

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**JERNEJA VARL**

**VLOGA  $\beta_1$ -INTEGRINSKEGA RECEPTORJA V PROCESU NEVRITOGENEZE,  
POSREDOVANE Z  $\gamma$ -ENOLAZO**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**JERNEJA VARL**

**VLOGA  $\beta_1$ -INTEGRINSKEGA RECEPTORJA V PROCESU NEVRITOGENEZE,  
POSREDOVANE Z  $\gamma$ -ENOLAZO**

**ROLE OF  $\beta_1$ -INTEGRIN RECEPTOR IN  $\gamma$ -ENOLASE-MEDIATED NEURITE  
OUTGROWTH**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

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 Katedre za farmacevtsko biologijo. Konfokalno mikroskopijo sem opravljala na Institutu Jožef Stefan.

## ZAHVALA

Posebna zahvala gre mentorici doc. dr. Anji Pišlar, mag. farm., za zaupanje in možnost priključitve njenem raziskovalnem delu, za vso podporo, strokovno pomoč in usmerjanje pri delu v laboratoriju in pisanju magistrske naloge ter za ves trud in čas, ki ga je vložila vame.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in fantu za vso potrpežljivost, spodbujanje in podporo, ki so mi jo nudili tekom študija in pisanja magistrske naloge

## Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala 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..

Jerneja Varl

# KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	III
KAZALO SLIK.....	VI
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
POVZETEK .....	IX
ABSTRACT .....	X
KLJUČNE BESEDE .....	XI
OKRAJŠAVE.....	XII
OZNAKE AMINOKISLIN .....	XV
1. UVOD .....	1
1.1. REGENERACIJA NEVRONOV .....	1
1.2. NEVROTROFIČNI DEJAVNIKI .....	3
1.3. GAMA ENOLAZA .....	3
1.4. NEVROTROFIČNO SIGNALIZIRANJE .....	5
1.4.1. Tirozin kinazni receptorji .....	5
1.4.2. p75NT receptor .....	7
1.5. INTEGRINI .....	8
1.5.1. Struktura in vloga integrinov .....	9
1.5.2. Navzdoljne signalne molekule integrinov .....	11
2. NAMEN DELA.....	14
3. MATERIALI IN METODE.....	15
3.1. MATERIALI .....	15
3.1.1. Reagenti .....	15
3.1.2. Protitelesa .....	16
3.1.3. Peptidi .....	16

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze,  
posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

3.1.4. Laboratorijska oprema .....	17
3.1.5. Gojišča .....	18
3.1.6. Pufri .....	18
3.1.7. Celične linije .....	19
3.1.7.1. Celična linija SH-SY5Y .....	19
3.1.7.2. Celična linija PC12 .....	19
3.1.7.3. Odmrzovanje celične linije .....	19
3.1.7.4. Gojenje celične kulture .....	20
3.1.7.5. Menjava medija .....	20
3.1.7.6. Štetje celic .....	20
3.2. METODE .....	21
3.2.1. Optična mikroskopija .....	21
3.2.1.1. Vrednotenje števila izrastkov nevronskih celic .....	23
3.2.1.2. Spremljanje polimerizacije aktinskih filamentov .....	23
3.2.1.3. Spremljanje kolokalizacije $\gamma$ -enolaze in $\beta_1$ -integrina .....	24
3.2.2. Spektrofotometrija .....	25
3.2.2.1. Vrednotenje celičnega preživetja s testom MTS .....	25
3.2.3. Pretočna citometrija .....	26
3.2.3.1. Analiza izražanja integrinskih podenot .....	28
3.2.3.2. Spremljanje polimerizacije aktina s pretočnim citometrom .....	29
3.2.3.3. Analiza izražanja stopnje fosforilacije signalnih molekul .....	30
3.2.4. Statistično vrednotenje rezultatov .....	31
4. REZULTATI .....	32
4.1. VREDNOTENJE VPLIVA -ENOLAZE IN MOLEKUL ZM NA IZRAŽANJE $\beta$ -PODENOT INTEGRINSKIH RECEPTORJEV NA POVRŠINI SH-SY5Y IN PC12 CELIC .....	32
4.2. DOLOČITEV KOLOKALIZACIJE $\beta_1$ -INTEGRINA IN $\gamma$ -ENOLAZE .....	34

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze,  
posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

4.3. VREDNOTENJE VPLIVA $\gamma$ -ENOLAZE NA RAST NEVRITOV PREKO IZRAŽANJA $\beta_1$ -INTEGRINA .....	35
4.4. VREDNOTENJE VPLIVA $\gamma$ -ENOLAZE NA POLIMERIZACIJO AKTINA PREKO IZRAŽANJA $\beta_1$ -INTEGRINA .....	37
4.5. VREDNOTENJE VPLIVA $\gamma$ -ENOLAZE NA CELIČNO PREŽIVETJE PREKO IZRAŽANJA $\beta_1$ -INTEGRINA .....	39
4.6. VPLIV $\gamma$ -ENOLAZE NA ZNOTRAJCELIČNO SIGNALIZIRANJE, POSREDOVANO PREKO $\beta_1$ -INTEGRINA .....	40
4.7. VREDNOTENJE VPLIVA ANTAGONISTA INTEGRINOV NA NEVROTROFIČNO DELOVANJE $\gamma$ -ENOLAZE.....	44
5. RAZPRAVA .....	48
6. SKLEPI .....	54
7. LITERATURA.....	55

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz organizacije možganskih celic.....	1
Slika 2: Prikaz razlike med regeneracijo nevronskih celic v PŽS in regeneracijo v ČŽS.....	2
Slika 3: Struktura $\gamma$ -enolaze. Pogled s strani.....	4
Slika 4: Shematski prikaz signalnih poti, ki jih sprožijo nevrotrofični dejavniki z vezavo na receptorja Trk in p75NTR ter njihov vpliv na celične funkcije.....	8
Slika 5: Shema integrinskega receptorja.....	9
Slika 6: Poenostavljena shema povezovanja $\alpha$ in $\beta$ podenot ter najpomembnejši ligandi za posamezen integrinski receptor.....	10
Slika 7: Prikaz prepletenih signalnih poti, ki jih sprožijo nevrotrofični dejavniki in integrini.....	13
Slika 8: Prikaz PC12 celic, ki so nediferencirane (A), in diferenciranih PC12 celic po stimulaciji z NGF (B) .....	19
Slika 9: Shema invertnega mikroskopa.....	22
Slika 10: Shema konfokalnega mikroskopa .....	22
Slika 11: Pretvorba MTS reagenta v vijolično obarvan produkt formazan.....	25
Slika 12: Shema pretočnega citometra .....	27
Slika 13: Izražanje $\beta_1$ -, $\beta_2$ - in $\beta_3$ -integrinskih podenot na površini membrane SH-SY5Y celic ....	32
Slika 14: Izražanje $\beta_1$ -, $\beta_2$ - in $\beta_3$ -integrinskih podenot na površini membrane PC12 celic.....	33
Slika 15: Izražanje $\beta_1$ -integrinske podenote na površini membrane PC12 celic .....	34
Slika 16: Kolokalizacija $\beta_1$ -integrina in $\gamma$ -enolaze v PC12 celicah.....	35
Slika 17: Relativno število PC12 celic z izrastki po tretiranju z $\gamma$ -Eno.....	36
Slika 18: Vpliv stimulacije PC12 celic z $\gamma$ -Eno na rast nevritov. ....	37
Slika 19: Relativna polimerizacija F-aktina v PC12 celicah po tretiranju z $\gamma$ -Eno .....	38
Slika 20: Vpliv stimulacije PC12 celic z $\gamma$ -Eno na polimerizacijo F-aktina v PC12 celicah. ....	39
Slika 21: Delež celičnega preživetja PC12 celic po tretiranju z $\gamma$ -Eno .....	40
Slika 22: Relativna fosforilacija FAK v PC12 celicah po tretiranju z $\gamma$ -Eno.....	41
Slika 23: Relativna fosforilacija FAK v PC12 celicah po tretiranju z $\gamma$ -Eno .....	42
Slika 24: Relativna fosforilacija ERK v PC12 celicah.....	43
Slika 25: Relativna fosforilacija Akt v PC12 celicah po tretiranju z $\gamma$ -Eno .....	44
Slika 26: Vpliv pre-tretiranja PC12 celic z GRGDS peptidom na relativno število PC12 celic z izrastki po tretiranju z $\gamma$ -Eno. ....	45
Slika 27: Vpliv pre-tretiranja PC12 celic z GRGDS peptidom na rast nevritov po tretiranju z $\gamma$ -Eno. ....	46

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze,  
posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Slika 28: Vpliv pre-tretiranja PC12 celic z GRGDS peptidom na relativno fosforilacijo FAK po  
tretiranju z  $\gamma$ -Eno..... 47

## KAZALO PREGLEDNIC

Tabela I: Seznam reagentov in topil z navedenim proizvajalcem .....	15
Tabela II: Seznam primarnih protiteles z navedenim proizvajalcem .....	16
Tabela III: Seznam sekundarnih protiteles z navedenim proizvajalcem .....	16
Tabela IV: Seznam peptidov z navedenim proizvajalcem .....	16
Tabela V: Seznam laboratorijske opreme z navedenim proizvajalcem.....	17
Tabela VI: Seznam uporabljenih gojišč in njihova sestava.....	18
Tabela VII: Seznam uporabljenih pufrov in njihova sestava .....	18

## KAZALO ENAČB

Enačba 1 .....	21
Enačba 2 .....	26

## POVZETEK

Enolaza je citoplazemski encim, ki sodeluje v procesu metabolične razgradnje glukoze. Poleg glikolitične aktivnosti so za C-terminalni del  $\gamma$ -enolaze dokazali, da ob ustreznih vezavi na plazemske membrane spodbuja preživetje, rast nevritov in diferenciacijo nevronskih celic. Svoje učinke posreduje preko številnih signalnih molekul, ni pa znano, ali so v nevrotrofično delovanje vpleteni tudi  $\beta$ -integrini. V sklopu magistrske naloge smo z eksperimentalnim delom na PC12 celicah ovrednotili vlogo  $\beta$ -integrinskih receptorjev v procesu nevritogenze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Pri tem smo uporabili peptid  $\gamma$ -Eno, 30 aminokislin dolg peptid, ki posnema C-terminalni del  $\gamma$ -enolaze, ki izkazuje nevrotrofično aktivnost. Dokazali smo, da je  $\beta_1$ -integrin pomemben člen v procesih spodbujene rasti, diferenciacije in preživetja celic, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Po stimulaciji celic z  $\gamma$ -Eno so PC12 celice, priraščene na kolagenu ali lamininu, izkazovale povečano izražanje  $\beta_1$ -podenote integrina. Dokazali smo, da  $\gamma$ -enolaza in  $\beta_1$ -integrin kolokalizirata v perimembranskem delu celice, kar dodatno potrjuje možnost njune interakcije. Vpliv  $\gamma$ -Eno smo opazovali tudi s svetlobnim mikroskopom, s katerim smo ugotovili povečano tvorbo in rast nevritov PC12 celic, ki smo jih priraščali na kolagenu ali lamininu. Dokazali smo, da  $\gamma$ -enolaza posreduje svoje nevritogene učinke tudi preko polimerizacije F-aktina, ki se je po stimulaciji z  $\gamma$ -Eno zvišala, a le po izpostavitvi celic kolagenu ali lamininu. Spodbujevalni vpliv  $\gamma$ -enolaze na celično preživetje smo dokazali s kolorimetričnim MTS testom, ki je pokazal povečan delež celičnega preživetja v vzorcih, pri katerih smo celice inkubirali z  $\gamma$ -Eno na kolagenu. V drugem delu smo dokazali, da so kinaze FAK, Akt in ERK1/2 vpletene v signalno pot  $\gamma$ -enolaze. Po inkubaciji z nevrotrofičnim peptidom so celice, gojene na kolagenu ali lamininu, izkazale povečano fosforilacijo omenjenih kinaz. Dejstvo, da pri vseh zgoraj omenjenih rezultatih vezava PC12 celic s kolagenom ali lamininom, ki poteka preko integrinov, dodatno spodbudi nevrotrofičen vpliv  $\gamma$ -enolaze. To še bolj izrazi pomembno vlogo  $\beta_1$ -integrinov pri posredovanju njenih učinkov. V zadnjem delu smo dokazali, da je nevrotrofična aktivnost  $\gamma$ -Eno oslabljena v prisotnosti antagonista integrinskega receptorja, peptida GRGDS, kar potrjuje nevrotrofično delovanje  $\gamma$ -enolaze preko vpliva na  $\beta_1$ -podeno integrinskega receptorja. Vendar pa učinek ni v celoti izničen, kar nakazuje na vpletjenost drugih receptorjev oz vezavnih proteinov v signalno pot  $\gamma$ -enolaze in odpira možnost nadaljnjih raziskovanj.

