proti proteinu značilnem za lizosome, LAMP1 (1/500), proteinu značilnem za zgodnje endosome, EEA1 (1/100) ali proteinu značilnem za pozne endosome, Rab7 (1/200) v 3% BSA v PBS ter nadalje inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji, smo celice trikrat sprali z 1 mL PBS. Nato smo v vdolbinice nanesli po 200 µL pripravljene raztopine ustreznih sekundarnih protiteles, in sicer proti kunčjih protiteles, označenih z Alexa Fluor 488 ali proti mišjih protiteles, označenih z Alexa Fluor 488 in proti kozjih protiteles, označenih z Alexa Fluor 555, ki smo jih redčili 1/1000 v 3% BSA v PBS. Inkubirali smo 1,5 ure pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji, smo celice trikrat sprali z 1 mL PBS ter krovna stekelca posušili na zraku. Na objektno stekelce smo kanili kapljico reagenta »ProLong Antifade«, ki preprečuje razbarvanje fluorescenčnih barvil, nato pa nanj položili krovno stekelce. Kasneje smo jih oblepili z lakom za nohte in tako pripravili trajne preparate, ki smo jih hranili pri 4°C. Vse preparate smo pogledali in posneli s konfokalnim mikroskopom Carl Zeiss LSM 710, kolokalizacijo pa ocenili s pomočjo programske opreme ZEN 2011.

#### 3.2.5.2 Določevanje aktinskih filamentov

Za določevanje aktinskih filamentov v celicah PC12 smo celice označili z barvilom za aktinske filamente Phalloidin-TRITC in jih nato pogledali s konfokalnim mikroskopom.

#### Izvedba:

V vdolbinice gojiščne plošče s 24 vdolbinicami smo položili krovna stekelca ter jih prekrili s poli-L-lizinom (10 µg/mL) v pufru A. Nanje smo v kompletnem gojišču nanesli celice PC12 (5 x10<sup>4</sup> celic/750  $\mu$ L) in jih priraščali preko noči pri 37°C. Nato smo celice stimulirali z NGF pri koncentraciji 50 ng/mL v brez-serumskem gojišču in jih inkubirali 2 in 24 ur pri 37°C. Pri določevanju vpliva rekombinantnega katepsina X na organizacijo aktinskih filamentov smo celice najprej pred-tretirali z rekombinantnim katepsinom X (50 nM) v brezserumskem gojišču in jih inkubirali 1 uro pri 37°C. Nato pa smo celice stimulirali z NGF pri koncentraciji 50 ng/mL in inkubirali nadaljnjih 2 oz. 24 ur pri 37°C. Pritrjenim celicam smo najprej odvzeli gojišče in jih fiksirali 5 minut s 5% (m/v) formalinom v PBS, pH 7,4 z vsebnostjo Mg<sup>2+</sup> in Ca<sup>2+</sup> pri sobni temperaturi. Nato smo jih sprali z 1 mL PBS, jih permeabilizirali 3 minute z 0,1% Triton X-100 v PBS, pH 7,4 pri sobni temperaturi ter jih ponovno sprali z 1 mL PBS. Celice smo nato označili z barvilom za aktinske filamente Phalloidin-TRITC (500 ng/mL) v 20 mM pufru Tris HCl, pH 7,4 in inkubirali zaščiteno pred svetlobo 30 minut pri temperaturi 37°C. Po končani inkubaciji smo celice sprali 3x z 1 mL PBS in krovna stekelca posušili na zraku. Na objektno stekelce smo kanili kapljico reagenta »ProLong Antifade« in nanj položili krovno stekelce. Kasneje smo jih oblepili z lakom za nohte in tako pripravili trajne preparate, ki smo jih hranili pri 4°C. Vse preparate smo pogledali in posneli s konfokalnim mikroskopom Carl Zeiss LSM 710.

# 3.2.6 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS PAGE)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS) je analitska metoda, s pomočjo katere določamo molekulsko maso proteinom in polipeptidom. Molekule NaDS imajo negativen naboj, zato bodo imeli tudi vsi z NaDS denaturirani proteini negativen naboj, velikost naboja pa bo odvisna od velikosti proteinske molekule. NaDS elektroforezo izvajamo v vertikalni tehniki in v diskontinuiranem sistemu, ki je sestavljen iz dveh različno zamreženih gelov, koncentracijskega in separacijskega (49, 54).



Slika 3.5: Levo je prikaz aparature za NaDS PAGE, desno pa potovanje molekul v diskontinuiranem sistemu (55).

## Izvedba:

## 3.2.6.1 Priprava gelov

Na začetku smo sestavili aparaturo za vlivanje gelov. V okvir smo vstavili stekelci, med kateri smo vlili gela in vse skupaj postavili v stojalo za polimerizacijo. Nato smo pripravili 10% separacijski gel, kot je navedeno v spodnji preglednici VI. Po dodatku 10% amonijevega persulfata in TEMED smo med obe stekelci vlili 10% separacijski gel. Nato smo gladino separacijskega gela zravnali z 1 mL z vodo nasičenega butanola. Ko se je gel strdil, smo odlili butanol, sprali z vodo in popivnali s filter papirjem. Sledila je priprava 5% koncentracijskega gela. Vlili smo ga na strjen separacijski gel do vrha stekelca, vstavili »glavniček« in počakali, da se je koncentracijski gel strdil.

10% SEPARACIJSKI GEL		5% KONCENTRACIJSKI GEL	
(debenne 1,3 mm)		(debenne 1,5 mm)	
40% akrilamid	2 mL	40% akrilamid	376 µL
1,5 M Tris-HCl, pH = 8,8	2 mL	1,5 M Tris-HCl, pH = 6,8	390 µL
dH <sub>2</sub> O	3,8 mL	dH <sub>2</sub> O	2 mL
10% NaDS	100 µL	10% NaDS	30 µL
10% amonijev persulfat*	100 µL	10% amonijev persulfat*	30 µL
TEMED*	3,4 µL	TEMED*	3 µL

Preglednica VI: Sestava gelov za izvedbo NaDS PAGE.

\* dodamo tik pred vlivanjem gela

## 3.2.6.2 Priprava vzorcev

V vdolbinice plošče s 6 vdolbinicami, predhodno prekrite s poli-L-lizinom (10  $\mu$ g/mL) v pufru A, smo v kompletnem gojišču nanesli celice PC12 koncentracije 1 x 10<sup>6</sup>/2 mL in jih priraščali 24 ur. Nato smo celice pred-tretirali z rekombinantnim katepsinom X koncentracije 50 nM v brez-serumskem gojišču za 1 uro in jih nato stimulirali z NGF koncentracije 50 ng/mL. Po 15- in 60-minutni inkubaciji smo pripravili celične lizate v lizirnem pufru (50 mM HEPES). Z metodo po Bradfordu, kot je navedeno v poglavju 3.2.2.2, smo določili koncentracije proteinov v vzorcih. Nato smo vzorce redčili z lizirnim pufrom do končne koncentracije proteinov 30  $\mu$ g/20  $\mu$ L ter dodali 10,6  $\mu$ L nanašalnega pufra in 5,4  $\mu$ L 1 M DTT. Sledila je 5-minutna inkubacija vzorcev v vodni kopeli pri temperaturi 100°C ter ohladitev vzorcev na ledu pred nanosom na gel.

# 3.2.6.3 Elektroforeza

Strjen gel smo skupaj s stekelcema prenesli v aparaturo za elektroforezo in jo napolnili z elektroforeznim pufrom, pH 8,3. V prvi žepek gela smo nanesli 7  $\mu$ L označevalca velikosti proteinov, v ostale pa po 27  $\mu$ L pripravljenih vzorcev. Gel smo razvijali približno 2 uri pri konstantni napetosti 100 V. Po končani elektroforezni ločbi smo aparaturo previdno razdrli in gel prenesli v aparaturo za hitri prenos proteinov na nitrocelulozno membrano.

## 3.2.6.4 Prenos proteinov na nitrocelulozno membrano

Hitri prenos proteinov na membrano, t. i. prenos western, smo izvedli s pomočjo naprave iBlot® 2 Gel Transfer Device, ki nam omogoča »suhi« prenos proteinov z gela na nitrocelulozno membrano. Spodnjo plast (»ang. bottom stack«), ki je sestavljena iz anodne plasti in nitrocelulozne membrane, smo skupaj s plastičnim pladnjem položili v napravo. Na nitrocelulozno membrano smo dali predhodno omočen gel in nato s pomočjo valjčka (»ang. blotting roller«) odstranili morebitno nastale mehurčke. Vse skupaj smo pokrili z zgornjo

katodno plastjo (»ang. top stack«) ter z valjčkom ponovno odstranili nastale mehurčke. Na koncu smo namestili še blazinico (»ang. absorbent pad«), s katero smo dosegli, da so se stiki (»ang. electrical contacts«) na posameznih plasteh zagotovo prilegali stikom v sami napravi. Nato smo previdno zaprli pokrov naprave in pri tem pazili, da se plasti niso premaknile. Za prenos smo izbrali program P0 (1 min: 20 V; 4 min: 23 V, 3 min: 25 V) (56).



Slika 3.6: Shematski prikaz hitrega prenosa (iBlot) (57).

## 3.2.6.5 Detekcija proteinov na membrani

Po prenosu proteinov membrano izpostavimo primarnim protitelesom, ki so specifično usmerjena proti tarčnemu proteinu in sekundarnim protitelesom, ki so specifično usmerjena proti primarnim protitelesom in so označena z encimom, ki po dodatku substrata tvori obarvan produkt (49).