## ABSTRACT

Enolase is a cytoplasmic enzyme involved in the metabolic process of glucose. In addition to glycolytic activity they have proved that the C-terminal part of  $\gamma$ -enolase when it binds to the plasma membrane promotes survival, neurite outgrowth and differentiation of neuronal cells. The enzyme  $\gamma$ -enolase exerts its effects through a variety of signalling molecules but it is not yet known if neurotrophic signalling path of  $\gamma$ -enolase involves  $\beta_1$ -integrins. In our experimental work on PC12 cells we have evaluated the role of  $\beta_1$ -integrin receptors in  $\gamma$ -enolase-mediated neurite growth. We have used a peptide  $\gamma$ -Eno, that is a 30 amino acids long peptide, which mimics C-terminal end of  $\gamma$ -enolase and exerts neurotrophic activity. We have proved that  $\beta_1$ -integrin is an important member in the neurotrophic action of  $\gamma$ -enolase. After neurotrophic stimulation of the PC12 cells, grown on collagen or laminin, increased expression of  $\beta_1$ -integrin has been detected. It has been shown that  $\gamma$ -enolase and  $\beta_1$ -integrin colocalize in the perimembrane region of the cells, which further confirms the possibility of their interaction. The neurotrophic effect has also been observed with a light microscope, which has shown an increased neurite outgrowth of the stimulated PC12 cells grown on collagen or laminin. It has been proved that the  $\gamma$ -enolase also promotes its neuritogenic effects by promoting the polymerization of F-actin, which has been increased in the stimulated PC12 cells, but only after exposure of cells to collagen or laminin. The prosurvival effect of the peptide  $\gamma$ -Eno has been proved by a colorimetric MTS assay, which has shown an increase in the proportion of cell survival of treated cells grown on collagen. In the second part of our work we have proved that kinases FAK, Akt and ERK1/2 are involved in  $\gamma$ -enolase signalling path. After treatment with peptide, PC12 cells grown on collagen or laminin, increased phosphorylation of these kinases has been observed. The fact that all results mentioned above have shown that culturing the cells on collagen or laminin, which involves the integrins, promotes neurotrophic activity of  $\gamma$ -enolase. This further emphasizes the significant role of  $\beta_1$ -integrins in promoting its neurotrophic effects. In the last part we have proved that the neurotrophic activity mediated by peptide  $\gamma$ -Eno is diminished in the presence of an antagonist of the integrin receptor, peptide GRGDS. This confirms that signalling pathway mediated by  $\gamma$ -enolase involves  $\beta_1$ -integrin. However, this effect has not been abolished by the antagonist, which suggests involvement of additional receptors or binding proteins in the signal transduction of  $\gamma$ -enolase, and opens a possibility for further research.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze,  
posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

## KLJUČNE BESEDE

Slovenski izraz	Angleški izraz
Nevrotrofični dejavnik	Neurotrophic factor
Nevrotrofično signaliziranje	Neurotrophic signalling
Rast nevritov	Neurite outgrowth
$\beta$ -1 integrin	$\beta$ -1 integrin
$\gamma$ -enolaza	$\gamma$ -enolase

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

## OKRAJŠAVE

<b>Akt</b>	serin/treonin-kinaza Akt oz protein-kinaza B (angl. serine/threonine- kinase Akt or protein kinase B)
<b>Bad</b>	promotor smrti, povezan z družino Bcl-2 (angl. Bcl-2-associated death promoter)
<b>BDNF</b>	nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (angl. brain-derived neurotrophic factor)
<b>BSA</b>	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
<b>Cdc4</b>	protein 4, ki nadzoruje celično delitev (angl. cell division control protein 4)
<b>CŽS</b>	centralni živčni sistem
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid (angl. dimethyl sulfoxide)
<b>EDTA</b>	etilendiaminetetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
<b>ERK</b>	z zunajceličnim signalom regulirana proteinska kinaza (angl. extracellular signal-regulated kinase)
<b>FAK</b>	fokalna adhezijska kinaza (angl. focal adhesion kinase)
<b>FBS</b>	fetalni goveji serum (angl. fetal bovine serum)
<b>Fyn</b>	proto-onkogena tirozin-proteinska kinaza Fyn (angl. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn)
<b>GDP</b>	gvanozin difosfat (angl. guanosine-diphosphate)
<b>Grb2</b>	z receptorjem rastnega faktorja vezani protein 2 ( angl. growth factor receptor-bound protein 2)
<b>GRGDS</b>	Gly-Arg-Gly-Asp-Ser
<b>GTP</b>	gvanozin trifosfat (angl. guanosine-triphosphate)
<b>HS</b>	konjski serum (angl. horse serum)
<b>ILK</b>	z integrinom povezana kinaza (angl. integrin-linked kinase)

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

<b>JNK</b>	Jun-N-terminalna kinaza (angl. Jun N-terminal kinases)
<b>LN1</b>	laminin 1 (angl. laminin 1)
<b>MAPK</b>	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (angl. mitogen-activated protein kinase)
<b>MEK</b>	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza kinaza (angl. mitogen-activated protein kinase kinase)
<b>MTS</b>	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol (angl. [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt)
<b>NCAM</b>	nevronska celična adhezijska molekula (angl. neural cell adhesion molecule)
<b>NF-Kb</b>	jedrni dejavnik kapa B (angl. nuclear factor kappa B)
<b>NGF</b>	živčni rastni dejavnik (angl. nerve growth factor)
<b>NT-3</b>	neurotrofin-3 (angl. neurotrophin-3)
<b>NT-4</b>	neurotrofin-4 (angl. neurotrophin-4)
<b>obr/min</b>	obrat na minuto
<b>p75<sup>NTR</sup></b>	nevrotrofinski receptor p75 <sup>NTR</sup> (angl. p75 <sup>NTR</sup> neurotrophin receptor)
<b>PBS</b>	fosfatni pufer (angl. phosphate buffered saline)
<b>PC12</b>	nesmrtna celična linija tumorja sredice nadledvične žleze (feokromocitoma)
<b>PDZ</b>	domena prvič identificirana v PSD-95, Discslarge in ZO-1 (angl. postsynaptic density-95/discd large/zona occludens)
<b>PI3-K</b>	fosfatidilinozitol-3-kinaza (angl. phosphatidilinozitol-3-kinase)
<b>PIP3</b>	fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (angl. phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)
<b>PLC-<math>\gamma</math></b>	fosfolipaza- $\gamma$ (angl. phospholipase- $\gamma$ )
<b>PŽS</b>	periferni živčni sistem

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

<b>Rac1</b>	Ras-u soroden C3 botulinski toksin substrat 1 (angl. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)
<b>RhoA</b>	gensko sorodna družina Ras, član A (angl. Ras homolog gene family, member A)
<b>Shc</b>	protein, vsebujoč Src homologno 2 domeno (angl. src homology 2 domain-containing protein)
<b>SH3</b>	Src homologna domena 3 (angl. SRC Homology 3 Domain)
<b>SHSY-5Y</b>	nesmrtna celična linija celic perifernega živčevja
<b>SOS</b>	GDP/GTP menjalni faktor, ki ima ime po genu, ki ga kodira (Son of the Sevenless)
<b>Src</b>	proto-onkogena tirozin-proteinska kinaza Src (angl. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src)
<b>TrkB</b>	tirozin-kinazni A receptor (angl. tyrosine-kinase A receptor)
<b>TrkB</b>	tirozin-kinazni B receptor (angl. tyrosine-kinase B receptor)
<b>TrkC</b>	tirozin-kinazni C receptor (angl. tyrosine-kinase C receptor)
<b>Yes</b>	proto-onkogena tirozin-proteinska kinaza Yes (angl. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes)
<b>ZM</b>	zunajcelični matriks

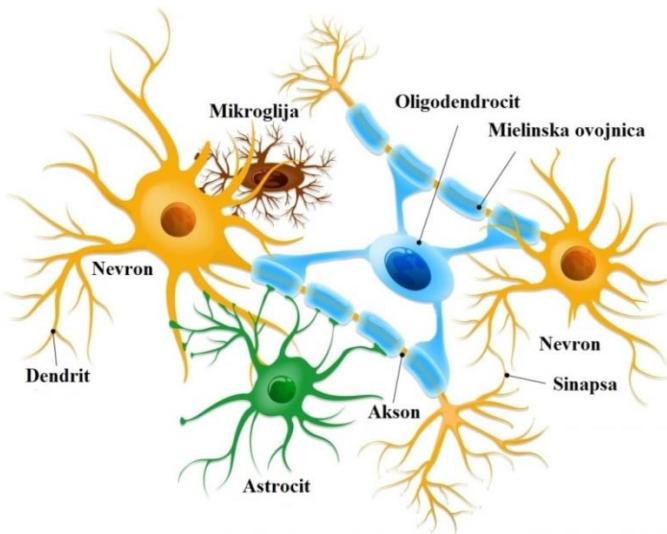
Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze,  
posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

## OZNAKE AMINOKISLIN

Kratica aminokisline	Oznaka aminokisline	Aminokislina
Arg	R	arginin
Asp	D	aspartat, asparaginska kislina
Gly	G	glicin
Ser	S	serin

# 1. UVOD

Živčni sistem sestavlja dva glavna razreda celic: živčne celice oziora nevroni in glialne celice oziora glia. Nevroni zagotavljajo večino edinstvenih funkcij živčnega sistema, kot so zaznavanje, mišljenje, pomnenje, nadzor nad mišično aktivnostjo in izločanjem žlez. Naloga nevroglij je pa podpora, preskrba s hranili in zaščita nevronov ter ohranjanje homeostaze medcelične tekočine, ki jo obdaja. V primerjavi z nevroni je število celic glije 2- do 10-krat večje. Nevroglij razdelimo na makroglijo in mikroglijo. Makroglijo sestavljajo Schwannove celice, oligodendrociti in astrociti. Tako Schwannove celice kot oligodendrociti tvorijo mielinsko ovojnico, ki izolira nevrone in s tem pospeši prenos podatkov. Razlika je samo v tem, da se prve nahajajo v perifernem živčnem sistemu (PŽS), druge pa v centralnem živčnem sistemu (CŽS). Mikroglijo pa predstavljajo celice imunskega sistema, ki po poškodbi, vnetju ali nastopu nevrodegenerativnih bolezni bodisi z izločanjem vnetnih dejavnikom spodbujajo vnetje in nevrodegenerativne procese, bodisi s predstavljivo antigenom in preobrazbo v fagocite spodbujajo regeneracijo nevronov [1].



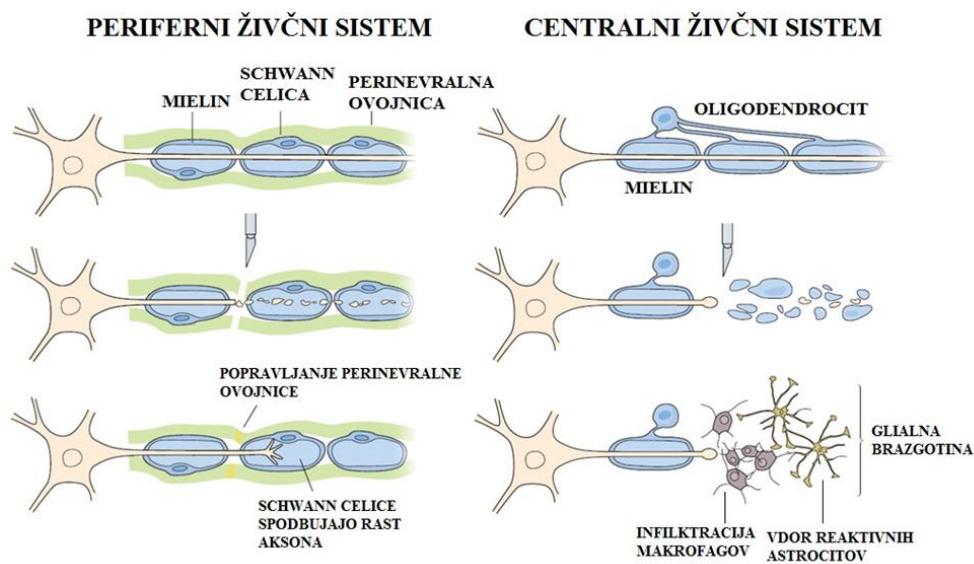
Slika 1: Shematski prikaz organizacije možganskih celic [2].