Po prenosu smo membrano 1 uro blokirali s 5% BSA v TTBS ter jo nato preko noči ob rahlem stresanju inkubirali v raztopini primarnih protiteles proti fosforilirani obliki ERK1/2 (phERK1/2; 1/1000) in proti fosforilirani obliki Akt (phAkt; 1/1000) v 5% BSA v TTBS pri 4°C. Membrano smo spirali trikrat po 5 minut s TTBS in jo nato 1 uro ob rahlem stresanju inkubirali v raztopini sekundarnih proti-kunčjih protiteles, označenih s HRP (1/5000) v 5% mleku v TTBS na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo membrano spirali trikrat po 5 minut s TTBS ter odziv na membrani posneli s pomočjo naprave G-box ob uporabi ustreznega substrata za HRP. Nato je po rahlem spiranju s TTBS sledila 45-minutna inkubacija membrane v »stripping« pufru pri temperaturi 50°C. Membrano smo nato spirali dvakrat po 10 minut s TTBS, jo 1 uro blokirali s 5% BSA v TTBS ter jo preko noči ob rahlem stresanju inkubirali v raztopini primarnih protiteles proti celokupni obliki ERK1/2 (ERK1/2;

1/1000 za ERK1 in 1/5000 za ERK2) in proti celokupni obliki Akt (Akt; 1/1000) v 5% BSA v TTBS pri 4°C. Membrano smo spirali trikrat po 5 minut s TTBS in jo nato 1 uro ob rahlem stresanju inkubirali v raztopini s HRP-konjugiranih sekundarnih proti-kunčjih protiteles (1/5000) v 5% BSA v TTBS na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo membrano spirali trikrat po 5 minut s TTBS ter odziv na membrani posneli s pomočjo naprave G-box ob uporabi ustreznega substrata za HRP. Zatem smo celoten postopek označevanja membrane s protitelesi proti  $\beta$ -aktinu (1/300) ponovili z namenom preverjanja nanosa proteinov na gel. Intenzitete lis na membrani smo semi-kvantitativno ovrednotili s pomočjo programske opreme SyGene in dobljene vrednosti fosforiliranih oblik normalizirali na ustrezne vrednosti celokupnih oblik ERK1/2 oz. Akt ter podali relativno fosforilacijo ERK1/2 oz. Akt.

#### 3.2.7 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je metoda, ki omogoča kvantifikacijo vizualne slike, ki jo dobimo z mikroskopskim opazovanjem celic, označenih s specifičnimi protitelesi. Ko laserski žarek osvetli celico, ki vsebuje fluorokrom, se le-ta stimulira in emitira svetlobo specifične valovne dolžine, kar zazna detektor. Zaradi prisotnosti celice se začetni žarek hkrati odkloni in tako dobimo tudi informacije o velikosti celice in njeni granuliranosti oziroma notranji kompleksnosti (49).



Slika 3.7: Shema strukture pretočnega citometra (58).

## 3.2.7.1 Določanje polimerizacije aktina

Za določanje polimerizacije aktina smo uporabili barvilo za aktinske filamente Phalloidin-TRITC. Phalloidin je toksin, izoliran iz gobe *Amanita phalloides*, ki se veže le na polimerne in oligomerne oblike aktina in na ta način močno stabilizira aktinske filamente (59).

## <u>Izvedba:</u>

V vdolbinice plošče z 12 vdolbinicami, predhodno prekrite s poli-L-lizinom (10 µg/mL) v pufru A, smo v kompletnem gojišču nanesli celice PC12wt in pcDNA3/CatX pri koncentraciji 1 x 10<sup>5</sup> celic/750 µL in jih priraščali preko noči pri 37°C. Nato smo celice stimulirali z naraščajočimi koncentracijami NGF (0 - 100 ng/mL) v brez-serumskem gojišču in jih inkubirali 2 uri in 24 ur pri 37°C. Po končani inkubaciji smo celicam nežno odvzeli gojišče, jim dodali 1 mL PBS, vse skupaj prenesli v centrifugirke in centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto ter zavrgli supernatant. Nato smo celice fiksirali 10 minut s 500  $\mu$ L 5 % (m/v) formalina v PBS, pH 7,4 pri sobni temperaturi. Po končani fiksaciji, smo celice sprali z 2 mL PBS, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto in zavrgli supernatant. Nato smo celice permeabilizirali 5 minut s 500 µL 0,1% Triton X-100, pH 7,4 pri sobni temperaturi ter ponovno sprali z 2 mL PBS in centrifugirali. Celicam smo nato dodali 200 µL barvila za aktinske filamente Phalloidin-TRITC (500 ng/mL) v 20 mM pufru Tris/HCl, pH 7,4 ter inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo celice ponovno sprali z 2 mL PBS, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto in zavrgli supernatant. Zatem smo celice resuspendirali v 150 µL PBS. Vzorce smo pomerili s pomočjo pretočnega citometra FACS Calibur, polimerizacijo aktinskih filamentov pa analizirali s programsko opremo FlowJo.

# 3.2.7.2 Določanje katepsina X na površini membrane celic PC12

Za proučevanje površinskega izražanja katepsina X na celicah PC12 smo se poslužili posrednega označevanja celic, pri tem pa izpustili korak permeabilizacije membrane. Postopek označevanja je potekal v dveh stopnjah; v prvi stopnji smo celice inkubirali s primarnimi protitelesi, ki specifično prepoznajo katepsin X, v drugi stopnji pa smo dodali sekundarna, s fluorokromom označena protitelesa (60).

# Izvedba:

V vdolbinice plošč z 12 ali 24 vdolbinicami, predhodno prekritimi s poli-L-lizinom (10  $\mu$ g/mL) v pufru A, smo v kompletnem gojišču nanesli celice PC12 koncentracije 1 x 10<sup>5</sup>

celic/750 µL in jih priraščali preko noči pri 37°C. Nato smo celice stimulirali z NGF koncentracije 50 ng/mL v brez-serumskem gojišču in jih inkubirali 24, 48, 72 in 120 ur pri 37°C. Po končani inkubaciji smo celicam nežno odvzeli gojišče, jim dodali 1 mL PBS/EDTA, inkubirali 5 minut pri 37°C ter celokupno celično suspenzijo prenesli v centrifugirke, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto ter zavrgli supernatant. Nato smo celice fiksirali 15 minut s 500 µL 5% (m/v) formalina v PBS, pH 7,4 pri sobni temperaturi. Po končani fiksaciji, smo celice spirali z 2 mL PBS, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto in zavrgli supernatant. Celicam smo dodali 200 µL 3% BSA v PBS in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo dodali kozja primarna protitelesa proti katepsinu X (1/100) v blokirnem pufru ter inkubirali 45 minut pri temperaturi 4°C. Nato smo celice ponovno sprali z 2 mL PBS, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto in zavrgli supernatant. Sledila je 30-minutna inkubacija s sekundarnimi proti-kozjimi protitelesi, označenimi s fluorokromom Alexa Fluor 555 (1/500) v blokirnem pufru na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo celice zopet sprali z 2 mL PBS, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto in zavrgli supernatant ter jih resuspendirali v 150 µL PBS. Vzorce smo pomerili s pomočjo pretočnega citometra FACS Calibur, vpliv NGF na površinsko izražanje katepsina X pa analizirali s programsko opremo FlowJo.

## 3.2.7.3 Določevanje stopnje fosforilacije signalnih molekul

S pomočjo pretočne citometrije lahko spremljamo tudi signalno kaskado v celicah ob souporabi specifičnih protiteles, ki prepoznajo fosforilirane aminokislinske ostanke kinaz in ostalih signalnih molekul. V ta namen je potrebno celice najprej ustrezno fiksirati, nato permeabilizirati ter označiti z ustreznimi protitelesi (61).

## Izvedba:

V vdolbinice plošč z 12 vdolbinicami, predhodno prekritimi s poli-L-lizinom (10  $\mu$ g/mL) v pufru A, smo v kompletnem gojišču nanesli celice PC12wt in pcDNA3/CatX koncentracije 2 x 10<sup>5</sup> celic/750  $\mu$ L in jih priraščali preko noči pri 37°C. Nato smo celice stimulirali z NGF koncentracije 50 ng/mL v brez-serumskem gojišču in jih inkubirali 1 uro pri 37°C. Po končani inkubaciji smo celicam nežno odvzeli gojišče, jim dodali 1 mL PBS, celično suspenzijo prenesli v centrifugirke, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto ter zavrgli supernatant. Nato smo celice fiksirali 10 minut s 500  $\mu$ L 5% (m/v) formalina v PBS, pH 7,4 pri sobni temperaturi. Po končani fiksaciji, smo celice spirali z 2 mL PBS, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto in zavrgli supernatant. Celice smo

permeabilizirali s 500 µL ledeno mrzlega metanola in jih inkubirali 20 minut pri temperaturi 4°C. Po končani permeabilizaciji, smo celice spirali z 2 mL PBS, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto in zavrgli supernatant. Celicam smo dodali 200 µL 3% BSA v PBS in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo dodali primarna protitelesa proti fosforiliranima oblikama ERK1/2 (phERK1/2; 1/50) in Akt (phAkt; 1/50) v blokirnem pufru ter inkubirali 45 minut pri temperaturi 4°C. Nato smo celice ponovno sprali z 2 mL PBS, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto in zavrgli supernatant. Sledila je 30-minutna inkubacija z ustreznimi sekundarnimi protitelesi, označenimi s fluorokromom Alexa Fluor 555 v blokirnem pufru na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo celice zopet sprali z 2 mL PBS, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto in zavrgli supernatant ter jih resuspendirali v 150 µL PBS. Vzorce smo pomerili s pomočjo pretočnega citometra FACS Calibur, vpliv povečanega izražanja katepsina X na nevrotrofično signaliziranje NGF pa analizirali s programsko opremo FlowJo.

#### 3.2.8 Statistično vrednotenje rezultatov

Statistično ovrednotene rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost več (n) neodvisnih bioloških meritev  $\pm$  standardna deviacija (S.D.). Razlike med vzorci smo analizirali z uporabo statistične metode Student *t*-testa dveh neodvisnih vzorcev, pri čemer smo upoštevali predpostavko o neenakosti varianc. S *t*-testom smo izračunali vrednosti P in jih ustrezno podali (\* P < 0,05 oz. \*\* P < 0,1). Razlike med vzorci smo ovrednotili kot statistično značilne, če je bila vrednost P < 0,05. Analiza je bila izvedena s pomočjo programske opreme Microsoft Excel 2016.

# 4 REZULTATI

# 4.1 VREDNOTENJE CELIČNEGA MODELA ZA PROUČEVANJE NEVRITOGENEZE

Najprej smo postavili celični model za proučevanje procesa nevritogeneze, za katerega smo izbrali celično linijo PC12. Pri slednji pride po stimulaciji z nevrotrofičnim dejavnikom NGF do diferenciacije celic in privzema nevronskega fenotipa (62). Ustreznost celičnega modela smo vrednotili tako, da smo najprej preverili celično preživetje, nato pa proučevali izraščanje nevritov in polimerizacijo aktinskih filamentov po stimulaciji celic PC12 z NGF.