## 1.1. REGENERACIJA NEVRONOV

Na uspešnost regeneracije poškodovanih nevronskih celic, ki jo poleg celic mikroglije spodbujajo nevrotrofični dejavniki, vpliva tudi sposobnost preživetja nevronov, novega razraščanja le-teh ter ponovne vzpostavitev povezav s prvotnimi tarčami in procesi, nujnimi za normalen razvoj nevrona [3]. V CŽS je regeneracija nevronov omejena. V

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

nasprotju z nevroni rib, dvoživk, perifernimi in razvijajočimi centralnimi nevroni sesalcev, odrasli nevroni CŽS po poškodbi ne morejo preiti nazaj v funkcionalne celice [4]. To je posledica tako ne-permisivnega rastnega okolja kot nerazpoložljivosti primernih rastnih dejavnikov [5]. Slaba regenerativna sposobnost centralnih nevronov je delno tudi posledica inhibitornih molekul zunajceličnega matriksa (ZM), ki so prisotne v CŽS. Takšnih inhibitornih pogojev v PŽS ne najdemo [6]. V CŽS funkcijo razgrajevanja mielina prevzamejo oligodendroci, ki imajo omejeno sposobnost odstranjevanja mielinske ovojnice. Ta vsebuje nešteto inhibitornih proteinov, ki posledično zaradi počasne razgradnje ostanejo prisotni daljše časovno obdobje in zato upočasnjujejo proces obnove centralnih nevritov. Na mestu poškodbe pride tudi do razvoja glija brazgotine, ki je posledica kompleksnih interakcij med astrociti, mikroglijo, vnetnih celic in mielinom [7]. S tvorbo brazgotine se telo zavaruje in omeji velikost poškodbe, ponovno vzpostavi krvno-možgansko pregrado ter zmanjša vnetje. Hkrati z njo upočasni regeneracijo nevritov, ker tako kot mielin vsebuje inhibitorne molekule. Poleg tega tudi fizično ovira rast novih nevritov [8]. Razgrajevanje mielinske ovojnice v PŽS opravlja Schwann-ove celice, ki po poškodbi povečajo izražanje celičnih adhezijskih molekul in molekul zunajceličnega matriksa (ZM), kot so kolagen, laminin, fibronektin, izločanje nevrotrofičnih faktorjev, med njimi živčni rastni dejavnik (NGF), nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (BDNF), rastni dejavnik glialnega izvora in faktorjev, s katerimi privabijo makrofage, ki pomagajo pri odstranjevanju na mestu poškodbe [8]. V tem se razlikuje od CŽS, ki ima na voljo le malo molekul ZM in nevrotrofičnih dejavnikov, ki pospešijo regeneracijo [9].



Slika 2: Prikaz razlike med regeneracijo nevronskih celic v PŽS in regeneracijo v ČŽS [9].

## 1.2. NEVROTROFIČNI DEJAVNIKI

Regeneracija nevronskih celic je že dolgo časa pomemben predmet zanimanja številnih raziskovalcev, vendar mehanizmi, ki odločajo o preživetju in smrti nevronov, še vedno niso povsem opredeljeni. Kljub temu pa ni dvoma, da so nevrotrofični dejavniki in njihovi receptorji vključeni v te mehanizme tako med razvojem ter v odraslih možganih kot tudi pri poškodbi [10].

Nevrotrofični dejavniki so pomembni posredniki diferenciacije, preživetja in rasti nevronov v CŽS in PŽS [8]. V največji koncentraciji so prisotni v času razvoja možganov. V tem obdobju spodbujajo rast nevronov in usmerjajo izrastke ter s tem skrbijo za pravilen razvoj živčnega sistema [11]. Vodenje izrastkov do pravilnih tarč jim omogočajo njihove kemotaktične lastnosti, ki povzročijo reorientacijo in rast nevritov proti tkivu, ki izloča nevrotrofične molekule. Poleg povezovanja nevronov z njihovimi tarčami nevrotrofični dejavniki skrbijo tudi za primerno gostoto oživčenja tkiv. Dodatno so vpleteni v celično preživetje, rast nevritov, obrezovanje dendritov ter izražanje proteinov in ionskih kanalov, ki so ključni za normalno delovanje nevronov. Njihovo delovanje ni pomembno samo v času razvoja, temveč tudi v odraslih možganih nadaljujejo z uravnavanjem preživetja nevronov, hkrati pa sodelujejo v sinaptičnem delovanju in sinaptični plastičnosti. Poleg vpliva na razvoj živčnega sistema so vpleteni tudi v regeneracijo živčnih celic, saj so dokazali, da po poškodbi perifernih živcev nivo nevrotrofičnih dejavnikov ter drugih signifikantno naraste [12].

Med nevrotrofične dejavnike štejemo proteine, ki v določeni kulturi spodbujajo preživetje vsaj ene izmed populacij nevronskih celic, ki jih izločajo tarčna tkiva, katerih nevroni potrebujejo podporo pri preživetju ali diferenciaciji, ter so izraženi v primerem času razvoja določene populacije nevronov in s tem spodbujajo njihovo preživetje in diferenciacijo [13]. V družino nevrotrofičnih dejavnikov uvrščamo NGF, BDNF, neurotrofin-3 (NT-3) in neurotrofin-4 (NT-4). Slednjim je skupno izkazovanje nevrotrofične aktivnosti, pomembne za normalen razvoj in vzdrževanje živčnega sistema [14].

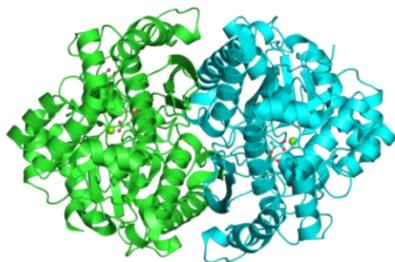
## 1.3. GAMA ENOLAZA

Med dejavnike, ki izkazujejo nevrotrofično delovanje uvrščamo tudi znotrajcelični protein  $\gamma$ -enolazo. Enolaza je glikolitični encim, ki katalizira pretvorbo 2-fosfo-D-glicerata v

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

fosfoenolpiruvat in tako sodeluje v metaboličnem procesu glikolize. Poleg encimskega delovanja ima vlogo večfunkcijskega proteina, ki se nahaja v različnih tkivih [15].

Enolaza je sestavljena iz  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$  podenot, ki lahko tvorijo homodimere in heterodimere [16]. Posamezne podenote se nekovalentno povežejo in tvorijo do 5 različnih izoencimov. Izražanje teh izoencimov v telesu je odvisno od stopnje razvoja in vrste tkiva. V možganih sesalcev najdemo izoblike enolaze:  $\alpha\alpha$  in  $\alpha\gamma$ ,  $\gamma\gamma$  [17]. Slednji, znani kot nevron specifična enolaza, se večinoma nahajata v nevronih in nevronendokrinih celicah v CŽS [18]. Čeprav sta aminokislinska zaporedja  $\alpha\alpha$ - in  $\gamma\gamma$ -izoencima 82-odstotno identična, so nevrotrofično delovanje dokazali le  $\gamma\gamma$ -izomeru. Ta torej poleg sodelovanja v metaboličnem procesu uravnava tudi razvoj in vzdrževanje nevronov v CŽS [19].



Slika 3: Struktura  $\gamma$ -enolaze. Pogled s strani [20].

Za nevrotrofično delovanje  $\gamma$ -enolaze je odgovoren C-terminalni del proteina, za katerega so pokazali, da spodbuja preživetje, diferenciacijo in regeneracijo nevronskeih celic [21]. V raziskavi na kultiviranih nevronih iz možganov podganjih zarodkov so ugotovili, da  $\gamma$ -enolaza spodbuja preživetje tako neokortikalnih nevronov kot tudi nevronov srednjih možganov in nevronov hrbitenjače. Ta učinek ostane tudi po izpostavitvi nevronov atmosferi z nizko vsebnostjo kisika. Nevroprotективni učinek enolaze je prisoten že pri nizkih koncentracijah (do 100 ng/mL). Torej porast koncentracije  $\gamma$ -enolaze po nevroloških poškodbah dodatno spodbudi in olajša preživetje poškodovanih nevronov [22].

Za zagotavljanje stabilnosti in katalitične aktivnosti je nujna vezava dvovalentnih kovinskih ionov. V najvišji koncentraciji so na razpolago  $Mg^{2+}$  ioni, ki izkazujejo tudi največjo moč aktivacije katalitične aktivnosti. Enolaza izkazuje dve vezavni mesti za kovinske ione. Prvo vezavno mesto sproži konformacijske spremembe aktivnega dela in tem omogoči vezavo substratov, drugo pa ima izredno pomembno vlogo v katalitičnem delu molekule [21].

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Nevrotrofična aktivnost  $\gamma$ -enolaze je uravnavana s proteolitičnim encimom katepsinom X. Slednji je cisteinska proteaza, ki se nahaja večinoma v lizosomih, najdemo pa ga tudi v drugih veziklih in citoplazmi [23]. KATEPSIN X je karboksipeptidaza, ki zaporedoma cepi C-terminalni aminokislini in s tem onemogoči prenos  $\gamma$ -enolaze do plazemske membrane in izniči njen nevrotrofično delovanje [24]. Za prenos znotrajcelične  $\gamma$ -enolaze do plazemske membrane je odgovoren ogrodni protein  $\gamma$ 1-sintropin, ki vsebuje v svoji strukturi PDZ vezavno domeno, na katero se veže  $\gamma$ -enolaza preko ohranjenega C-terminalnega dela [25].

Po prenosu  $\gamma$ -enolaze do plazemske membrane le-ta sproži nevrotrofično signaliziranje preko aktivacije fosfatidilinozitol 3-kinazne (PI3-K) signalne poti in preko z mitogen-aktivirane protein kinazne (MAPK) signalne poti. Z njimi  $\gamma$ -enolaza uravnava molekularne procese, kot so rast nevritov in diferenciacija, reorganizacija aktinskega citoskeleta ter aktivacija transkripcijskih faktorjev, ki nadzorujejo celični cikel in celično preživetje. Preko omenjenih signalnih poti pa ne posreduje svoje učinke le  $\gamma$ -enolaza, temveč so signalne molekule omenjenih signalnih poti glavni posredniki prenosa informacij, posredovanih preko vezave nevrotrofičnih dejavnikov na receptorje [19].

## 1.4. NEVROTROFIČNO SIGNALIZIRANJE

Nevrotrofični dejavniki svoje naloge izvršujejo preko dveh glavnih vrst receptorjev, tirozin kinaznih receptorjev (Trk) in p75 nevrotrofinskih receptorjev (p $75^{NTR}$ ). Učinki receptorjev, ki jih sprožijo nevrotrofični dejavniki, se lahko dopolnjujejo ali pa si nasprotujejo. Medtem ko Trk receptorji oddajajo samo pozitivne signale, kot je spodbujanje preživetja in rasti, pa p $75^{NTR}$  oddaja tako pozitivne kot negativne signale. Torej sta razvoj in preživetje nevronov odvisna od medsebojnega sodelovanja receptorjev Trk in p $75^{NTR}$  [26].

### 1.4.1. Tirozin kinazni receptorji

Poznamo tri oblike Trk receptorjev in vsak ima specifično vezavno mesto za nevrotrofične dejavnike: receptor TrkA predstavlja receptor za nevrotrofični dejavnik NGF, receptor TrkB za nevrotrofična dejavnika BDNF in NT4 ter receptor TrkC za nevrotrofični dejavnik NT3. Vsak receptor je sestavljen iz zunajceličnega dela, ki veže ligand, enojnega transmembranskega dela in znotrajceličnega, intrinzičnega, ki ima tirozin kinazno aktivnost. Protein kinaze so encimi, ki kovalentno vežejo fosfate na stransko verigo serina, treonina ali tirozina specifičnih proteinov znotraj celice. Takšna fosforilacija proteinov

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

nadzoruje njihovo encimsko aktivnost, vezavo z drugimi proteini in molekulami, nahajanje v celici in njihovo nagnjenost k degradaciji s proteazami [26].

Po vezavi liganda na receptor Trk ti dimerizirajo in postanejo katalitično aktivni, kar vodi v avtofosforilacijo samega receptorja [10]. Posledica avtofosforilacije je nastanek vezavnih mest, kamor se lahko vežejo adapterski proteini in signalne molekule. Ti signalni proteini vsebujejo domene, ki se specifično vežejo s fosforiliranimi tirozinskimi ostanki receptorja. Poleg vezavnih motivov na afiniteto vplivajo tudi aminokisline, ki obdajajo avtofosforilirane tirozinske ostanke. Čeprav so Trk receptorji zelo raznoliki, pa aktivirajo le nekaj signalnih poti. Med njimi so najbolj raziskane MAPK, PI-3K ter fosfolipazne- $\lambda$  (PLC- $\lambda$ ) signalne poti [10].

Z mitogeni aktivirana protein kinazna pot, krajše MAPK, je primarno posrednik rasti nevrita in nevronske diferenciacije, hkrati pa ji pripisujejo tudi vlogo pri celični proliferaciji in apoptozi [21]. Poznamo najmanj 6 različnih MAPK signalnih poti. Najbolj raziskana je z zunajceličnim signalom regulirana proteinska kinaza 1/2 (ERK1/2) signalna pot [27]. Aktivnost le-te signalne poti uravnavajo Ras proteini. Ras je majhen, z membrano povezan protein, ki med drugim deluje kot posrednik signalov med tirozin kinazno aktivnostjo in ERK kinazami [28]. Aktivacija Ras proteina je večstopenjski proces, ki se začne z vezavo liganda s Trk receptorjem, kar vodi v vezavo adapterskega proteina Shc družine. To v Shc proteinu sproži fosforilacijo tirozina in posledično vezavo Grb proteina, kot je Grb2. Ta kompleks aktivira GDP-GTP menjalni faktor, npr. SOS, ki Ras zveže z GTP in ga tako aktivira. Aktiviran Ras usmeri serinsko kinazo družine Raf k membrani. Tu se aktivira in sproži kaskado dogodkov, v katerih Raf aktivira MEK (od MAPK ali ERK kinaze), ki nato fosforilira in aktivira ERK kinazi [29]. ERK1 in ERK2 sta multifunkcionalni, znotrajcelični kinazi, za kateri je dokazano, da fosforilirata različne proteine, kot je tirozin hidroksilaza, transkripcijske faktorje, regulatorje translacije proteinov, proteine mikrotubulov in mnoge druge [30]. Na ta način uravnavata celično adhezijo, celični cikel, migracijo celic, celično preživetje, diferenciacijo, metabolizem, proliferacijo in transkripcijo [27].