#### 4.1.1 Vpliv NGF na preživetje celic PC12

Nevrotrofično delovanje dejavnika NGF smo sprva preverili z določevanjem celičnega preživetja celic PC12. Celice smo priraščali na mikrotitrske plošče, prekrite s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan stimulirali z naraščajočimi koncentracijami NGF v brez-serumskem gojišču. Po določenih časovnih točkah smo celično preživetje preverili s uporabo reagenta MTS. S pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč smo izmerili absorbance vzorcev in izračunali deleže preživelih celic. Celično preživetje celic PC12, ki smo jih stimulirali z NGF, se značilno poveča v odvisnosti od časa stimulacije z NGF (Slika 4.1), pri čemer smo ugotovili, da je največje celično preživetje mogoče opaziti pri celicah, ki smo jih stimulirali z NGF pri koncentraciji 50 ng/ml, poleg tega pa se je ta koncentracija izkazala za učinkovitejšo pri vseh časovnih točkah stimulacije.



Slika 4.1: Celično preživetje celic PC12 po stimulaciji z NGF.

Celice PC12 so bile izpostavljene naraščajočim koncentracijam NGF (0, 50, 100 ng/mL) v brezserumskem gojišču. Po treh različnih časovnih točkah stimulacije z NGF (24 h, 48 h in 72 h) je bila viabilnost celic ocenjena s testom MTS. Kontrolo predstavljajo nestimulirane celice. Vsak poskus smo izvedli v štirih paralelkah. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  standardna deviacija treh neodvisnih poskusov (n = 3). \* p < 0,05

## 4.1.2 Vpliv NGF na izraščanje nevritov celic PC12

Nevrotrofično delovanje dejavnika NGF smo preverili tudi z opazovanjem izraščanja nevritov na celicah PC12. Te smo priraščali na plošče, prekrite s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan stimulirali z naraščajočimi koncentracijami NGF v brez-serumskem gojišču. Celice smo pogledali pod invertnim mikroskopom in opazili, da se izraščanje nevritov celic PC12, ki smo jih stimulirali z NGF, značilno poveča v odvisnosti od koncentracije NGF (Slika 4.2). Ugotovili smo, da stimulacija celic PC12 z NGF močno spodbudi rast nevritov pri obeh uporabljenih koncentracijah nevrotrofičnega dejavnika, in da je največje število izraščenih nevritov mogoče opaziti pri celicah, ki smo jih stimulirali s koncentracijo NGF 100 ng/mL.



Slika 4.2: Rast nevritov po stimulaciji celic PC12 z NGF.

Celice PC12 so bile izpostavljene naraščajočim koncentracijam NGF (0, 50, 100 ng/mL). Po 24 urah stimulacije z NGF je bilo izraščanje nevritov ocenjeno z morfološkim opazovanjem s pomočjo invertnega mikroskopa. Kontrolo predstavljajo nestimulirane celice. Izrastki celic PC12 so nakazni z belimi puščicami. Slike so reprezentativne vsaj treh neodvisnih poskusov ( $n \ge 3$ ).

## 4.1.3 Vpliv NGF na polimerizacijo aktinskih filamentov celic PC12

Nevrotrofično delovanje dejavnika NGF smo dodatno preverili z določevanjem polimerizacije aktinskih filamentov celic PC12. Celice smo priraščali na plošče, prekrite s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan stimulirali z naraščajočimi koncentracijami NGF v brez-

serumskem gojišču. Po določenih časovnih točkah smo polimerizacijo aktina določili z barvilom Phalloidin-TRITC s pomočjo pretočne citometrije. Relativna polimerizacija F-aktina v celicah PC12 se značilno poveča po stimulaciji celic z NGF (Slika 4.3), pri čemer smo ugotovili, da je največjo relativno polimerizacijo F-aktina mogoče opaziti pri celicah, ki smo jih stimulirali z NGF pri koncentraciji 50 ng/mL. Poleg tega pa se je ta koncentracija izkazala za učinkovitejšo pri obeh časovnih točkah stimulacije, zato smo se v nadaljevanju pri vrednotenju vloge katepsina X v procesu rasti nevritov odločili za uporabo slednje koncentracije.



Slika 4.3: Relativna polimerizacija F-aktina v celicah PC12 po stimulaciji z NGF. Celice PC12 so bile izpostavljene naraščajočim koncentracijam NGF (0, 50, 100 ng/mL) v brezserumskem gojišču. Po dveh različnih časovnih točkah stimulacije z NGF (2 h in 24 h) je bila stopnja polimerizacije F-aktina določena s pretočno citometrijo. Kontrolo predstavljajo nestimulirane celice. Vsak poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$ standardna deviacija vsaj dveh neodvisnih poskusov ( $n \ge 2$ ). \* p < 0.05; \*\* p < 0.1

Vpliv NGF na polimerizacijo aktinskih filamentov smo potrdili tudi z metodo fluorescenčne mikroskopije. V ta namen smo celice PC12 priraščali na krovnih stekelcih, prekritih s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan stimulirali z NGF v brez-serumskem gojišču. Po določenih časovnih točkah smo celice označili z barvilom značilnim za označevanje aktinskih filamentov, pripravili trajne preparate in jih nato pogledali s pomočjo konfokalnega mikroskopa. Slika 4.4 prikazuje povečano izraščanje nevritov celic PC12, ki smo jih stimulirali z NGF v odvisnosti od časa. Ugotovili smo, da stimulacija celic PC12 z NGF privede do očitnega nevritogenega učinka, ki se kaže kot močno spodbujena rasti nevritov v obliki spodbujene polimerizacije aktinskih filamentov. Učinek dejavnika NGF je opazen pri obeh časovnih točkah stimulacije, najdaljše in najbolj razvejane izrastke pa je mogoče opaziti pri celicah, ki smo jih 24 ur stimulirali z NGF.



Slika 4.4: Polimerizacija aktinskih filamentov v izrastkih celic PC12 po stimulaciji z NGF. Celice PC12 so bile stimulirane z NGF (50 ng/mL) v brez-serumskem gojišču. Po 2 h in 24 h inkubacije so bile celice označene z barvilom za aktinske filamente Phalloidin-TRITC (rdeča fluorescenca) in barvilom za jedra Hoechst 33342 (modra fluorescenca). Izrastke opazimo pri celicah, ki so bile stimulirane z NGF, kar nakazujejo bele puščice. Slike so reprezentativne dveh neodvisnih poskusov (n = 2).

# 4.2 VPLIV NGF NA IZRAŽANJE IN LOKALIZACIJO KATEPSINA X

#### 4.2.1 Nivo izražanja in aktivnost katepsina X v diferenciranih celicah PC12

Znano je, da nevrotrofično delovanje NGF povzroča spodbujeno izraščanje nevritov v celicah PC12 (63), kar potrjujejo tudi zgornji rezultati. V nadaljevanju magistrske naloge pa smo želeli preveriti vpliv diferenciacije celic PC12 na izražanje in aktivnost katepsina X, kateremu se pripisuje vloga v uravnavanju nevritogeneze (27).

Celice PC12 smo v ta namen priraščali na plošče, prekrite s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan stimulirali z NGF v brez-serumskem gojišču. Po določenih časovnih točkah smo pripravili celične lizate za nadaljnja testiranja. Vpliv NGF na nivo izražanja katepsina X smo preverili s pomočjo direktnega ELISA testa. Opazili smo, da stimulacija celic PC12 z NGF sprva povzroči povišano izražanje katepsina X v celicah, katerega raven je najvišja po 24 h stimulacije, kot je razvidno iz Slike 4.5, medtem ko je po daljši točki stimulacije, pri 72 h in 120 h opazen upad v nivoju izražanja katepsina X. Zaradi spremembe nivoja izražanja

katepsina X po stimulaciji z NGF, smo v istih celičnih lizatih celic PC12 pomerili tudi njegovo aktivnost, in sicer s pomočjo specifičnega substrata za katepsin X Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH. Stimulacija celic z NGF je povzročila zmanjševanje aktivnosti katepsina X v odvisnosti od časa stimulacije, z rahlim neznačilnim porastom aktivnosti katepsina X le po 6 h stimulacije celic PC12 z NGF (Slika 4.6).



Slika 4.5: Nivo izražanja katepsina X v celicah PC12 po stimulaciji z NGF.

Celice PC12 so bile izpostavljene NGF koncentracije 50 ng/mL v brez-serumskem gojišču. Po različnih časovnih točkah stimulacije (3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72h in 120 h), je bil nivo izražanja katepsina X v celičnih lizatih določen s pomočjo ELISA testa. Kontrolo vsake posamezne časovne točke predstavljajo celice v brez-serumskem gojišču. Vsak poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so podani kot povprečna vrednost ± standardna deviacija vsaj treh neodvisnih poskusov (n  $\geq$  3). \* p < 0,05



Slika 4.6: Aktivnost katepsina X v celicah PC12 po stimulaciji z NGF. Celice PC12 so bile izpostavljene NGF koncentracije 50 ng/mL v brez-serumskem gojišču. Po različnih časovnih točkah (3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72h in 120 h) je bila aktivnost katepsina X izmerjena

fluorimetrično, in sicer s pomočjo za katepsin X specifičnim substratom Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH. Kontrolo vsake posamezne časovne točke predstavljajo celice v brez-serumskem gojišču. Vsak poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  standardna deviacija štirih neodvisnih poskusov (n = 4). \* p < 0,05; \*\* p < 0,1

#### 4.2.2 Lokalizacija katepsina X v diferenciranih celicah PC12

Glede na spremembe v nivoju izražanja in aktivnosti katepsina X v diferenciranih celicah PC12, smo želeli v nadaljevanju proučiti tudi lokalizacijo katepsina X v celicah PC12 po stimulaciji z NGF, pri čemer smo najprej določili prisotnost katepsina X na površini membrane omenjenih celic. V ta namen smo celice PC12 priraščali na plošče, predhodno prekrite s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan stimulirali z NGF v brez-serumskem gojišču. Po določenih časovnih točkah smo vpliv NGF na površinsko izražanje katepsina X določali s pomočjo pretočne citometrije po označevanju celic s primarnimi protitelesi, specifičnimi za prepoznavanje katepsina X, in sekundarnimi protitelesi, označenimi s fluorokromom. Rezultati pretočne citometrije so pokazali, da je stimulacija celic PC12 z NGF povzročila povišano prisotnost katepsina X na površini membrane celic PC12 v odvisnosti od časa stimulacije z NGF (Slika 4.7), pri čemer je bil opazen značilen porast katepsina X na membrani celic po 48, 72 in 120 h, medtem ko je po 24 h opazen le minimalen porast glede na kontrolo.