Naslednja signalna pot, ki jo sproži vezava določenih nevrotrofičnih dejavnikov, vsebuje PLC- $\lambda$ . PLC- $\lambda$  cepi fosfatidilinozitol fosfate v diacilglicerol in inozitol fosfate. Prvi produkt cepitve aktivira protein kinazo C, inozitol-1,4,5-tris fosfat pa sprosti znotrajcelične zaloge kalcija. Znotrajceličen kalcij lahko izvaja številne učinke od aktivacije

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

$Ca^{2+}$ /kalmodulin-odvisne protein kinaze do tvorbe cikličnega adenozin monofosfata preko nekaterih adenilil ciklaz. Vsi ti učinki imajo močan vpliv na rast in preživetje nevronov [13].

Malo manj razumljena je PI-3K pot. PI-3K so heterodimeri, ki so sestavljeni iz katalitične  $\alpha$ -enote in regulatorne  $\beta$ -enote. Ko se vežejo s fosforiliranimi tirozini,  $\beta$ -enota aktivira katalitično aktivnost  $\alpha$ -enote [13]. Tako kot Ras tudi PI-3K aktivira številne signalne proteine in z njimi uravnava poglavite celične funkcije [31]. Ob celični membrani katalizira nastanek sekundarnega lipidnega prenašalca fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3). PIP3 nato prispeva k aktivaciji širokega spektra nižje ležečih tarč, vključno s serin/treonin-kinazo Akt (Akt) [32]. Ena izmed pomembnih funkcij aktivirane PI-3K je inhibicija apoptoze in spodbujanje celičnega preživetja preko aktivacije navzdoljne efektorske kinaze Akt [33]. Akt je serin/treonin kinaza, ki deluje kot anti-apoptotičen dejavnik preko uravnavanja izražanja pro-apoptotičnih proteinov, kot je Bad, ki uravnava sproščanje citokroma *c* iz mitohondrija. Na apoptozo vpliva tudi posredno preko uravnavanja transkripcije [33].

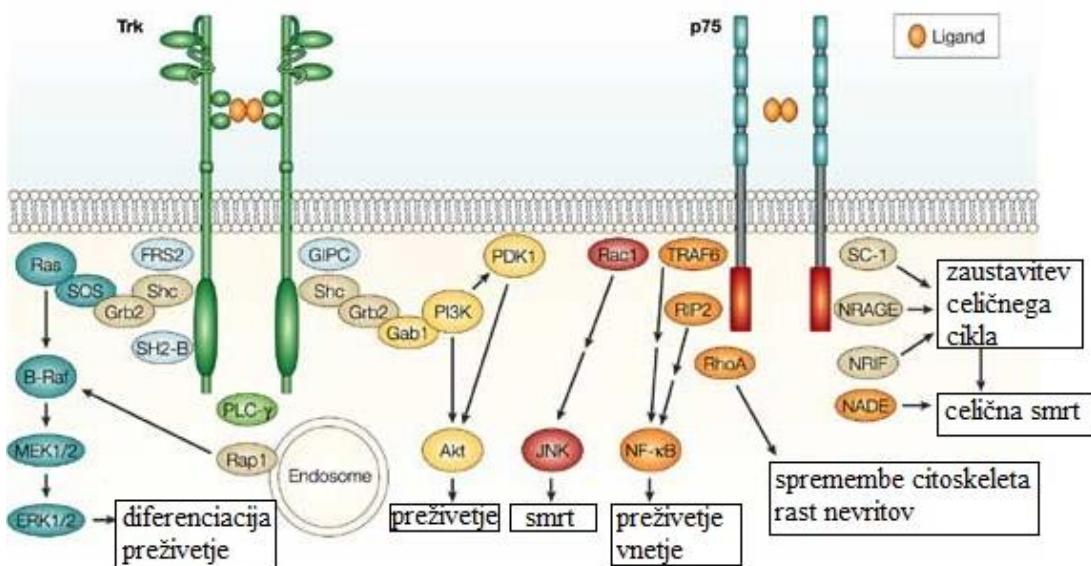
PI3-K pot ima pomembno vlogo tudi pri spodbujanju diferenciacije in rasti nevrita ter pri odzivnosti zametkov nevritov na nevrotrofične dejavnike [21]. Ti zametki nevritov so bogati z aktinskimi filamenti in neprestano podaljšujejo lamelopodije in filopodije, pri čemer pride do podlajševanja nevritov oz rasti nevrita. Ti dve strukturi se nahajata na vodilnem delu rastočega nevrita in sprejemata rastne ter usmerjevalne signale. Ugotovili so, da nevrotrofični dejavniki preko aktivacije PI-3K poti neposredno aktivirajo od aktina odvisno gibljivost vzdolž nevrita, kar vodi v rast dendritov in podlajševanje filopodijev. Na dinamiko aktina vplivajo dejavniki tudi posredno preko inhibicije Rho družine majhnih GTPaz, kot so RhoA, Rac1 in Cdc42. Ti spadajo med negativne regulatorje rasti nevronov, saj povečano izražanje zavira rast nevritov in s tem upočasnjuje proces nevritogeneze. Na reorganizacijo aktinskih filamentov vpliva tudi receptor p 75<sup>NT</sup>R, ki po vezavi nevrotrofičnih dejavnikov zmanjša aktivacijo RhoA in s tem njen zaviralni učinek na rast nevritov [12].

#### 1.4.2. p75<sup>NT</sup> receptor

p75<sup>NT</sup>R je druga vrsta receptorja, ki veže nevrotrofične dejavnike in je bolj pomemben pri uravnavanju apoptoze celic. Pripada družini tumor nekrotizirajočih faktorjev z eno samo

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

transmembransko domeno. V nasprotju s Trk receptorji ta receptor veže vse nevrotrofične dejavnike s podobno afiniteto vezave [14]. Vezava liganda na receptor sproži aktivacijo različnih posrednikov prenosa signala, med katere štejemo ceramid, jedrni dejavnik kapa B (NF- $\kappa$ B), Akt, Jun-N-terminalna kinaza (JNK) in kaspaze. Na te signalne poti ima velik vpliv tudi aktivacija Trk receptorjev [10]. Nevrotrofični dejavniki so veliko bolj uspešni pri spodbujanju apoptoze preko receptorja p75<sup>NTR</sup> v odsotnosti aktivacije receptorja Trk. Dokazali so, da Trk-posredovana signalizacija utiša p75<sup>NTR</sup>-posredovano apoptotično pot, sproženo preko kinaze JNK. Ta odnos ni enostranski, ker tudi aktivacija receptorja p75<sup>NTR</sup> uravnava določene Trk-posredovane signalne poti. Aktiviran p75<sup>NTR</sup> preko NF- $\kappa$ B poti spodbuja preživetje. To signalno pot sočasna aktivacija Trk receptorjev ne utiša, kar omogoča p75<sup>NTR</sup>, da preko te signalne poti podpira spodbujevalne učinke Trk receptorja na preživetje. Vse to se ujema s hipotezo, da hkratno povečano izražanje receptorja p75<sup>NTR</sup> in zmanjšanje količine izraženih Trk receptorjev premakne ravnotesje proč od celičnega preživetja v korist celični smrti [34].



Slika 4: Shematski prikaz signalnih poti, ki jih sprožijo nevrotrofični dejavniki z vezavo na receptorja Trk in p75<sup>NTR</sup> ter njihov vpliv na celične funkcije [35].

## 1.5. INTEGRINI

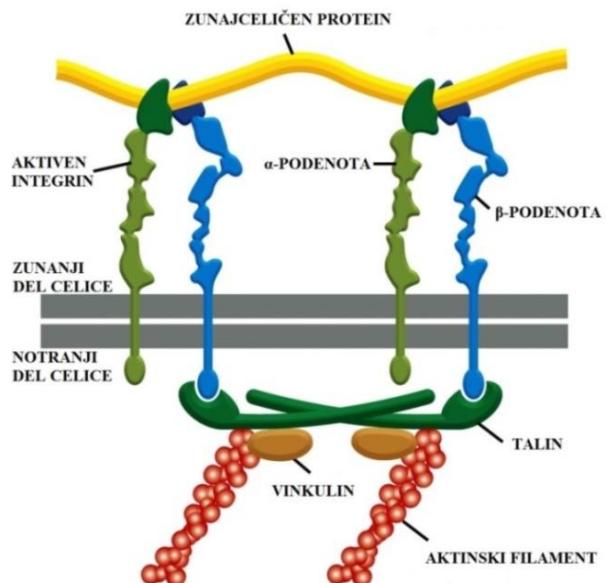
Podaljševanje nevritov spodbujajo številni zunajcelični faktorji, še posebej nevrotrofični dejavniki. V študiji, ki je vrednotila sodelovanje med ZM/integrini in NGF (Tucker et al.,

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

2005), so dokazali, da pri številnih celičnih odzivih prihaja do povezave signalnih poti, ki jih uravnavajo nevrotrofični dejavniki s signalnimi potmi, ki jih sproži adhezija celic. Na tak način nevrotrofični dejavniki sodelujejo z adhezijskimi molekulami ZM pri spodbujanju rasti nevritov. Študija, kjer so proučevali sodelovanje med molekulami ZM in NGF v primarnih nevronih odraslih, je pokazala, da dodatek dejavnika NGF občutno poveča izraščanje nevritov, ki jo sproži adhezija celice z molekulami ZM [26]. Glavni predstavniki ZM so laminin, kolagen in fibronektin. Ti sestavljajo strukturirano okolje, ki ga celica potrebuje za rast in diferenciacijo. Svoje učinke vršijo preko celičnih adhezijskih receptorjev, ki pretvorijo zunajcelične signale v visoko organizirane signalne poti. Med celične adhezijske receptorje, ki omogočajo povezavo celic z molekulami ZM, spadajo tudi integrini [29].

#### 1.5.1. Struktura in vloga integrinov

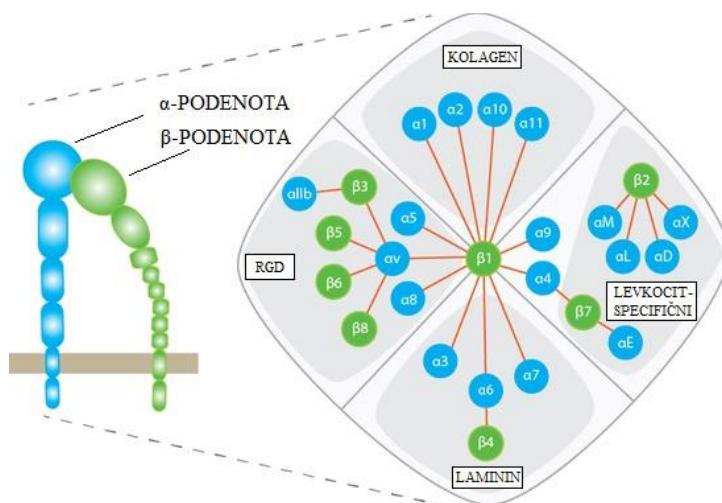
Integrini so velika družina membranskih receptorjev, ki imajo veliko zunajcelično domeno, ki veže ligande, enojno transmembransko domeno in običajno kratko citosolno domeno [36]. Integrini nadzorujejo številne procese v razvijajočem živčnem sistemu, kot so migracija nevronskih grebenov in oligodendroцитov, razrast nevritov, tvorbo sinaps in mielinizacijo. S temi funkcijami uravnavajo organizacijo celic v tkiva in organe tako med razvojem kot med diferenciacijo in proliferacijo celic [37].



Slika 5: Shema integrinskega receptorja [38].

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Integrini so heterodimerni proteini sestavljeni iz  $\alpha$ - in  $\beta$ -podenot, kot je razvidno iz Slike 5. Te verige imajo vlogo pri prenosu signalov iz zunajceličnega okolja v znotrajcelično [39].  $\alpha$ - in  $\beta$ -verige so med seboj nekovalentno povezane v močno stabilno strukturo. Večina  $\beta$ -verig lahko veže več kot eno  $\alpha$ -verigo in tako tvori številne različice integrinskih receptorjev [40]. Integrinski receptorji z enako  $\beta$ -podenočo in različno  $\alpha$ -podenočo vežejo različne ligande. Iz tega sklepajo, da naj bi  $\alpha$ -podenota imela pomembno vlogo pri določanju selektivnosti vezave. Poznamo 18  $\alpha$ - in 8  $\beta$ -integrinskih podenot, ki lahko tvorijo do 24 različnih integrinskih receptorjev (Slika 6). Posamezen receptor lahko veže več molekul ZM, do katerih izkazuje različno vezavno afiniteto. Npr.  $\alpha_1\beta_1$  veže laminin in kolagen, hkrati pa je laminin ligand tudi drugim integrinskim receptorjem:  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_4$  in  $\alpha_7\beta_1$  [8].