Slika 4.7: Površinsko izražanje katepsina X na membrani celic PC12 po stimulaciji z NGF. Celice PC12 so bile izpostavljene NGF v koncentraciji 50 ng/mL v brez-serumskem gojišču. Po različnih časovnih točkah stimulacije z NGF (24 h, 48 h, 72 h in 120 h) je bilo površinsko izražanje katepsina X, po označevanju celic s specifičnimi protitelesi proti katepsinu X in sekundarnimi

protitelesi, označenim z Alexa Fluor 555, izmerjeno s pomočjo pretočne citometrije. Kontrolo vsake posamezne časovne točke predstavljajo celice v brez-serumskem gojišču.. Vsak poskus smo izvedli v eni paralelki. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  standardna deviacija treh neodvisnih poskusov (n = 3). \* p < 0,05

#### 4.2.3 Vpliv NGF na vezikularni transport katepsina X v celicah PC12

Membranski transport in dostava hranil sta nujna za rast aksonov in dendritov, ki sta značilna kazalca nevritogeneze. Vezikli, ki imajo lastnosti reciklirajočih endosomov, poznih endosomov ali lizosomov, so zelo pomembni pri membranskem transportu in transportu proteinov tekom procesa rasti in podaljševanja nevritov (11, 20). Zato nas je v nadaljevanju magistrske naloge zanimal vpliv diferenciacije celic PC12 na vezikularni transport katepsina X, pri čemer smo opazovali lokalizacijo katepsina X v posameznih veziklih, in sicer v lizosomih ter zgodnjih in poznih endosomih. Celice PC12 smo priraščali na krovnih stekelcih, predhodno prekritih s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan stimulirali z NGF v brezserumskem gojišču. Po določeni časovni točki smo celice označili s primarnimi protitelesi proti katepsinu X skupaj s protitelesi proti LAMP1, ki so specifični za označevanje lizosomov, EEA1, ki so specifični za označevanje zgodnjih endosomov, ali Rab7, ki so specifični za označevanje poznih endosomov, ter nato še s sekundarnimi protitelesi, ki so bila označena s fluorokromom. Pripravljene trajne preparate smo nato pogledali s pomočjo konfokalnega mikroskopa ter ocenili kolokalizacijo katepsina X s posameznimi označevalci veziklov. Opazimo, da se kolokalizacija katepsina X z označevalcem LAMP1 v celicah PC12, ki smo jih stimulirali z NGF, značilno zmanjša v odvisnosti od stimulacije z NGF, pri čemer smo ugotovili, da je v kontrolnih celicah katepsin X močno prisoten v lizosomih, medtem ko je po stimulaciji celic z NGF vidna zmanjšana kolokalizacija katepsina X z lizosomskim označevalcem LAMP1 (Slika 4.8A). Nasprotno pa smo ugotovili pri kolokalizaciji katepsina X z označevalcema endosomov, EEA1 in Rab7. Ugotovili smo, da stimulacija celic PC12 z NGF povzroči močnejšo kolokalizacijo katepsina X tako z označevalcem zgodnjih enodosomv EEA1 (Slika 4.8B), kot tudi z označevalcem poznih endosomov Rab7 (Slika 4.8C) v primerjavi z nestimuliranimi celicami.



Slika 4.8: Lokalizacija katepsina X v lizosomih, zgodnjih endosomih in pozih endosomih v celicah PC12 po stimulaciji z NGF.

(A-C) Celice PC12 so bile izpostavljene NGF v koncentraciji 50 ng/mL v brez-serumskem gojišču. Po 24 urah stimulacije z NGF ter naknadnem barvanju s protitelesi, je bil vezikularni transport katepsina X ocenjen s konfokalnim mikroskopom. A. Celice, označene s protitelesi proti LAMP1 in protitelesi proti katepsinu X, ter v nadaljevanju s sekundarnimi protitelesi z Alexa Fluor 488 (zelena fluorescenca) in Alexa Fluor 555 (rdeča fluorescenca). B. Celice, označene s protitelesi proti EEA1 in protitelesi proti katepsinu X, ter v nadaljevanju s sekundarnimi protitelesi z Alexa Fluor 488 (zelena fluorescenca) in Alexa Fluor 555 (rdeča fluorescenca). C. Celice, označene s protitelesi proti Rab7 in protitelesi proti katepsinu X, ter v nadaljevanju s sekundarnimi protitelesi z Alexa Fluor 488 (zelena fluorescenca) in Alexa Fluor 555 (rdeča fluorescenca). Jedra celic so označena z barvilom Hoechst 33342 (modra fluorescenca). Kontrolo vsake posamezne časovne točke predstavljajo celice v brez-serumskem gojišču. Slike so reprezentativne dveh neodvisnih poskusov. Grafi desno predstavljajo oceno kolokalizacije dveh tarčnih proteinov (rumemo-oranžna fluorescenca) in je podana kot povprečna vrednost  $\pm$  standardna deviacija dveh neodvisnih poskusov (n = 2). \* p < 0,05

## 4.3 VPLIV ZAVIRANJA NGF-POSREDOVANIH SIGNALNIH POTI NA AKTIVNOST KATEPSINA X

Diferenciacija celic PC12 vpliva tako na nivo izražanja in aktivnost katepsina X kot tudi na vezikularno lokalizacijo katepsina X, kar nakazuje na vpletenost katepsina X v proces nevritogeneze. Slednji proces je uravnavan z aktivacijo raznih signalnih poti, zato smo v nadaljevanju želeli preveriti, ali zavrto delovanje nevrotrofičnega dejavnika spremeni aktivnost katepsina X v celicah. Celice smo priraščali na ploščah, prekritim s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan pred-tretirali z različnimi zaviralci signalnih kinaz, vpletenih v NGF-spodbujeno nevritogenezo. Uporabili smo sledeče zaviralce v brez-serumskem gojišču; zaviralec tirozin-kinazne aktivnosti Trk receptorja K252a, zaviralec kinaze PI3K Wortmannin, zaviralec kinaze MEK U0126, zaviralec kinaze MEK5 BIX02189, zaviralec kinaze ROCK Y27632 in zaviralec Rap1 GGTI-298. Po 1 h pred-inkubaciji z zaviralci, smo celice nadalje stimulirali z NGF in po določeni časovni točki fluorimetrično izmerili relativno aktivnost katepsina X z uporabo specifičnega substrata za katepsin X Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH.

Rezultati merjenja aktivnosti katepsina X v celičnih lizatih so pokazali, da nobeden od uporabljenih zaviralcev ni statistično značilno vplival na zmanjšano aktivnost katepsina X, posredovano s stimulacijo celic PC12 z NGF (Slika 4.9). Ugotovili smo, da sta največji vpliv na porast aktivnosti katepsina X v diferenciranih celicah, vendar neznačilen, izkazovala zaviralca Y27632 in GGTI-298, zato smo njun vpliv na aktivnost katepsina X v diferenciranih celicah v nadaljevanju podrobneje ovrednotili.







Celice PC12 so bile najprej pred-tretirane 1 h z zaviralci K252a (200 nM), Wortmannin (2  $\mu$ M), Y27632 (10  $\mu$ M), GGTI-298 (10  $\mu$ M), U0126 (5  $\mu$ M) ali BIX02189 (1  $\mu$ M) v brez-serumskem gojišču, nato pa stimulirane z NGF koncentracije 50 ng/mL. Po 24 urah stimulacije je bila aktivnost katepsina X izmerjena fluorimetrično, in sicer s pomočjo za katepsin X specifičnim substratom Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH. Kontrolo predstavljajo nestimulirane celice. Vsak poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so podani kot povprečna vrednost ± standardna deviacija dveh neodvisnih poskusov (n = 2). \*\* p < 0,1

Vpliv prisotnosti zaviralcev Y27632 in GGTI-298 na aktivnost katepsina X v diferenciranih celicah PC12 smo ponovili na enak način, kot je opisan zgoraj, le da smo aktivnost katepsina X opazovali v daljšem časovnem razmiku. Pri časovnih točkah 3 h, 6 h in 24 h nismo zaznali značilnega vpliva zaviralcev na zmanjšano aktivnost katepsina X po stimulaciji celic PC12 z NGF (Slika 4.10), medtem ko smo pri daljših časovnih točkah stimulacije, 48 h, 72 h in 120 h, v prisotnosti zaviralca Y27632 opazili značilno zavrtje zmanjšane aktivnosti katepsina X kot posledica delovanja NGF. Enak učinek na aktivnost katepsina X v diferenciranih celicah PC12 smo opazili tudi v prisotnosti zaviralca GGTI-298.



Slika 4.10: Aktivnost katepsina X v prisotnosti zaviralcev Y27632 in GGTI-298 po stimulaciji celic PC12 z NGF.

Celice PC12 so bile najprej pred-tretirane z zaviralcema Y27632 (10  $\mu$ M) ali GGTI-298 (10  $\mu$ M) v brez-serumskem gojišču za 1 h, nato pa stimulirane z NGF koncentracije 50 ng/mL. Po različnih časovnih točkah stimulacije (3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h in 120 h) je bila aktivnost katepsina X izmerjena fluorimetrično, in sicer s pomočjo za katepsin X specifičnim substratom Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH. Kontrolo vsake posamezne časovne točke predstavljajo celice v brez-serumskem gojišču. Vsak poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  standardna deviacija treh neodvisnih poskusov (n = 3). \* p < 0,05

## 4.4 VPLIV REKOMBINATNEGA KATEPSINA X NA NEVROTROFIČNO DELOVANJE NGF

Pokazali smo vpliv zaviralcev signalnih kinaz na aktivnost katepsina X, ki so del signalne kaskade, posredovane z nevrotrofičnimi dejavniki, kar dodatno potrjuje vpletenost katepsina X v procesu nevritogeneze. Zato smo v zadnjem delu magistrske naloge želeli ovrednotiti vpliv katepsina X na diferenciacijo celic PC12, posredovano s stimulacijo z NGF. Pri tem smo celice najprej pred-tretirali z rekombinantnim katepsinom X ter po nadaljnji stimulaciji celic z NGF preverili vpliv katepsina X na nevritogene učinke NGF.

#### 4.4.1 Vpliv NGF na rast nevritov ob prisotnosti rekombinantnega katepsina X

Celice PC12 smo priraščali na krovnih stekelcih, prekritih s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan pred-tretirali z rekombinantnim katepsinom X v brez-serumskem gojišču za 1 uro, nato pa jih nadalje stimulirali z NGF. Po določenih časovnih točkah smo celice označili z

barvilom za označevanje aktinskih filamentov, barvilom Phalloidin označenim s TRITC, pripravili trajne preparate in jih nato pogledali s pomočjo konfokalnega mikroskopa.