Slika 6: Poenostavljena shema povezovanja  $\alpha$  in  $\beta$  podenot ter najpomembnejši ligandi za posamezen integrinski receptor. En integrin lahko veže več različnih ligandov. Vezava enakega liganda z različnim integrinskimi receptorji sproži različne učinke [41].

Integrini nimajo intrinzične kinazne aktivnosti kot Trk receptorji, omogočajo pa povezavo med zunajceličnim matriksom in aktinskim citoskeletom. Ta povezava omogoči integrinom tako uravnavanje organizacije citoskeleta in celične gibljivosti kot spremiščanje pretokov znotrajceličnih signalnih poti, kar vodi v uravnavano celično preživetje, proliferacijo in diferenciacijo ter angiogenezo. Medtem ko zunajcelična domena veže raznolike ligande, pa znotrajcelična citoplazemska domena pripenja citoskeletne proteine. Vezava ligandov potrebuje prisotnost divalentnih kationov, kot so  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ , ki ravno tako lahko prispevajo k različni afiniteti vezave [37]. Integrini lahko posredujejo

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

signale v dve smeri. Poznan je prenos signala iz znotrajceličnega okolja v zunajcelično (angl. inside-out), pri kateri molekularni intermediati znotraj celice uravnavajo afiniteto in stanje aktivacije receptorjev s spreminjanjem konformacije njegovega citoplazemskega repa [42]. V normalnem neaktivnem stanju je izvencelični del integrinskega receptorja v upognjeni konformaciji. Aktivacijski signali znotraj celice spodbudijo izravnanje zunajcelične domene in stabilizirajo iztegnjeno, aktivno konformacijo. Takšna sprememba konformacije izpostavi tisti del zunajceličnega integrina, ki veže ligande. To omogoči prenos signalov v drugo smer, torej iz zunajceličnega okolja v znotrajcelično (angl. outside-in). Ti signali vplivajo na rast, diferenciacijo in apoptozo celic [43].

Veza zunajceličnih ligandov vodi v kopičenje integrinov v ravnini plazemske membrane in tvorbo fokalnih stikov, ki spodbujajo združevanje aktinskih filamentov. Aktinski filamenti se povežejo v večja stresna vlakna, kar vodi v nadaljnje kopičenje in še bolj okrepljeno povezavo z matriksom [43]. Posledica vezave integrinov z ZM so konformacijske spremembe znotraj citoplazemskega repa receptorja, ki se izravna in stimulira vpoklic adaptorskih proteinov. Ti delujejo kot posredniki, ki vežejo integrine z aktinskim citoskeletom in številnimi citoplazemskimi kinazami [44]. Procese, ki so povezani s tvorbo fokalnih stikov in dinamičnim preoblikovanjem aktinskega citoskeleta, uravnavajo člani družine Rho GTPaz in številni proteini, ki se nahajajo v fokalnih stikih. Sem spadajo integrin-vezoči proteini, ki se neposredno vežejo z aktinom (talín,  $\alpha$ -aktinin, filamin); integrin-vezoči proteini, ki se posredno vežejo s citoskeletom (kindlini, ILK, paksilin in FAK); integrin-nevezoči proteini (vinkulin); ter adaptorske in signalne molekule. Med signalne molekule štejemo fokalno adhezijsko kinazo (FAK), z integrinom povezano kinazo (ILK) in družino Src kinaz (Src, Fyn in Yes) [8].

#### *1.5.2. Navzdoljne signalne molekule integrinov*

FAK je nereceptorska citoplazemska tirozin kinaza, ki ima ključno vlogo v integrinski signalni poti, s katerimi se poveže preko paksilina. Aktivirana oblika tvori kompleks z družino Src kinaz, ki sproži večstopenjsko signalno pot preko fosforilacije proteinov, s katero uravnava razne celične funkcije [45]. Poleg tirozin kinazne funkcije je FAK tudi adapterski protein s številnimi vezavnimi mesti za proteine, ki so udeleženi v celični signalizaciji [46].

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Druga kinaza, ki je udeležena v signalno pot integrinskih receptorjev, je ILK kinaza. Je večdomenski adapterski protein, ki neposredno veže  $\beta_1$ - in  $\beta_3$ -integrinske repe ter jih posredno povezuje z aktinom preko vezavnega proteina parvina. ILK igra pomembno vlogo pri stabiliziranju povezave integrinov z aktinom, saj pomanjkanje ILK povzroči močno zakasnitev v tvorbi fokalnih stikov, kar vodi v moteno celično rast [43].

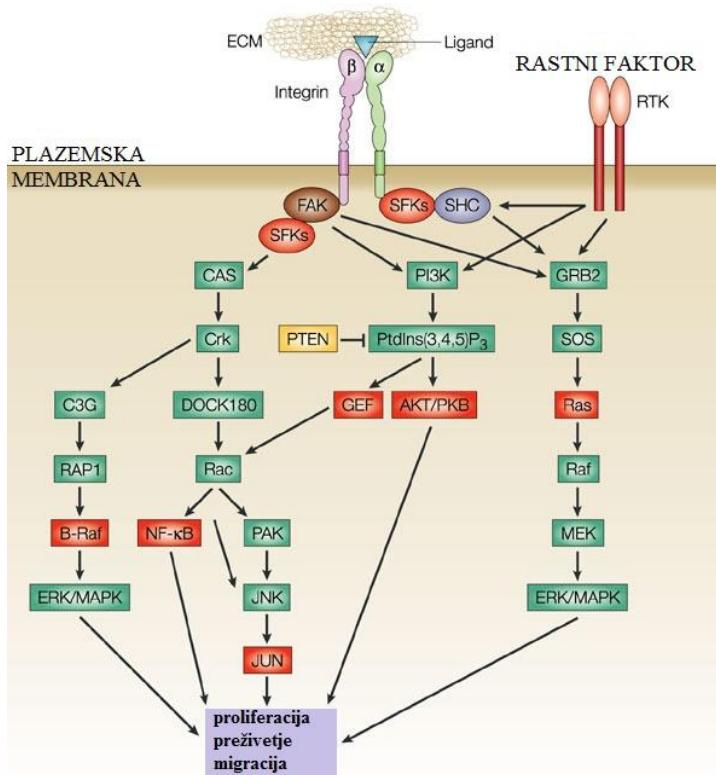
V fokalnih stikih je prisotna tudi nereceptorska tirozin kinaza Src, ki se preko SH3 domene veže s citoplazemskim repom  $\beta_3$ -integrina. Je član družine Src kinaz, kamor spadata tudi Fyn in Yes proteina. Na aktivnost Src kinaze vpliva vezava s FAK kinazo. Po aktivaciji in autofosforilaciji se FAK kinaza poveže z Src in jo stabilizira, kar poveča njeno katalitično aktivnost [43].

Integrini so edinstveni receptorji, ker lahko preko povezave s citoskeletom pretvorijo signale, ki jih sproži njihova vezava z molekulami ZM, v mehanske in kemične signale znotraj celice. Poleg tega se njihove signalne poti križajo s signalnimi potmi receptorjev rastnih faktorjev [43]. Aktivacija integrinskih receptorjev po vezavi z molekulami ZM spodbudi aktivacijo signalnih poti, ki so uravnavane tudi preko delovanja nevrotrofičnih dejavnikov. Medsebojno delovanje integrinov in nevrotrofičnih dejavnikov pri regeneraciji poškodovanih nevronov je bilo pokazano v več študijah, ki so dokazale, da vezava celic s proteinimi ZM že sama po sebi poveča razrast nevritov, dodatek trofičnega dejavnika v gojišče pa ta učinek še ojača. Nekatere študije celo nakazujejo, da razrast nevritov, spodbujena z nevrotrofičnimi dejavniki, zahteva vezavo z molekulami ZM preko integrinov, saj sta prisotnost antagonista  $\beta_1$ -podnote in inhibicija  $\beta_1$ -integrinske podnote zavrla rast nevronov, ki jo sproži NGF [45]. Druga razlaga medsebojnega delovanja je, da nevrotrofični dejavniki kot NGF preko »inside-out« signalizacije vplivajo na aktivacijo integrinov in s tem doprinesejo k povišanju tvorbe izrastkov nevronov. Dokazali so, da dodatek dejavnika NGF poveča izražanje integrinskih podenot in posledično aktivacijo znotrajceličnih signalnih molekul, kot je FAK, kar pospeši rast nevritov [5].

FAK kinaza je znana kot pomembno presečišče signalnih poti, posredovanih preko delovanja nevrotrofičnih dejavnikov in aktivacije integrinov. Vezava FAK s Src kinazo sproži Ras/MEK/MAPK signalno pot, ki jo sprožijo tako aktivacija integrinskega receptorja in tirozin kinaznega z nevrotrofičnimi dejavniki (Slika 7). Fosforilacija kinaz, kot sta MAPK in ERK1/2, spreminja tako dinamiko fokalnih stikov kot celično proliferacijo in preživetje ter uravnava celični cikel. Aktivacija integrinov uravnava tudi

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Akt kinazo. Aktivaciji FAK sledi premik PI3-K k fokalnim stikom, kjer se aktivira. Aktivirana PI3-K posledično aktivira nižje ležečo Akt kinazo, ki vpliva na z integrinom posredovano celično preživetje [43].



Slika 7: Prikaz prepletenih signalnih poti, ki jih sprožijo nevrotrofični dejavniki in integrini. V grobem so razdeljene v Src/FAK, Ras/MEK/MAPK in PI3-K/Akt signalne poti, preko katerih uravnavajo povezovanje aktinskega citoskeleta in drugih celičnih procesov [47].

Vse do danes izvedene študije nakazujejo na kompleksno prepletanje signalnih poti, ki vodijo v regeneracijo nevronskeih celic. Čeprav načina sodelovanja med nevrotrofičnimi dejavniki in integrini še niso popolnoma opredelili, pa vse skupaj nakazuje, da skupni učinki aktivacije integrinov in delovanja nevrotrofičnih dejavnikov niso rezultat samo povečanja števila, temveč tudi kompleksnosti signalnih poti.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

## 2. NAMEN DELA

$\gamma$ -Enolaza je glikolitičen encim, ki so mu dokazali nevrotrofično in nevropotekativno aktivnost. Preko aktivacije različnih signalnih poti sodeluje pri spodbujanju celičnega preživetja, rasti nevritov in regeneraciji poškodovanih nevronov. V procesu rasti novih izrastkov nevronskih celic so poleg nevrotrofičnih dejavnikov vpletene tudi površinski celični receptorji, imenovani integrini, preko katerih se celice povežejo z molekulami zunajceličnega matriksa. Signalne poti, ki vodijo v rast in regeneracijo poškodovanih nevronskih celic, še niso popolnoma opredeljene in so še vedno tarča številnih raziskav.

Namen magistrske naloge je opredeliti vlogo integrinov v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Na začetku bomo s pretočno citometrijo na PC12 celicah, ki jih bomo predhodno priraščali na proteine zunajceličnega matriksa, in celicah SH-SY5Y preverili vpliv  $\gamma$ -enolaze na izražanje  $\beta$ -integrinskih podenot. Nato bomo s konfokalno mikroskopijo ovrednotili morebitno interakcijo  $\gamma$ -enolaze z  $\beta$ -integrinskimi podenotami.

V nadaljevanju bomo s testom celičnega preživetja, določevanjem rasti nevritov in polimerizacije aktinskih filamentov v PC12 celicah v prisotnosti proteinov zunajceličnega matriksa in  $\gamma$ -enolaze ter preko določevanja  $\beta_1$ -integrina posredovane signalizacije opredelili povezavo med nadizraženimi  $\beta$ -integrinskimi podenotami in delovanjem  $\gamma$ -enolaze. V zadnjem delu magistrske naloge bomo s peptidnim antagonistom integrinske funkcije, GRGDS, potrdili vpliv  $\beta_1$ -integrinskega receptorja pri nevrotrofičnem signaliziranju  $\gamma$ -enolaze.

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1. MATERIALI

#### 3.1.1. Reagenti

Reagenti in topila, ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedni v Tabeli I.

Tabela I: Seznam reagentov in topil z navedenim proizvajalcem.

Reagenti	Proizvajalec
Advanced DMEM	Gibco, ZDA
BSA	Sigma-Aldrich, ZDA
DMSO	Gibco, ZDA
EDTA	Serva, ZDA
etanol (70 %; 96 %)	Riedel-de Haën, Nemčija
FBS	Hy-Clone, ZDA
formalin	Sigma-Aldrich, ZDA
HS	Gibco, ZDA
kolagen	Sigma-Aldrich, ZDA
laminin	Sigma-Aldrich, ZDA
L-glutamin	Sigma-Aldrich, ZDA
metanol	Sigma-Aldrich, ZDA
MTS	Promega, ZDA
nigrozin	Sigma-Aldrich, ZDA
PBS	Sigma-Aldrich, ZDA
penicilin/streptomicin	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, ZDA
poli-L-lizin	Sigma-Aldrich, ZDA
ProLongAntifade reagent	Thermo Fisher Scientific, ZDA
tripsin	Sigma-Aldrich, ZDA
Tris/HCl	Riedel-de Haën, Nemčija
Triton X-100	Fluka, ZDA

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

### 3.1.2. Protitelesa

Protitelesa, ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedna v Tabeli II in Tabeli III.

Tabela II: Seznam primarnih protiteles z navedenim proizvajalcem.

Primarna protitelesa	Proizvajalec
kunčja protitelesa proti $\beta_1$ -integrinski podenoti	Santa Cruz Biotechnology Inc., ZDA
kozja protitelesa proti $\beta_2$ -integrinski podenoti	Santa Cruz Biotechnology Inc., ZDA
kozja protitelesa proti $\beta_3$ -integrinski podenoti	Santa Cruz Biotechnology Inc., ZDA
kunčja protitelesa proti fosofrilirani FAK	Santa Cruz Biotechnology Inc., ZDA
mišjaprotitelesa proti $\gamma$ -enolazi	Santa Cruz Biotechnology Inc., ZDA
mišja protitelesa proti fosforilirani ERK	Santa Cruz Biotechnology Inc., ZDA
mišja protitelesa proti fosforilirani Akt	Santa Cruz Biotechnology Inc., ZDA

Tabela III: Seznam sekundarnih protiteles z navedenim proizvajalcem.

Sekundarna protitelesa	Proizvajalec
Oslova protitelesa proti mišjim, označena z Alexa Fluor 555	Invitrogen
Oslova protitelesa proti kunčjim, označena z Alexa Fluor 488	Invitrogen
Oslova protitelesa proti kozjim, označena z Alexa Fluor 555	Invitrogen

### 3.1.3. Peptidi

Peptidi, ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedni v Tabeli IV.

Tabela IV: Seznam peptidov z navedenim proizvajalcem.

Peptid	Proizvajalec
Peptid C-končenga dela $\gamma$ -enolaze ( $\gamma$ -Eno)	Bio-synthesis Inc., ZDA
GRGDS	Sigma-Aldrich, ZDA

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

### 3.1.4. Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, je navedna v Tabeli V.

Tabela V: Seznam laboratorijske opreme z navedenim proizvajalcem.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
avtomatske in navadne pipete	Eppendorf, Nemčija
Avtoklav A-63 CV	Kambič Laboratorijska oprema, Slovenija
centrifuga	Eppendorf Centrifuge 5804R, Nemčija
CO <sub>2</sub> inkubator CB 210	BINDER GmbH, Nemčija
čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Safire <sup>2</sup>	Tecan, Švica
epruvete za pretočni citometer	BD Biosciences, UDA
mikroepruvete	Sarstedt, Nemčija
centrifugirke	Sigma-Aldrich, ZDA
gojiščne plastenke	TPP, Švica
hladilnik (+4 °C)	LTH, Slovenija
inkubator WTB	BINDER GmbH, Nemčija
invertni mikroskop	Olympus, Japonska
invertni mikroskop s fotoaparatom	Olympus, Japonska
komora z laminarnim pretokom zraka SMBC 183 AV	Iskra PIO, Slovenija
konfokalni mikroskop LSM 710	Carl Zeiss, Nemčija
mikrotitrskie plošče	TTP, Švica
nastavki za pipete	Sarstedt, Nemčija
plošče s 24 vdolbinicami	TTP, Švica
plošče z 12 vdolbinicami	TTP, Švica
pretočni citometer Attune NxT	Thermo Fischer Scientific, ZDA
programska oprema FlowJo	FLOWJO, LLC, ZDA
serološke pipete	Sarstedt, Nemčija
zamrzovalnik (-80 °C)	Gorenje, Slovenija

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

### 3.1.5. Gojišča

Gojišča, ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedna v Tabeli VI.

Tabela VI: Seznam uporabljenih gojišč in njihova sestava.

Gojišče	Sestava gojišča (Vgojišča=100 mL)
Gojišče za celice SH-SY5Y	88 mL aDMEM 10 mL FBS 1,0 mL penicilin/streptomicin 1,0 mL L-glutamin
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

Gojišča, ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedni v Tabeli VI.

Tabela VII: Seznam uporabljenih pufrov in njihova sestava

Pufer	Sestava pufra
Fosfatni pufer z dodatkom NaCl (PBS)	1,8 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ 0,24 g $KH_2PO_4$ 8,0 g NaCl 0,2 g KCl dopolnimo z $dH_2O$ do 1 L in uravnamo pH na 7,4.
Pufer A	1,6 mL $Na_2CO_3$ 2,94 g $NaHCO_3$ 0,2 g $NaN_3$ Dopolnimo z $dH_2O$ do 1 L in uravnavamo pH na 9,6.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

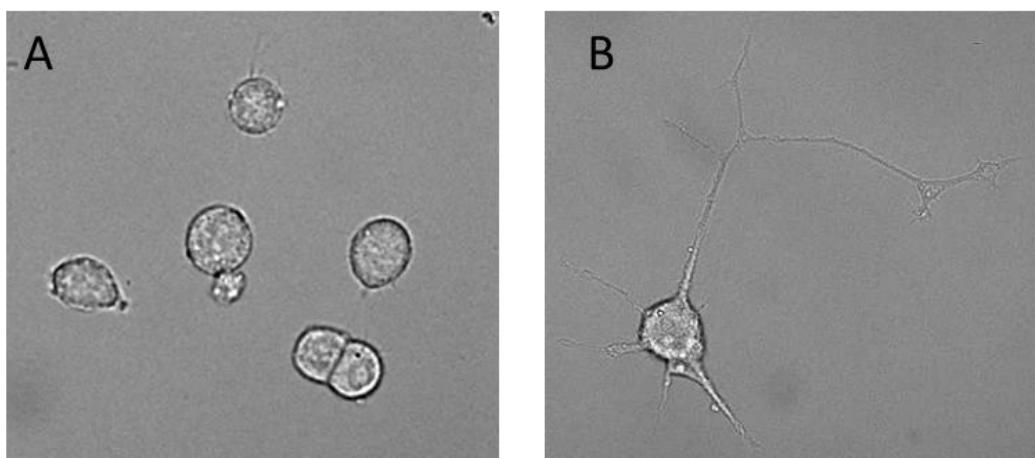
### 3.1.7. Celične linije

#### 3.1.7.1. Celična linija SH-SY5Y

Celična linija SH-SY5Y je trikrat klonirana podlinija SK-NK-SH celic človeškega nevroblastoma, t. i. nevroendokrinega tumorja, ki se pojavlja na stiku živčnega in žlezjnega tkiva v simpatičnem živčevju. SH-SY5Y celična linija izkazuje markerje nevronske encimske aktivnosti (tirozin- in dopamin- $\beta$ -hidroksilaze, specifični privzem noradrenalina in izražaje enega ali več nevrofilamentskih proteinov). Dodatno izražajo še opioidne, muskarinske receptorje in receptorje nevronskih rastnih faktorjev [48].

#### 3.1.7.2. Celična linija PC12

Celična linija PC12 je nesmrtna linija, dobljena iz mišjega tumorja, ki izvira iz kromafinih celic sredice nadledvične žleze (feokromocitom). Uporabna je za proučevanje celične signalizacije, saj obstaja le nekaj rastnih faktorjev, nevrotrofinov in hormonov, na katere je neodzivna. Omogoča nam neodvisno preučevanje izrazitih sprememb diferenciacije, proliferacije in preživetja. Po diferenciaciji z NGF, PC12 celice spominjajo na fenotip simpatičnih ganglijskih nevronov [49].



Slika 8: Prikaz PC12 celic, ki so nediferencirane (A), in diferenciranih PC12 celic po stimulaciji z NGF (B) [50].

#### 3.1.7.3. Odmrzovanje celične linije

Celice, zamrznjene v tekočem dušiku (-196°C), smo hitro odtalili v vodni kopeli (37°C) in odmrznjene celice resuspendirali v 8 mL predhodno ogretega gojišča (37°C), ki je ustrezalo določeni celični liniji. Suspenzijo celic smo 5 min centrifugirali pri 1200 obr/min.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Celicam smo nato odlili supernatant in jih ponovno resuspendirali v ustreznem svežem gojišču ter jih prenesli v gojiščno plastenko.

#### ***3.1.7.4. Gojenje celične kulture***

Celične kulture vedno gojimo v aseptičnih pogojih. Tudi vsi reagenti in ves pribor, ki ga uporabljamo pri delu, mora biti sterilен. Gojiščne plasenke shranjujemo v celičnem inkubatorju pri 37°C, ki ima atmosfero nasičeno z vlogo in 5% CO<sub>2</sub>. Po približno 3 do 4 dneh, odvisno od hitrosti deljenja, celice prerastejo 70 do 80% površine plasenke. Po tem času v izrabljenem gojišču začne primanjkovati hranilnih snovi ter rastnih dejavnikov za celice in v njem se začnejo kopićiti razgradni produkti celic. Da preprečimo odmrtje celic, moramo gojišče pogosto menjati, običajno na 3-4 dni. Adherentne celice moramo najprej tripsinizirati.

#### ***3.1.7.5. Menjava medija***

##### **1. SH-SY5Y:**

Iz gojiščne plasenke najprej zavrzemo izrabljeno gojišče in pritrjene celice speremo z 0,02 % EDTA v PBS pufra. Nato celicam dodamo 5 mL 0,02 % EDTA v PBS in 20 µL tripsina (0,05 %). Po približno 10 min inkubacije pri 37°C se celice odlepijo s podlage. V plasenko nato dodamo 5 mL svežega gojišča, da zmanjšamo učinek tripsina in celotno celično suspenzijo prenesemo v centrifugirko. Centrifugiramo pri 1200 obr/min. Na koncu supernatant zavrzemo in celice resuspendiramo v svežem gojišču ter jih del vrnemo v gojiščno plasenko.

##### **2. PC12:**

Pri suspenzijskih celicah na začetku izrabljenega gojišča ne zavrzemo, temveč ga prenesemo v centrifugirko. Celicam dodamo 5 mL 0,02 % EDTA v PBS in inkubiramo 10 min na 37°C, da deadheriramo morebitno pritrjene celice. Celice nato prenesemo v centrifugirko, kamor smo že prej dodali izrabljeno gojišče s celicam in centrifugiramo pri 1200 obr/min. Odlijemo supernatant in jih resuspendiramo v svežem gojišču ter jih del vrnemo v gojiščno plasenko.

#### ***3.1.7.6. Štetje celic***

Za uspešno in pravilno izvedbo poskusa je potrebno uporabiti ustrezeno koncentracijo celic. Zato moramo pred vsakim poskusom celice prešteti. To storimo tako, da po zgoraj

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

opisanem postopku odlepimo celice od podlage gojiščne plstenke in jih homogeno resuspendiramo. Odvzamemo  $50 \mu\text{L}$  celične suspenzije in ji dodamo  $50 \mu\text{L} 0,2\%$  nigrozina ter dobro premešamo. Nigrozin črno obarva samo mrtve celice, ki jih pri štetju ne upoštevamo. Za štetje uporabljamo objektno steklce s števno komoro (komora Thoma), na katero nanesemo suspenzijo celic in nigrozina. Pod invertnim mikroskopom preštejemo žive celice in izračunamo število celic v celotnem volumnu celične suspenzije. Za izračun uporabimo naslednjo enačbo:

$$N = 2 \cdot N' \cdot 10^4 \text{mL}^{-1} \quad \text{Enačba 1}$$

$N$ ... število celic v  $\text{mL}$  celične suspenzije

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

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Optična mikroskopija

Optična mikroskopija je ključno orodje sodobne celične biologije za proučevanje strukture in lastnosti celic. Na voljo imamo veliko fluorescenčnih označevalcev, s katerimi lahko označimo proteine, organele in druge strukture, poleg tega pa sorazmerno nemoteča narava svetlobe omogoča opazovanje živih celic daljše časovno obdobje [51].

Na splošno lahko svetlobno mikroskopijo delimo v dve kategoriji: na klasično svetlobno in na fluorescenčno mikroskopijo. Pri svetlobni mikroskopiji sta vir svetlobe in objektiv postavljena na nasprotni strani vzorca. Ko svetloba preide vzorec, se absorbira, razprši ali odbije. Ker pa so celice zelo tanke in prozorne, absorbirajo zelo malo svetlobe, kar oteži opazovanje celičnih struktur. Za opazovanje večjih celičnih kultur se uporablja obrnjeni mikroskop, t.i. invertni, s katerim opazujemo vzorec s spodnje strani, vir svetlobe pa je nad vzorcem [51]. Pri našem eksperimentalnem delu smo za opazovanje PC12 celic in za vrednotenje števila izrastkov uporabljali invertni mikroskop Olympus.