Slika 4.11 prikazuje očitno zmanjšanje izrastkov v celicah PC12, stimuliranih z NGF v prisotnosti rekombinantnega katepsina X. Ugotovili smo, da je po 2 urah stimulacije z NGF tvorba in rast nevritov oz. polimerizacija aktinskih filamentov v zametkih nevritov povsem zavrta v prisotnosti dodanega katepsina X, medtem ko po 24 urah stimulacije z NGF lahko opazimo rast nevritov v prisotnosti rekombinantnega katepsina X, vendar pa je rast nevritov prisotna v bistveno manjšem obsegu kot pri sami stimulaciji z NGF. Najdaljše in najbolj razvejane izrastke je mogoče opaziti pri celicah, ki smo jih 24 ur stimulirali z NGF v odsotnosti rekombinantnega katepsina X, kar nakazuje na zavrtje rasti nevritov v prisotnosti rekombinantnega katepsina X.



Slika 4.11: Vpliv katepsina X na polimerizacijo aktinskih filamentov v izrastkih celic PC12 po stimulaciji z NGF.

Celice PC12, pred-tretirane z rekombinantnim katepsinom X (rCatX) (50 nM) v brez-serumskem gojišču za 1 h, ter nato stimulirane z NGF (50 ng/mL). Po 2 h in 24 h inkubacije so bile celice označene z barvilom za aktinske filamente Phalloidin-TRITC (rdeča fluorescenca) in barvilom za jedra Hoechst 33342 (modra fluorescenca). Izrastke opazimo pri celicah, ki so bile stimulirane z NGF, kar nakazujejo bele puščice, medtem ko prisotnost rCatX močno zmanjša število izrastkov. Slike so reprezentativne dveh neodvisnih poskusov (n =2).

# 4.4.2 Vpliv NGF-posredovane aktivacije signalnih poti ob prisotnosti rekombinantnega katepsina X

V nadaljevanju smo proučili vpliv katepsina X na nevrotrofično signaliziranje v celicah PC12, posredovane z dejavnikom NGF. Celice smo priraščali na ploščah, prekritimi s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan pred-tretirali z rekombinantnim katepsinom X v brezserumskem gojišču za 1 uro, ter jih nadalje stimulirali z NGF. Po določenih časovnih točkah smo pripravili celične lizate za določitev fosforiliranih in celokupnih oblik kinaz ERK1/2 in Akt. Proteine v lizatu smo ločili med seboj s pomočjo NaDS PAGE, prenos proteinov iz gela na nitrocelulozno membrano pa smo izvedli s prenosom western. Proteine na membrani smo detektirali z označevanjem s specifičnimi protitelesi proti fosforilirani obliki ERK1/2 (phERK1/2) ali fosforilirani obliki Akt (phAkt), ter proti celokupnima oblikama ERK1/2 in Analiza stopnje fosforilacije signalnih kinaz, udeleženih pri NGF delovanju, je Akt. pokazala, da NGF močno aktivira kinazi ERK1/2 in Akt pri obeh časovnih točkah stimulacije, kar je razvidno iz povišanega signala fosforiliranih oblik kinaz (Slika 4.12). Prisotnost dodanega katepsina X je rahlo zmanjšala fosforilacijo in s tem aktivacijo kinaze ERK1/2 (Slika 4.18A), medtem ko je katepsin X značilno zmanjšal z NGF povišano fosforilacijo kinaze Akt pri obeh časovnih točkah stimulacije (Slika 4.18B).



Slika 4.12: Vpliv katepsina X na fosforilacijo ERK1/2 in Akt v celicah PC12 po stimulaciji z NGF.

Celice PC12 so bile najprej pred-tretirane z rekombinantnim katepsinom X (rCatX) v koncentraciji 50 nM ter nato stimulirane z NGF v koncentraciji 50 ng/mL v dveh časovnih točkah (15 in 60 min). Vpliv katepsina X na nevrotrofično signaliziranje NGF smo proučili s pomočjo NaDS PAGE in prenosa western. Kontrolo vsake posamezne časovne točke predstavljajo celice v brez-serumskem gojišču. Vsak poskus smo izvedli v eni paralelki. Grafa spodaj predstavljata semi-kvantitativno analizo intenzitete lis in podajata rezultate kot povprečna vrednost dveh neodvisnih poskusov (n = 2).

## 4.5 VPLIV POVEČANEGA IZRAŽANJA KATEPSINA X NA NEVROTROFIČNE UČINKE, POSREDOVANE Z NGF

Rekombinantni katepsin X ni povsem zavrl nevrotrofično delovanje, posredovano z NGF, zato smo želeli nazadnje preveriti še vpliv endogenega nadizražanja katepsina X v celicah PC12 na nevrotrofično delovanje NGF. Celice PC12 smo transfecirali s konstruktom pcDNA3/CatX in dobili stabilno celično linijo z nadizraženim katepsinom X (PC12 pcDNA3/CatX), kar smo potrdili z določanjem aktivnosti katepsina X v celičnem lizatu transfeciranih celic PC12 v primerjavi z lizatom netransfeciranih celic (PC12 wt).

#### 4.5.1 Vpliv nadizraženega katepsina X na rast nevritov, posredovano z NGF

Vpliv nadizraženega katepsina X v celicah PC12 na nevrotrofično delovanje NGF smo preverili z opazovanjem rasti nevritov. Celice PC12 wt in PC12 pcDNA3/CatX smo priraščali na plošče, prekrite s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan stimulirali z naraščajočimi koncentracijami NGF v brez-serumskem gojišču. Po določenih časovnih točkah smo rast nevritov pogledali pod invertnim mikroskopom in opazili, da je izraščanje nevritov po stimulaciji z NGF v celicah z nadizraženim katepsinom X (PC12 pcDNA3/CatX) zmanjšano in prisotno v manjšem obsegu, kot je to mogoče opaziti po stimulaciji celic PC12 wt (Slika 4.13). Podobne rezultate smo dobili pri določevanju polimerizacije aktinskih filamentov s pomočjo pretočne citometrije. Ugotovili smo, da stimulacija celic PC12 z nadizraženim katepsinom X z NGF ni povzročila značilnega povišanja polimerizacije aktina, kot je to opazno pri celicah PC12 wt, kjer NGF stimulacija značilno poviša polimerizacijo aktina pri obeh časovnih točkah stimulacije, pri 2 in 24 urah (Slika 4.14).



Slika 4.13: Rast nevritov celic PC12 z nadizraženim katepsinom X po stimulaciji z NGF. Celice PC12 wt in PC12 pcDNA3/CatX so bile izpostavljene NGF v naraščajočih koncentracijah (0, 50, 100 ng/mL) v brez-serumskem gojišču. Po 24 urah stimulacije z NGF je bilo izraščanje nevritov ocenjeno s pomočjo invertnega mikroskopa. Kontrolo predstavljajo nestimulirane celice PC12 wt in PC12 pcDNA3/CatX. Izrastki celic so nakazani z belimi puščicami. Slike so reprezentativne vsaj treh neodvisnih poskusov ( $n \ge 3$ ).



Slika 4.14: Polimerizacija aktina celic PC12 z nadizraženim katepsinom X po stimulaciji z NGF. Celice PC12 wt in PC12 pcDNA3/CatX so bile izpostavljene NGF (50 ng/mL) v brez-serumskem gojišču. Po dveh različnih časovnih točkah stimulacije z NGF (2 h in 24 h) je bila relativna polimerizacija F-aktina določena s pretočno citometrijo. Kontrolo vsake posamezne časovne točke predstavljajo celice v brez-serumskem gojišču. Vsak poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so podani kot povprečna vrednost ± standardna deviacija vsaj dveh neodvisnih poskusov (n ≥ 2). \* p < 0.05

#### 4.5.2 Vpliv nadizraženega katepsina X na NGF-posredovano aktivacijo signalnih poti

In nenazadnje smo preverili vpliv nadizraženega katepsina X v celicah PC12 na nevrotrofično signaliziranje NGF. Celice PC12 wt in PC12 pcDNA3/CatX smo priraščali na plošče, prekrite s poli-L-lizinom, in jih naslednji dan stimulirali z NGF v brez-serumskem gojišču. Po določeni časovni točki smo celice označili s primarnimi protitelesi proti fosforiliranima oblikama kinaz ERK1/2 (phERK1/2) in Akt (phAkt) in ustreznimi sekundarnimi protitelesi, označenimi s fluorokromom. Nivo fosforilacije posamezne kinaze smo določali s pomočjo pretočne citometrije. Stimulacija celic PC12 wt z NGF po pričakovanjih povzroči povišanje fosforilacije obeh kinaz, tako kinaze ERK1/2, kot kinaze Akt (Slika 4.15). Stimulacija transfeciranih celic PC12 z NGF ni izkazovala takšnega povišanja fosforilacije kinaz ERK1/2 in Akt v primerjavi s stopnjo fosforilacije kinaz v celicah PC12 wt, kar pomeni, da je nadizražen katepsin X v transfeciranih celicah zavrl z NGF spodbujeno aktivacijo signalne kaskade, ki je ključna za izkazovanje nevritogenega učinka dejavnika NGF.



Slika 4.15: Aktivacija kinaz ERK1/2 in Akt v celicah PC12 z nadizraženim katepsinom X po stimulaciji z NGF.

Celice PC12 wt in PC12 pcDNA3/CatX so bile izpostavljene NGF v koncentraciji 50 ng/mL v brezserumskem gojišču. Po 1 h stimulacije z NGF je bila relativna fosforilacija kinaz ERK1/2 in Akt določena s pretočno citometrijo. Kontrolo predstavljajo celice v brez-serumskem gojišču. Vsak poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so podani kot povprečna vrednost ± standardna deviacija dveh neodvisnih poskusov (n =2). \* p < 0.05; \*\* p < 0.1

# 5 RAZPRAVA

Za pravilno in ustrezno delovanje CŽS je nujno potrebno natančno oblikovanje visoko specifičnih stikov in povezovanje med nevroni, ki predstavljajo osnovne gradnike živčevja (1). Poleg nevronov najdemo v človeških možganih tudi glija celice, ki sproščajo nevrotrofične dejavnike, med katere uvrščamo tudi NGF (3). Zanje je značilno, da nudijo trofično podporo nevronskim celicam in so zato ključnega pomena v nevritogenezi, ki je natančno uravnavan in kompleksen proces. Rast in izraščanje nevritov je tudi glavni kazalec z NGF-spodbujene diferenciacije celic PC12, ki se kaže kot preoblikovanje aktinskega citoskeleta, pri čemer so udeležene tudi proteaze (5, 64).