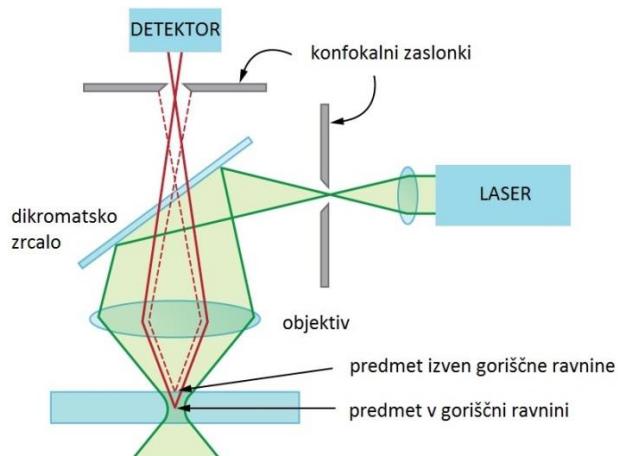
Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.



Slika 9: Shema invertnega mikroskopa [52].

Fluorescenčna mikroskopija uporablja fluorescenčna barvila, ki absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine in oddajajo svetlobo z daljšo valovno dolžino. Večina celičnih molekul ni dobro fluorescentna, zato je potrebno dodati fluorescentne označevalce. To nam omogoča specifično opazovanje tarčnih molekul, ki nas zanimajo. Najbolj uporabljeni tehnika fluorescenčne mikroskopije je fluorescenčna konfokalna mikroskopija [53].

Konfokalna fluorescenčna mikroskopija je mikroskopska tehnika, s katero lahko iz dvodimenzionalnih slik tankih rezin vzorca z računalniško obdelavo dobimo tridimenzionalno sliko preparata. Princip delovanja temelji na točkovnem osvetljevanju preparata, kar dosežemo z uporabo laserja in zaslonke z zelo majhno odprtino, skozi katero usmerimo žarek [54]. Pri našem eksperimentalnem delu smo za opazovanje aktinskih vlaken in kolokalizacije  $\beta$ -integrinskih podenot in  $\gamma$ -enolaze uporabljali konfokalnim mikroskopom Carl Zeiss LSM 710.



Slika 10: Shema konfokalnega mikroskopa [55].

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

### **3.2.1.1. *Vrednotenje števila izrastkov nevronskih celic***

Invertni mikroskop smo uporabili za vrednotenje števila izrastkov celic PC12 po priraščanju le teh v vdolbinicah, prekrivih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom, ter nadaljnji stimulaciji s peptidom C-terminalnega dela  $\gamma$ -enolaze ( $\gamma$ -Eno). Dodatno smo vpliv  $\gamma$ -Eno na rast nevritov preko integrinskega receptorja preverili z antagonistom integrinskega receptorja, peptidom GRGDS.

*Izvedba:*

Plošče s 24-imi vdolbinicami smo obdelali z raztopinami proteinov ZM in poli-L-lizinom pri koncentraciji 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ki smo jih redčili v sterilnem pufru A (kolagen 1/200, laminin 1/100 in poli-L-lizin 1/100). Plošče smo inkubirali 2 h pri 37°C in nato na površino vdolbinic nasadili PC12 celice ( $2 \times 10^5/750\mu\text{L}$ ) v kompletnem gojišču. Čez 24 h smo celicam dodali peptid  $\gamma$ -Eno (100 nM) v brez-serumskem gojišču. Kot kontrolo smo uporabili vzorce, pri katerih smo PC12 celice gojili v brez-serumskem gojišču brez dodanega peptida. Po 24 h, 48 h in 72 h tretiranja smo PC12 celicam določili število izrastkov oz nevritov. Za vsak posamezen tretma smo 4-krat prešteli po 100 celic in nato izračunali povprečje. Upoštevali smo celice, ki so imele enega ali več izrastkov, ki so daljši od premera celice. Celice smo opazovali z invertnim mikroskopom Olympus IX 81.

Pri preverjanju vpliva peptida GRGDS na nevritogene učinke  $\gamma$ -enolaze smo PC12 celice ravno tako nasadili na plošče, ki smo jih predhodno prekrili s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom. Naslednji dan smo celicam najprej dodali peptid GRGDS (10  $\mu\text{M}$ ) v brez-serumskem gojišču in inkubirali 30 min ter nato dodali še peptid  $\gamma$ -Eno (100 nM). Po 24 h, 48 h in 72 h smo določili število izrastkov celicam PC12.

### **3.2.1.2. *Spremljanje polimerizacije aktinskih filamentov***

Vpliv  $\gamma$ -enolaze na rast nevritov preko integrinskega receptorja smo potrdili še z vrednotenjem polimerizacije aktinskih filamentov, ključnega dogodka pri tvorbi nevritov, in sicer s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa, pri čemer smo celice PC12 prav tako priraščali v vdolbinicah prekrivih s kolagenom, laminino in poli-L-lizinom ter jih naslednji dan stimulirali s peptidom  $\gamma$ -Eno in označili za aktinske filamente.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

*Izvedba:*

Za mikroskopsko opazovanje polimerizacije F-aktina smo PC12 celice ( $5 \times 10^4$ /750  $\mu\text{L}$ ) nasadili na okrogle krovna stekelca v ploščah s 24-imi vdolbinicami, na katera smo predhodno nanesli raztopine proteinov ZM in poli-L-lizina (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Celice smo tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM). Po 24 h smo zavrgli gojišče in celice fiksirali s 750  $\mu\text{L}$  5% formalina v PBS in pustili stati 20 min na sobni temperaturi. Celice smo nato sprali s PBS in jih permeabilizirali z 0.1% Triton x-100 v PBS ter inkubirali 3 min na sobni temperaturi. Po končani premeabilizaciji smo celice sprali s PBS in označili z barvilom za aktinske filamente Phalloidin-TRITC (500 ng/mL), ki smo ga redčili v 20 mM pufru Tris/HCl. Inkubirali smo 30 min pri 37°C. Po končani inkubaciji smo krovna stekelca s pritrjenimi celicami trikrat sprali s PBS in jih posušili na zraku. Krovna stekelca smo nato položili na Menzel objektna stekelca, na katera smo predhodno dodali po kapljico ProLongAntifade reagenta z dodanim barvilm jeder (DAPI). Preparate smo čez noč shranili na + 4°C. Naslednji dan smo okrogle krovna stekelca obrobili z lakom in tako pripravili trajne preparate. Preparate smo poslikali z invertnim konfokalnim mikroskopom Carl Zeiss LSM 710.

### **3.2.1.3. Spremljanje kolokalizacije $\gamma$ -enolaze in $\beta_1$ -integrina**

Z določanjem kolokalizacije  $\gamma$ -enolaze in  $\beta$ -integrina v PC12 celicah po izpostavitvi kolagenu, lamininu in poli-L-lizinu s pomočjo konfokalnega mikroskopa smo proučevali morebitno interakcijo med proteinoma in s tem vpletjenost  $\beta$ -integrinov v delovanje  $\gamma$ -enolaze.

*Izvedba:*

PC12 celice ( $5 \times 10^4$ /750  $\mu\text{L}$ ) smo nasadili na okrogle krovna stekelca v ploščah s 24-imi vdolbinicami, na katera smo predhodno nanesli raztopine proteinov ZM in poli-L-lizina (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Po 24 h smo celice fiksirali 20 min s 750  $\mu\text{L}$  5% formalina v mrzlem PBS na sobni temperaturi. Po končani fiksaciji smo celice sprali z 1 mL PBS, dodali 500  $\mu\text{L}$  0,25% Triton-X-100 v PBS in jih permeabilizirali 10 min na sobni temperaturi. Nato smo jih dvakrat sprali z 1 mL PBS in dodali 700  $\mu\text{L}$  3% BSA v PBS, s katerim smo preprečili nespecifično vezavo protiteles. Po 30-min inkubaciji na sobni temperaturi smo odvzeli blokirni pufer in dodali primarna protitelesa proti  $\beta_1$ -integrinski podenoti (20  $\mu\text{g/mL}$ ) in  $\gamma$ -enolazi (20  $\mu\text{g/mL}$ ) v 3% BSA v PBS ter inkubirali 2 h na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo celice trikrat sprali z 1 mL PBS in dodali 250  $\mu\text{L}$  pripravljene raztopine

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

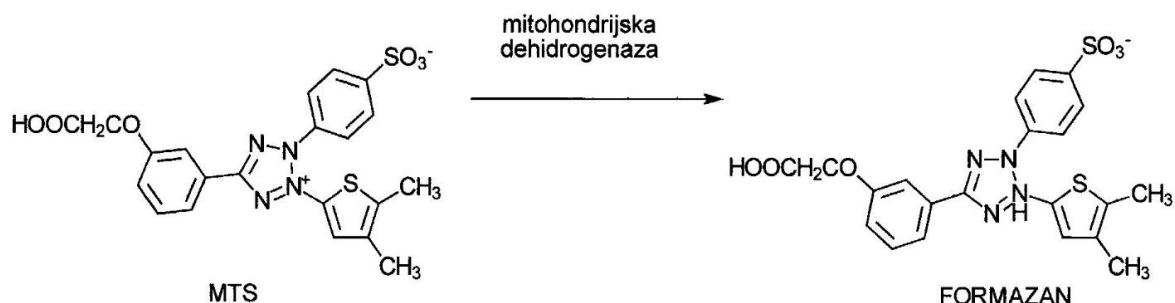
sekundarnih protiteles, konjugiranih s fluorokromom, ki smo jih redčili v 3% BSA v PBS (1  $\mu$ L/1000  $\mu$ L). Sledila je 90-minutna inkubacija na sobni temperaturi. Nato smo krovna stekelca trikrat sprali z 1 mL PBS in dodali 500  $\mu$ L PBS. Iz vdolbinic smo pobrali krovna stekelca in jih posušili na zraku. Na Menzel objektna stekelca smo dodali eno kapljico ProLongAntifade reagenta z dodanim barvilom jeder (DAPI) in nanjo nanesli krovna stekelca ter čez noč shranili pri +4°C. Naslednji dan smo krovna stekelca obrobili z lakom, da smo preprečili sušenje preparatov. Preparate smo slikali z invertnim konfokalnim mikroskopom Carl Zeiss LSM 710, ko-lokalizacijo pa ocenili s pomočjo programske opreme ZEN 2011.

### 3.2.2. Spektrofotometrija

Za določanje celičnega preživetja se pogosto uporablajo spektrofotometrične metode, s katerimi določimo količino obarvane spojine, ki se nahaja v vzorcu. Po poškodbi pride v celici do različnih funkcionalnih sprememb, ki jih lahko izrabimo za določanje celične viabilnosti; npr. okvaro na ravni encimskega sistema lahko zaznamo z merjenjem absorbance vijolično obravanhga formazana, ki je razgradni produkt MTS reagenta, ki ga dodamo v celično gojišče. Vsaka okvara encimskega sistema bo zmanjšala količino razgradnega produkta in s tem tudi absorbanco [55].

#### 3.2.2.1. Vrednotenje celičnega preživetja s testom MTS

Za določanje encimske aktivnosti celic se uporablajo različne tetrazolijeve soli. Osnova teh metod je cepitev tetrazolijeve soli z mitohondrijskim enimom sukcinat dehidrogenaza in tvorba obarvanega produkta imenovanega formazan, ki ga lahko kvantitativno določimo s spektrofotometrijo [57].



Slika 11: Pretvorba MTS reagenta v vijolično obarvan produkt formazan.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Za določanje celične viabilnosti smo uporabili tetrazolijev derivat MTS. Celice ga po prevzetju pretvorijo v vijolično obarvan produkt formazan, ki ima maksimum absorpcije pri valovni dolžini 492 nm. Iz absorbance izračunamo delež živih celic po naslednji enačbi:

$$\text{Delež živih celic (\%)} = \left( \frac{\text{Avzorec} - \text{Aslepa}}{\text{Akontrola} - \text{Aslepa}} \right) \times 100 \quad \text{Enačba 2}$$

Avzorec.....absorbanca vzorca celic, tretiranih z  $\gamma$ -Eno

Akontrola.....abosorbanca vzorca celic brez dodane  $\gamma$ -Eno

*Izvedba:*

Mikrotitrskie plošče, plošče z 96-imi vdolbinicami, smo prekrili z raztopinami proteinov ZM in poli-L-lizina (10  $\mu\text{g/mL}$ ), ki smo jih redčili v sterilnem pufru A (kolagen 1/200, laminin 1/100 in poli-L-lizin 1/100). Plošče smo inkubirali 2 h pri 37°C in nato vdolbinicam dodali po 100  $\mu\text{L}$  celične suspenzije PC12 celic ( $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ ). Celice smo priraščali tekom noči, naslednji dan pa tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) v brez-serumskej gojišču nadaljnjih 24 h, 48 h in 72 h. Kontrolnim vzorcem smo dodali samo brez-serumsko gojišče. Po izbranih časovnih točkah smo dodali MTS reagent (10  $\mu\text{L}$ ). Po 1 h inkubaciji z reagentom pri 37°C smo s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire<sup>2</sup> spektrofotometrično pomerili absorbanco vzorcev pri valovni dolžini 492 nm in iz nje izračunali delež preživelih celic.