Vedno več je dokazov, da cisteinska proteaza katepsin X v celicah PC12 preko uravnavanja nevrotrofičnega delovanja  $\gamma$ -enolaze, zmanjša celično preživetje in nevritogenezo. V okviru magistrske naloge nas je zanimal mehanizem delovanja katepsina X v procesu nevritogeneze. Želeli smo opredeliti nivo izražanja in aktivnost katepsina X ter njegovo vezikularno lokalizacijo v diferenciranih celicah ter opredeliti vlogo in mehanizem delovanja katepsina X v procesu rasti nevritov.

Eksperimentalni del magistrske naloge smo začeli s postavitvijo celičnega modela za proučevanje nevritogeneze oz. rasti nevritov, pri čemer smo uporabili celično linijo PC12. Z NGF diferencirane celice PC12 privzamejo fenotip nevronskih celic, zato so pogosto uporabljen model za proučevanje morfoloških sprememb v procesu diferenciacije, kot so brstenje nevritov, podaljševanje aksonov in razraščanje dendritov. Vezava NGF na visoko afinitetne tirozin-kinazne receptorje TrkA aktivira številne signalne poti, ki so udeležene v procesu nevritogeneze in privedejo do reorganizacije aktinskega citoskeleta ter nastanka in rasti nevritov (1, 62). S prvim poskusom smo želeli preveriti vpliv delovanja nevrotrofičnega dejavnika NGF na celično preživetje celic PC12. Rezultati so pokazali, da se preživetje celic PC12 značilno poveča v odvisnosti od koncentracije in časa stimulacije z NGF. S tem smo potrdili že dokazano, da NGF preko vezave na receptor TrkA in posledične fosforilacije tirozinskih ostankov, aktivira signalne poti, ki omogočajo preživetje nevronov (6). Poleg tega pa je nevrotrofično delovanje NGF ključnega pomena tudi v procesu nevritogeneze, t. i. procesu rasti nevritov, ki je bil predmet proučevanja v magistrski nalogi. V ta namen smo celice PC12 stimulirali z NGF in opazovali povečanje števila izrastkov pod invertnim mikroskopom. Rezultati so pokazali, da se izraščanje nevritov značilno poveča v odvisnosti

od naraščajočih koncentracij NGF. S tem poskusom smo potrdili, da ima NGF ključno vlogo pri povečanem izraščanju nevritov in posledično spodbujanju diferenciacije celic PC12 v nevronske celice (6). Eden izmed zgodnjih dogodkov nevritogeneze je tudi reorganizacija citoskeleta in polimerizacija aktinskih filamentov (8). Zato nas je zanimal vpliv nevrotrofičnega delovanja NGF na polimerizacijo aktina. Z metodo pretočne citometrije in uporabo barvila Phalloidin-TRITC smo potrdili, da se relativna polimerizacija F-aktina v celicah značilno poveča v odvisnosti od stimulacije z NGF ter na ta način vpliva na reorganizacijo aktinskega citoskeleta. To smo želeli dodatno potrditi, zato smo v ta namen pripravili trajne preparate za konfokalno mikroskopijo. Na podlagi pridobljenih slik s konfokalnim mikroskopom smo ugotovili, da je najbolj izrazito polimerizacijo aktina mogoče opaziti pri najdaljših in najbolj razvejanih izrastkih nevritov, in sicer po 24-urni stimulaciji z NGF. Stimuliranje celic z NGF je torej povzročilo polimerizacijo F-aktina v nastajajočih izrastkih in posledično diferenciacijo celic PC12.

Katepsin X je cisteinska karboksipeptidaza, ki ravno tako kot NGF uravnava procese nevritogeneze in preživetje nevronskih celic. Razlika med njima je v tem, da je NGF s svojim nevrotrofičnim učinkom odgovoren za nevritogenezo, katepsin X pa s svojim proteolitičnim delovanjem, cepitvijo C-končnega dipeptida  $\gamma$ -enolaze, izniči z  $\gamma$ -enolazo spodbujeno rast nevritov in celično preživetje (27). Kljub poznani proteolitični vlogi katepsina X v nevronskih celicah, pa vloga katepsina X v procesu rasti nevritov in diferenciaciji celic ni povsem razjasnjena. Zato smo v magistrski nalogi želeli preveriti vpliv diferenciacije celic PC12 na izražanje in aktivnost katepsina X ter vlogo le tega v uravnavanju nevritogeneze. V ta namen smo celice PC12 stimulirali z NGF v različnih časovnih točkah ter nato nivo izražanja katepsina X preverili s pomočjo direktnega ELISA testa. Rezultati so pokazali, da nevrotrofično delovanje NGF sprva (v prvih 24 urah) povzroči povišan nivo izražanja katepsina X, po daljši točki stimulacije pa opazimo celo upad v nivoju izražanja katepsina X. Poleg izražanja katepsina X v diferenciranih celicah PC12, smo želeli preveriti tudi njegovo aktivnost. Za ta poskus smo uporabili iste celične lizate in aktivnost katepsina X pomerili s pomočjo Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH, specifičnega substrata za katepsin X. Rezultati so pokazali, da stimulacija celic PC12 z NGF povzroči zmanjševanje aktivnosti katepsina X v odvisnosti od časa stimulacije. Opazimo sicer rahel neznačilen porast v aktivnosti katepsina X po 6 urah stimulacije z NGF, po 24 urah stimulacije celic z NGF pa prične aktivnost katepsina X upadati v primerjavi s kontrolnimi celicami pri posamezni časovni točki. Rezultati skupaj nakazujejo, da diferenciacija celic PC12 v splošnem zmanjša tako nivo izražanja kot tudi aktivnost katepsina X, medtem ko stimulacija pri krajšem časovnem intervalu (do 24 h), kjer pride le do tvorbe in rasti nevritov in diferenciacija celic še ni značilna, rahlo poviša nivo izražanja kot tudi aktivnost katepsina X.

Tako kot NGF tudi γ-enolaza izkazuje nevrotrofičnim dejavnikom podobno delovanje, vendar je tu ključnega pomena prenos  $\gamma$ -enolaze iz citosola do plazemske membrane. Znano je, da katepsin X uravnava nevrotrofično delovanje  $\gamma$ -enolaze in hkrati s cepitvijo dipeptida onemogoči prenos do plazemske membrane (5, 23). Glede na ugotovljeni nivo izražanja in aktivnosti katepsina X, nas je dodatno zanimala še lokalizacija katepsina X v diferenciranih celicah PC12. Z metodo pretočne citometrije in uporabo primarnih protiteles, specifičnih za katepsin X ter sekundarnih protiteles, označenih s fluorokromom, smo dokazali, da je stimulacija celic PC12 z NGF povzročila povečano prisotnost katepsina X na površini membrane celic. Značilen porast katepsina X na membrani celic je bilo mogoče opaziti po daljši točki stimulacije z NGF. To pomeni, da se skupaj s katepsinom X kolokalizira tudi yenolaza, pri čemer katepsin X cepi C-terminalni konec γ-enolaze ter tako zmanjša oz. izniči njeno nevrotrofično aktivnost in posledično zavira nevritogenezo (27). Zgornji rezultati so torej pokazali, da diferenciacija celic povzroči prehod katepsina X iz citosola, kjer se nahaja v lizosomih, na površino celične membrane, pri čemer pa je prenos do plazemske membrane lahko omogočen s pomočjo vezikularnega transporta proteinov. Zato nas je v nadaljevanju zanimal vpliv diferenciacije celic PC12 na vezikularni transport katepsina X. V ta namen smo uporabili označevalce za posamezne vezikle ter pripravili trajne preparate za konfokalno mikroskopijo. Na podlagi pridobljenih slik s konfokalnim mikroskopom smo ugotovili, da je po stimulaciji celic z NGF močno zmanjšana kolokalizacija katepsina X z označevalcem LAMP1, ki je lizosomski označevalec. Močnejšo kolokalizacijo katepsina X po stimulaciji celic z NGF smo opazili tako z označevalcem zgodnjih endosomov EEA1, kot tudi z označevalcem poznih endosomov Rab7. Hkrati je bila ta kolokalizacija bolj opazna ob plazemski membrani celice, kar nakazuje, da stimulacija celic PC12 z NGF povzroči lokalizacijo oz. prenos katepsina X v območje rasti nevritov, in sicer v obliki zgodnjih in poznih endosomov. S tem smo dodatno nakazali, da je katepsin X udeležen v procesu rasti nevritov.V drugem delu magistrske naloge smo izhajali iz že dokazanega dejstva, da nevrotrofično delovanje NGF pomembno vpliva na nivo izražanja in aktivnost katepsina X ter njegovo vezikularno lokalizacijo v celicah PC12, zato smo v nadaljevanju želeli proučiti kako različni zaviralci signalnih kinaz, vpletenih v NGF spodbujeno nevritogenezo, vplivajo na aktivnost katepsina X. V ta namen smo celice najprej pred-teretirali z zaviralci signalnih kinaz (K252a, Wortmannin, U0126, BIX02189, Y27632 in GGTI-298) in nato celice še nadalje stimulirali z NGF, relativno aktivnost katepsina X pa smo izmerili fluorimetrično s pomočjo Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH, specifičnega substrata za katepsin X. Rezultati so pokazali, da nobeden od testiranih zaviralcev ni značilno vplival na zmanjšano aktivnost katepsina X v celicah, stimuliranih z NGF. Neznačilen porast v aktivnosti katepsina X v diferenciranih celicah PC12 smo opazili v primeru uporabe zaviralca kinaze ROCK Y27632 in zaviralca Rap1 GGTI-298, zato smo v nadaljevanju podrobneje proučili in ovrednotili njun vpliv na aktivnost katepsina X v diferenciranih celicah. Poskus smo ponovili na enak način, le da smo tokrat uporabili samo zaviralca Y27632 in GGTI-298, njun vpliv na aktivnost katepsina X pa smo opazovali v daljših časovnih točkah. Rezultati so pokazali, da je značilno zavrtje zmanjšane aktivnosti katepsina X mogoče opaziti v celicah, ki so bile dlje časa stimulirane z NGF, in sicer tako v primeru zaviralca Y27632 kot tudi GGTI-298. Ugotovili so, da NGF z vezavo na receptor TrkA aktivira ROCK signalno pot, ki zavira podaljševanje nevritov in rast aksonov ter negativno uravnava polimerizacijo aktina, kar posledično zavira nevritogenezo (8). Y27632 je nespecifičen zaviralec ROCK signalne poti, ki poveča regeneracijo aksonov in spodbuja nevritogenezo, hkrati pa deluje nevroprotektivno, saj poveča preživetje nevronov (18). Rezultati kažejo na povišano aktivnost katepsina X v diferenciranih celicah PC12 v prisotnosti zaviralca Y27632. Po drugi strani, stimulacija celic PC12 z NGF aktivira protein Rap1, ki povzroči povečano izražanje ARAP3 in posledično nezmožnostjo aktivacije ROCK kinaze, kar privede do pospešene nevritogeneze (14). GGTI-298 zavira Rap1 in posledično pospešuje aktivacijo ROCK signalne poti ter na ta način zavira nevritogenezo, kar se kaže v povečani aktivnosti katepsina X. Pri merjenju aktivnosti katepsina X v lizatih diferenciranih celic smo prav tako opazili povišano aktivnost katepsina X prisotnosti zaviralca GGTI-298, kar se nekoliko izključuje z dobljenimi rezultati aktivnosti katepsina X v prisotnosti zaviralca Y27632, saj imata ta dva zaviralca nasprotno si delovanje v procesu rasti nevritov. Kakorkoli, signalna pot ROCK je ključnega pomena pri uravnavanju vezikularnega transporta proteinov, medtem ko je Rap1 udeležen v signalni kaskadi, ki vodi v neposreden nevritogeni učinek (14, 21), zato gre verjetno za uravnavanje aktivnosti katepsina X na različnih nivojih, ki pa ostajajo še nepojasnjeni. Glede na dobljene rezultate o spremembi nivoja izražanja in aktivnosti katepsina X kot tudi njegove lokalizacije, smo v nadaljevanju magistrske naloge želeli proučiti vpliv katepsina X na nevrotrofično delovanje NGF v celicah PC12. Pokazali smo, da nevrotrofično delovanje NGF poveča izraščanje nevritov celic PC12, želeli pa smo preveriti kakšen je vpliv nevrotrofičnega delovanja NGF na rast nevritov ob prisotnosti rekombinantnega katepsina X. Celice smo ustrezno tretirali in označili z barvilom Phalloidin-TRITC ter pripravili trajne preparate za konfokalno mikroskopijo. Na podlagi pridobljenih slik s konfokalnim mikroskopom smo ugotovili, da je polimerizacija aktinskih filamentov in posledično rast nevritov v diferenciranih celicah v prisotnosti rekombinantnega katepsina X zmanjšana ali pa celo popolnoma zavrta. Na ta način smo še dodatno potrdili že dokazano, da katepsin X zmanjšuje izraščanje nevritskih izrastkov in tako zmanjšuje nevritogenezo (27). V nadaljevanju smo se osredotočili na signalne poti, spodbujene z nevrotrofičnim delovanjem NGF ter jih proučevali v prisotnosti rekombinantnega katepsina X. Proučiti smo želeli dve najpomembnejši signalni kinazi, kinazi ERK1/2 in Akt, ki sta udeleženi v nevrotrofičnem signaliziranju dejavnika NGF in preko katerih NGF po vezavi na receptor TrkA posreduje nevrotrofične oz. nevritogene učinke (12). Celice PC12 smo najprej pred-tretirali z rekombinantnim katepsinom X ter jih nato še stimulirali z NGF za 15 in 60 minut. Nato smo pripravili celične lizate in ločene proteine na membrani označili s specifičnimi protitelesi za določitev fosforiliranih in celokupnih oblik omenjenih kinaz. Rezultati so pokazali, da stimulacija celic z NGF močno aktivira fosforilirano obliko obeh kinaz, ERK1/2 in Akt, in sicer pri obeh časovnih točkah stimulacije, kar posledično vodi do spodbujene rasti nevritov in nadalje v diferenciacijo celic. Zanimivo pa smo pri diferenciranih celicah PC12 v prisotnosti rekombinantnega katepsina X opazili rahlo zmanjšano fosforilacijo in posledično aktivacijo kinaze ERK1/2, medtem ko smo v primeru kinaze Akt opazili močno zmanjšanje fosforilacije in posledično njene aktivacije. To pomeni, da rekombinantni katepsin X v celicah PC12 po stimulaciji z NGF delno zavira fosforilacijo kinaz ERK1/2 in Akt ter posledično aktivacijo signalnih poti, kar se kaže kot zmanjšano nevrotrofično delovanje NGF, celično preživetje in zmanjšana diferenciacija celic.

V zadnjem delu magistrske naloge pa smo želeli preveriti vpliv endogenega nadizražanja katepsina X v celicah PC12 na nevrotrofično delovanje NGF. Ker rekombinantni katepsin X ni v celoti zavrl nevrotrofičnega delovanja NGF, smo se odločili, da v ta namen pripravimo stabilno celično linijo PC12 z nadizdraženim katepsinom X, PC12 pcDNA3/CatX. Najprej nas je zanimalo kako nadizraženi katepsin X vpliva na NGF-posredovano rast nevritov, zato smo primerjali tvorbo in rast nevritov z NGF stimuliranih netransfeciranih celic PC12 wt in transfeciranih celic PC12 pcDNA3/CatX. Pod invertnim mikroskopom smo opazovali rast nevritov in ugotovili, da je izraščanje nevritov v celicah PC12 pcDNA3/CatX, stimuliranih

z NGF, oslabljeno in manjše v primerjavi s celicami PC12 wt po stimulaciji z NGF. S tem smo dokazali, da je nadizraženi katepsin X v diferenciranih celicah odgovoren za zmanjšano rast nevritov v procesu nevritogeneze. Slednje smo želeli v nadaljevanju potrditi tudi z določevanjem polimerizacije aktinskih filamentov, in sicer s pomočjo pretočne citometrije. Dobljeni rezultati so pokazali podobno kot pri prejšnjem poskusu, saj smo opazili, da stimulacija celic PC12 wt z NGF povzroči značilno zvišanje količine F-aktina oz. povečanje polimerizacije aktinskih vlaken, medtem ko stimulacija celic PC12 pcDNA3/CatX z NGF ne povzroči tako značilnega povišanja polimerizacije F-aktina. To še dodatno dokazuje, da nadizraženi katepsin X zmanjša nevrotrofično delovanje NGF, polimerizacijo F-aktina in posledično izraščanje nevritov. V prejšnjih poskusih smo dokazali, da rekombinantni katepsin X delno zmanjša fosforilacijo in posledično aktivacijo signalnih kinaz v celicah, stimuliranih z NGF. V nadaljevanju pa nas je zanimalo kako nadizraženi katepsin X vpliva na NGF-posredovano aktivacijo signalnih poti. Zopet smo med sabo primerjali celice PC12 wt in PC12 pcDNA3/CatX, ki smo jih najprej stimulirali z NGF, jih nato označili s primarnimi protitelesi proti fosforiliranima oblikama kinaz ERK1/2 in Akt in z ustreznimi sekundarnimi protitelesi, ter nivo fosforilacije posamezne kinaze določili s pomočjo pretočne citometrije. Rezultati so pokazali, da stimulacija celic PC12 wt z NGF povzroči pričakovano povečano fosforilacijo in aktivacijo tako kinaze ERK1/2 kot kinaze Akt, medtem ko stimulacija celic PC12 pcDNA3/CatX z NGF povzroči bistveno manjšo fosforilacijo in aktivacijo omenjenih kinaz. S tem smo dokazali, da nadizraženi katepsin X prepreči nevrotrofično delovanje NGF z zavrtjem fosforilacije signalnih kinaz ERK1/2 in Akt, ki so del signalne kaskade ključne za celično preživetje, tvorbo in rast nevritov ter nadaljno diferenciacijo celic (8). Slednje dodatno potrjuje na pomembno vlogo katepsina X v procesu nevritogeneze, t. i. rasti nevritov.

Izguba in propad nevritov sta zgodnja dogodka v razvoju nevrodegenerativnih bolezni, zato predstavlja regeneracija nevritov temelj zdravljenja. Kljub temu, da imajo nevrotrofični dejavniki glavno vlogo pri regeneraciji nevronov, je njihova klinična uporaba omejena zaradi nezmožnosti prehajanja krvno-možganske pregrade in šibke plazemske stabilnosti. Odkritje zdravilne učinkovine, ki bi prehajala krvno-možgansko pregrado in oblikovanje specifičnega sistema nevrotrofin-receptor bi lahko bilo potencialno zdravljenje za Alzheimerjevo bolezen (65). Zato je poznavanje vloge in mehanizma delovanja katepsina X v procesu nevritogeneze ključnega pomena pri načrtovanju specifičnih in učinkovitih

zaviralcev katepsina X, ki bi preko zaviranja katepsina X v možganskih celicah spodbudili tvorbo in rast nevritov ter s tem spodbudili regeneracijo poškodovanih nevronov.

# 6 SKLEP

- Stimulacija celic PC12 z NGF poveča celično preživetje ter tvorbo in izraščanje nevritov, poleg tega pa značilno poveča tudi polimerizacijo F-aktina, kar vpliva na reorganizacijo aktinskega citoskeleta in posledično diferenciacijo celic PC12.
- Stimulacija celic PC12 z NGF vpliva na nivo izražanja in aktivnost katepsina X ter povzroči prenos katepsina X v območje rasti nevritov, in sicer v obliki zgodnjih in poznih endosomov.
- Zavrtje signalnih poti, uravnavanih z delovanjem NGF, vpliva na zmanjšano aktivnost katepsina X v celicah PC12 po stimulaciji z NGF.
- Rekombinantni katepsin X zmanjša polimerizacijo aktinskih filamentov in posledično rast nevritov celic PC12, spodbujenih z delovanjem NGF. Poleg tega zavira tudi fosforilacijo kinaz ERK1/2 in Akt in posledično aktivacijo signalnih poti, kar se odrazi v zmanjšanem nevrotrofičnem delovanju NGF.
- Nadizraženi katepsin X v celicah PC12 zmanjša nevrotrofično delovanje NGF, polimerizacijo F-aktina in posledično rast nevritov v procesu nevritogeneze. Poleg tega tudi zavre z NGF-povzročeno fosforilacijo kinaz ERK1/2 in Akt, ki sta ključni kinazi v procesu nevritogeneze.
## 7 LITERATURA

- Sierra-Fonseca JA, Najera O, Martinez-JuradoJ, Walker EM, Varela-Ramirez A, Khan AM, Miranda M, Lamango NS, Roychowdhury S: Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting Gβγ-microtubule interaction. BMC Neuroscience. 2014; 15: 132.
- Singh S, Swarnkar S, Goswami P, Nath C: Astrocytes and Microglia: Responses to Neuropathological Conditions. International Journal of Neuroscience. 2011; 121: 589-597.
- 3. Li Y, Tan MS, Jiang T, Tan L: Microglia in Alzheimer's Disease. BioMed Research International. 2014; 1-7.
- http://lyceum.algonquincollege.com/lts/onlineCourses/anatomy/content/module7-3.htm, povzeto 20. maja 2017.
- Hafner A, Obermajer N, Kos J: Gamma-1-Syntrophin Mediates Trafficking of Gamma-Enolase towards the Plasma Membrane and Enhances Its Neurotrophic Activity. Neurosignals. 2010; 18: 246–258.
- 6. Harrington AW, Ginty DD: Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. Nature Reviews Neuroscience. 2013; 14(3): 177-187.
- Connor B, Dragunow M: The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. Brain Research Reviews. 1998; 27: 1–39.
- Hafner A, Obermajer N, Kos J: γ-Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. Biochem J. 2012; 443(2): 439-50.
- Kiryushko D, Berezin V, Bock E: Regulators of Neurite Outgrowth: Role of Cell Adhesion Molecules. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004; 1014: 140–154.
- 10. Song EJ, Yoo YS: Nerve growth factor-induced neurite outgrowth is potentiated by stabilization of TrkA receptors. BMB Rep. 2011; 44(3): 182-6.
- Saxena S, Bucci C, Weis J, Kruttgen A: The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. J Neurosci. 2005; 25(47): 10930-40.
- Patapoutian A, Reichardt LF: Trk receptors: mediators of neurotrophin action. Current Opinion in Neurobiology. 2001; 11: 272–280.

- Denhardt DT: Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. Biochemical Journal. 1996; 318(3): 729-747.
- Jeon CY, Kim HJ, Lee JY, Kim J, Kim SC, Park JB: p190RhoGAP and Rapdependent RhoGAP (ARAP3) inactivate RhoA in response to nerve growth factor leading to neurite outgrowth from PC12 cells. Exp Mol Med. 2010; 42(5): 335–344.
- Kaplan DR, Miller FD: Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Current Opinion in Neurobiology. 2000; 10: 381–391.
- Park JH, Lee SB, Lee KH, Ahn JY: Nuclear Akt promotes neurite outgrowth in the early stage of neuritogenesis. BMB Rep. 2012; 45(9): 521-525.
- Tornieri K, Welshhans K, Geddis MS, Rehder V: Control of neurite outgrowth and growth cone motility by phosphatidylinositol-3-kinase. Cell Motil. Cytoskeleton. 2006; 63: 173-192.
- Koch JC, Tönges L, Barski E, Michel U, Bähr M, Lingor P: ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. Cell Death Dis. 2014; 5(5): 1225.
- https://figshare.com/articles/\_Simplified\_schematic\_figure\_of\_the\_signaling\_path ways\_down\_stream\_of\_NGF\_and\_its\_receptor\_TrkA\_/1293254, povzeto 17. junija 2017.
- 20. Sann S, Wang Z, Brown H, Jin Y: Roles of endosomal trafficking in neurite outgrowth and guidance. Trends Cell Biol. 2009; 19(7): 317-24.
- Nishimura Y, Itoh K, Yoshioka K, Tokuda K, Himeno M: Overexpression of ROCK in human breast cancer cells: evidence that ROCK activity mediates intracellular membrane traffic of lysosomes. Pathol Oncol Res. 2003; 9(2): 83-95.
- Nishimura Y, Itoh K, Yoshioka K, Ikeda K, Himeno M: A role for small GTPase RhoA in regulating intracellular membrane traffic of lysosomes in invasive rat hepatoma cells. Histochem J. 2002; 34(5): 189-213.
- Hattori T, Takei N, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S: Neurotrophic and neuroprotective effects of neuron-specific enolase on cultured neurons from embryonic rat brain. Neurosci Res. 1995; 21(3):191-8.
- Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K, Kohsaka S: Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. J Neurochem. 1994; 63(6): 2048-57.

- Ueta H, Nagasawa H, Oyabu-Manabe Y, Toida K, Ishimura K, Hori H: Localization of enolase in synaptic plasma membrane as an alphagamma heterodimer in rat brain. Neurosci Res. 2004; 48(4): 379-86.
- Schmechel DE, Marangos PJ, Martin BM, Winfield S, Burkhart DS, Roses AD, Ginns EI: Localization of neuron-specific enolase (NSE) mRNA in human brain. Neurosci Lett. 1987; 76(2): 233-8.
- 27. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonović UP, Kos J: Cathepsin X cleaves the Cterminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. Int J Biochem Cell Biol. 2009; 41(8-9): 1685-96.
- Pišlar A, Kos J: Cysteine cathepsins in neurological disorders. Mol Neurobiol. 2014;
  49(2): 1017-30.
- Gunčar G, Klemenčič I, Turk B, Turk V, Karaoglanovic-Carmona A, Juliano L, Turk D: Crystal structure of cathepsin X: a flip–flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. Structure. 2000; 8: 305–313.
- Naëgler DK, Meènard R: Human cathepsin X: A novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. FEBS Letters. 1998; 434: 135-139.
- 31. Klemenčič I, Carmona AK, Cezari MHS, Juliano MA, Juliano M, Gunčar G, Turk D, Križaj I, Turk V, Turk B: Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. Eur. J. Biochem. 2000; 267: 5404-5412.
- Wendt W, Schulten R, Stichel CC, Lübbert H: Intra- versus extracellular effects of microglia-derived cysteine proteases in a conditioned medium transfer model. J Neurochem. 2009; 110(6): 1931-41.
- Nägler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisima EO, Ménard R: Human Cathepsin X: A Cysteine Protease with Unique Carboxypeptidase Activity. Biochemistry. 1999; 38 (39): 12648–12654.
- Stoka V, Turk B, Turk V: Lysosomal Cysteine Proteases: Structural Features and their Role in Apoptosis. IUBMB Life. 2005; 57: 347 – 353.
- Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N. The role of cathepsin X in cell signaling. Cell Adhesion & Migration. 2009; 3(2): 164-166.

- 36. Jevnikar Z, Obermajer N, Bogyo M, Kos J: The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. J Cell Sci. 2008; 121(Pt 16): 2652-61.
- Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Sadaghiani AM, Bogyo M, Kos J. Cathepsin Xmediated beta2 integrin activation results in nanotube outgrowth. Cellular and Molecular Life Sciences. 2009; 66(6): 1126-34.
- Wendt W, Zhu XR, Lübbert H, Stichel C C: Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. Experimental Neurology. 2007; 204: 525–540.
- Hafner A, Glavan G, Obermajer N, Živin M, Schliebs R, Kos J: Neuroprotective role of γ-enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. Aging Cell. 2013; 12(4): 604-14.
- Pišlar AH, Zidar N, Kikelj D, Kos J: Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamineinduced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. Neuropharmacology. 2014; 82: 121-31.
- 41. Pišlar A, Božić B, Zidar N, Kos J. Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation. Neuropharmacology. 2017; 114: 88-100.
- Westerink RHS, Ewing AG: The PC12 cell model for neurosecretion. Acta Physiol (Oxf). 2008; 192 (2): 273-4.
- https://www.lgcstandards-atcc.org/~/media/Attachments/D/1/B/D/1830.ashx, povzeto 18. februarja 2017.
- 44. https://worldwide.promega.com/~/media/files/resources/protocols/technical%20bull etins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferation% 20assay%20system%20protocol.pdf, povzeto 18. febraurja 2017.
- Cupp-Enyard C: Sigma's Non-specific Protease Activity Assay Casein as a Substrate. J Vis Exp. 2008; (19): 899.
- http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\_9005.pdf, povzeto 18. februarja 2017.
- Bradford MM: A rapid and sensitivemethod for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72: 248-254.
- 48. http://www.interchim.fr/ft/S/SH309d.pdf, povzeto, 23. februarja 2017.
- 49. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 174; 177-180; 143-5.

- 50. https://www.lsbio.com/elisakits/mouse-cst3-cystatin-c-elisa-kit-sandwich-elisa-lsf28681/28681, povzeto 25. februarja 2017.
- 51. Veranič P, Pšeničnik M, Romih R, Sterle M, Kralj M: Osnove celične biologije z navodili za vaje, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 14-5.
- 52. https://spie.org/samples/TT69.pdf, dostopano dne: 25.02.2017
- https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/introductory-confocalconcepts, dostopano in povzeto 25. februarja 2017.
- Anderluh G, Maček P, Sepčić K, Turk T: Eksperimentalne metode v biokemiji, Študentska založba, Ljubljana, 2009: 83-5.
- 55. http://slideplayer.fr/slide/2996953/, povzeto 25. februarja 2017.
- 56. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/iblot2\_device\_qrc.pdf, povzeto4. februarja 2017.
- 57. https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/western-blotting/transfer-proteins-western-blot/iblot-dry-blotting-system/iblot-dry-blotting-comparison-to-semi-dry-and-wet.html, povzeto 4. februarja 2017.
- 58. http://cba.musc.edu/flowcytometry/flowcytometry.html, povzeto 25. februarja 2017.
- 59. http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\_Information\_Sheet/1/p2141pis.pdf, povzeto 25. februarja 2017.
- 60. http://www.ztm.si/uploads/pdf\_datoteke/gradiva/terapevtska\_biotehnologija\_ucben ik.pdf, dostopano 26. februarja 2017.
- https://www.bdbiosciences.com/documents/Intracellular\_brochure.pdf, dostopano
  marca 2017.
- Westerink RHS, Ewing AG: The PC12 cell as model for neurosecretion. Acta Physiol (Oxf). 2008; 192(2): 273–285.
- D'Ambrosi N, Murra B, Cavaliere F, Amadio S, Bernardi G, Burnstock B, Volonteè
  C: Interaction between ATP and nerve growth factor signalling in the survival and neuritic outgrowth from PC12 cells. Neuroscience. 2001; 108: 527-534.
- Jacovina AT, Zhong F, Khazanova E, Lev E, Deora AB, Hajjar KA: Neuritogenesis and the nerve growth factor-induced differentiation of PC-12 cells requires annexin II-mediated plasmin generation. J Biol Chem. 2001; 276(52): 49350-8.

65. Santos NA, Martins NM, Sisti FM, Fernandes LS, Ferreira RS, Queiroz RH, Santos AC: The neuroprotection of cannabidiol against MPP<sup>+</sup>-induced toxicity in PC12 cells involves trkA receptors, upregulation of axonal and synaptic proteins, neuritogenesis, and might be relevant to Parkinson's disease. Toxicol In Vitro. 2015; 30: 231-40.