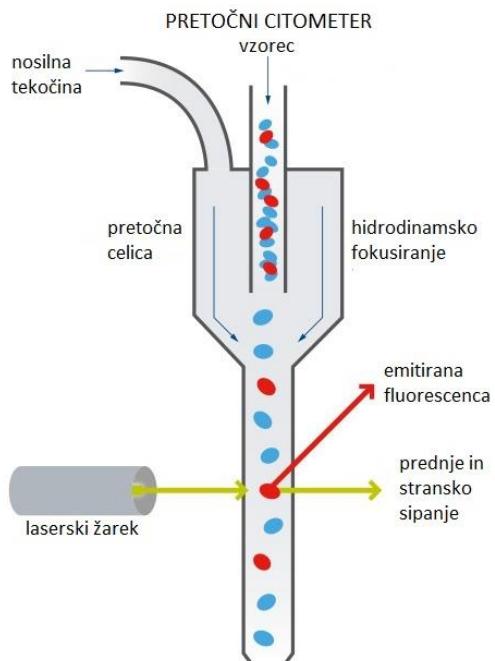
Pri preverjanju vpliva peptida GRGDS na delovanje  $\gamma$ -enolaze smo PC12 celice ravno tako nasadili na plošče, ki smo jih predhodno prekrili s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom. Naslednji dan smo celicam najprej dodali peptid GRGDS (10  $\mu\text{M}$ ) v brez-serumskej gojišču, jih inkubirali 30 min ter nato dodali še peptid  $\gamma$ -Eno (100 nM). Po 24 h, 48 h in 72 h smo celicam dodali MTS reagent ter po 1 h inkubaciji pomerili absrobanco pri 492 nm.

### 3.2.3. Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je tehnika, ki sočasno meri in analizira številne fizikalne lastnosti posameznih celic, ki ena za drugo potujejo skozi snop laserske svetlobe. Uporablja se za merjenje relativne velikosti, relativne granularnosti oz. kompleksnosti in relativne intenzitete fluorescence. Ob prehodu laserskega žarka skozi vzorec večina fotonov neovirano prispe do fotodetektorja, nekateri pa zaradi ovir spremenijo smer, kar opazimo kot odboj oz. razprševanje svetlobe. Obseg sisanja je odvisen od fizikalnih lastnosti celic,

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

kot je velikost in notranja zrnatost. Dejavniki, ki vplivajo na razprševanje svetlobe, so celična membrana, jedro in vsak zrnat delec znotraj celice. Oblika in površina celice prav tako vplivata na celotno sipanje [58].



Slika 12: Shema pretočnega citometra [59].

Pretočni citometer je sestavljen iz dveh fotodetektorjev, ki merita količino razpršene svetlobe, ki jo odda celica. Prvi detektor je FALS (angl. forward angle light scatter), ki se nahaja v ravnini laserskega žarka in meri količino odbite svetlobe, ki je posledica interakcije svetlobe s celičnimi membranami. Ta parameter imenujemo prednje sipanje (angl. forward scatter) in je sorazmeren velikosti celic. Čim večje je sipanje svetlobe in tem signal na fotodetektorju, tem večja je celica. Drugi detektor imenujemo RALS (angl. right angle light scatter). Nahaja se pravokotno v smeri potovanja laserskega žarka in zazna stransko sipanje (angl. side scatter), ki je povezano z granuliranostjo celic. Več kot ima celica notranjih organelov, večje je sipanje in s tem signal na detektorju.

Pretočni citometer sestavljajo tudi fluorescenčni detektorji, ki nam omogočajo analiziranje funkcionalnih lastnosti celic. Celice predhodno označimo s fluorescentnim barvilom ali s specifičnim protitelesom proti določenemu antigenu, ki je konjugiran s fluorokromom. Fluorescentna komponenta absorbira svetlobo valovne dolžine, ki je zanjo značilna, in oddaja svetlobo z večjo valovno dolžino. Absorpcija svetlobe vzbudi prehod elektrona v vzbujeno stanje, v katerem ostane le kratek čas. Kmalu preide nazaj v osnovno stanje in

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

odda presežek energije v obliki fotonov svetlobe. Takšen prenos energije imenujemo fluorescenco. S fluorescenčnim detektorjem merimo relativno intenziteto oddane svetlobe, ki predstavlja količino barvila ali vezanih protiteles in tako poleg morfoloških lastnosti dobimo podatke o vrsti in jakosti oddanih signalov [60, 61].

V okviru magistrske naloge smo s pretočno citometrijo določali več različnih lastnosti celic PC12, ki jih je povzročila stimulacija s peptidom  $\gamma$ -Eno ter vezava celic z molekulami ZM. Celice smo v ta namen označili bodisi s fluorescentnim barvilom za spremljanje polimerizacije aktinskih filamentov bodisi s specifičnimi protitelesi za vrednotenje izražanja posameznih integrinskih podenot na površini membrane PC12 celic ter stopnji fosforilacije znotrajceličnih signalnih kinaz. Uporaba sekundarnih protiteles, označenih s fluorokromom, je omogočala detekcijo z uporabo ustreznih fluorescenčnih detektorjev pretočnega citometra Attune NxT.

### **3.2.3.1. *Analiza izražanja integrinskih podenot***

S pretočnim citometrom smo proučevali vpliv peptida, ki posnema C-terminalni del  $\gamma$ -enolaze, na izražanje integrinskih receptorjev na površini membrane PC12 celic, ki smo jih priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom.

Izvedba:

SH-SY5Y celice ( $2 \times 10^5$ /750  $\mu\text{L}$ ) in PC12 celice ( $2 \times 10^5$ /750  $\mu\text{L}$ ) smo nasadili na plošče z 12 vdolbinicami, ki smo jih predhodno obdelali z raztopinami proteinov ZM in poli-L-lizina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), redčenimi v sterilnem pufru A (kolagen 1/200, laminin 1/100 in poli-L-lizina 1/100). Celice smo priraščali tekom noči v kompletnem gojišču, naslednji dan pa smo le-to zamenjali z brez-serumskim gojiščem. Vsem, razen kontrolnim vzorcem, smo pri izbranih časovnih točkah (3 h in 24 h) dodali peptid  $\gamma$ -Eno (100 nM). Po končanem tretiranju smo gojišče prestavili v ustrezeno označene 1,5 mL epice. Celicam smo nato dodali 1 mL EDTA v PBS in inkubirali 10 min pri 37°C. Zatem smo suspenzijo celic prenesli v epice, kamor smo prej že prestavili odvzeto gojišče in centrifugirali pri 2000 obr/min. Celice smo sprali z 1 mL PBS in jim nato dodali 200  $\mu\text{L}$  3% BSA v PBS, s katerim smo preprečili nespecifično vezavo protiteles. Resuspendirane celice smo razdelili na dva dela in polovici vzorcev dodali po 100  $\mu\text{L}$  raztopin primarnih protiteles proti  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - in  $\beta_3$ -integrinski podenoti. Drugo polovico smo pustili nedotaknjeno. Primarna protitelesa smo redčili v 3% BSA v PBS (2  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ ). Celice smo inkubirali 45 min na

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

+4°C in jih nato sprali z 1 mL PBS. Sledila je inkubacija s sekundarnimi protitelesi, označenim z barvilom AlexaFluor-555 ali AlexaFluor-488, ki smo jih redčili v 3% BSA v PBS (1  $\mu$ L/500  $\mu$ L). Vsakemu vzorcu smo dodali 100  $\mu$ L pripravljene raztopine sekundarnih protiteles in jih nato inkubirali 30 min +4°C. Po končani inkubaciji smo celice sprali z 1 mL PBS in jih resuspendirali v 200  $\mu$ L PBS. Pripravljene vzorce smo pomerili na pretočnem citometru Attune NxT, dobljene rezultate meritev pa obdelali s pomočjo programske opreme FlowJo.

### **3.2.3.2. *Spremljanje polimerizacije aktina s pretočnim citometrom***

Poleg fluorescenčne mikroskopije, smo vpliv  $\gamma$ -enolaze na rast nevritov oz polimerizacijo aktinskih filamentov preko integrinskega receptorja proučevali tudi s pomočjo pretočnega citometra, pri čemer smo celice PC12 priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom ter jih naslednji dan stimulirali s peptidom  $\gamma$ -Eno in označili za aktinske filamente.

*Izvedba:*

PC12 celice ( $2 \times 10^5$ /750  $\mu$ L) smo nasadili na plošče s 24 vdolbinicami, ki smo jih predhodno obdelali z raztopinami proteinov ZM in poli-L-lizina (10  $\mu$ g/mL), redčenimi v sterilnem pufru A (kolagen 1/200, laminin 1/100 in poli-L-lizin 1/100). Celice smo priraščali tekom noči v kompletnem gojišču, naslednji dan pa smo celice tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) za 3 h in 24 h v brez-serumskem gojišču. Pri kontrolnih vzorcih smo uporabili samo brez-serumskego gojišča. Po izbranih časovnih točkah smo gojišče prestavili v 1,5 mL epice, pritrjenim celicam pa dodali 1mL EDTA v PBS in inkubirali 10 min pri 37°C. Vsebino vdolbinic smo po inkubaciji prenesli v epice, v katere smo že dodali gojišče, in celično suspenzijo razdelili na dva dela ter centrifugirali. Nato smo celice fiksirali s 500  $\mu$ L 5% (w/v) formalina v PBS in jih inkubirali 20 min na sobni temperaturi. Celice smo po inkubaciji sprali s PBS in permeabilizirali z 0.1% Triton X-100 v PBS. Po 5-minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo celice sprali s PBS. Nato smo jih označili z barvilom za aktinske filamente Phalloidin-TRITC (500 ng/mL), ki smo ga redčili v 20 mM pufru Tris/HCl in inkubirali 20 min na 37°C. Celice smo potem sprali s PBS in centrifugirali. Po centrifugiranju smo celice resuspendirali v 200  $\mu$ L PBS in vzorce pomerili na pretočnem citometru Attune NxT. Relativno vsebnost F-aktina smo določili z uporabo programske opreme FlowJo.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

### 3.2.3.3. *Analiza izražanja stopnje fosforilacije signalnih molekul*

S pretočnim citometrom smo proučevali aktivacijo signalnih poti, udeleženih pri nevritogenem delovanju  $\gamma$ -enolaze preko integrinov, pri čemer smo celice PC12 priraščali v vdolbinicah prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom ter naslednji dan stimulirali s peptidom  $\gamma$ -Eno in jih označili s specifičnimi protitelesi proti fosforiliranim signalnim kinazam Fak, Akt in ERK.

*Izvedba:*

PC12 celice ( $2 \times 10^5$ /750  $\mu\text{L}$ ) smo nasadili na plošče s 24 vdolbinicami, ki smo jih predhodno obdelali z raztopinami proteinov ZM in poli-L-lizina (10  $\mu\text{g/mL}$ ), redčenimi v sterilnem pufru A (kolagen 1/200, laminin 1/100 in poli-L-lizin 1/100). Celice smo priraščali tekom noči v kompletnem gojišču, naslednji dan pa smo celice tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) v časovnem intervalu 30 do 180 min. V primeru proučevanja vpliva antagonista integrinske funkcije smo celice PC12 pred stimulacijo s peptidom  $\gamma$ -Eno pretretirali s peptidom GRGDS (10  $\mu\text{M}$ ) za 30 min. Po končanem tretiranju smo gojišče iz vdolbinic prenesli v ustrezeno označene 1,5 mL epice. Celicam smo dodali 1 mL EDTA v PBS, inkubirali 10 min na  $37^\circ\text{C}$  in nato prenesli v iste epice. Celično suspenzijo smo centrifugirali pri 2000 obr/min in nato dodali 250  $\mu\text{L}$  5% formalina v mrzlem PBS. Po 15-minutnem fiksiranju na sobni temperaturi smo celice sprali z 1 mL PBS in jih permeabilizirali z 250  $\mu\text{L}$  ledeno-mrzlega MeOH. Epice smo za 20 min prestavili v hladilnik na  $+4^\circ\text{C}$  in po končani inkubaciji sprali z 1 mL PBS. Za blokiranje prostih vezavnih mest smo nato celicam dodali 200  $\mu\text{L}$  3% BSA v PBS in jih inkubirali 20 min na sobni temperaturi. Celice smo razdelili na dva dela, polovici vzorcev dodali 2  $\mu\text{L}$  primarnega protitelesa proti fosforilirani kinazi FAK (2  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ ), fosforilirani kinazi ERK (2  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ ) in fosforilirani kinazi Akt (2  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ ) ter jih inkubirali 45 min pri  $+4^\circ\text{C}$ . Po potekli inkubaciji smo celice sprali z 1 mL PBS in jim dodali 200  $\mu\text{L}$  pripravljene raztopine sekundarnih protiteles, označenih z barvilom AlexaFluor-555 (1  $\mu\text{L}/500 \mu\text{L}$ ), redčenih v 3% BSA v PBS. Po 30-minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo celice zopet sprali z 1 mL PBS in centrifugirali. Celice smo nato resuspendirali v 200  $\mu\text{L}$  PBS in jih prestavili v epruvete za pretočni citometer. Pripravljene vzorce smo pomerili na pretočnem citometru Attune NxT, dobljene rezultate meritev pa obdelali s pomočjo programske opreme FlowJo.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

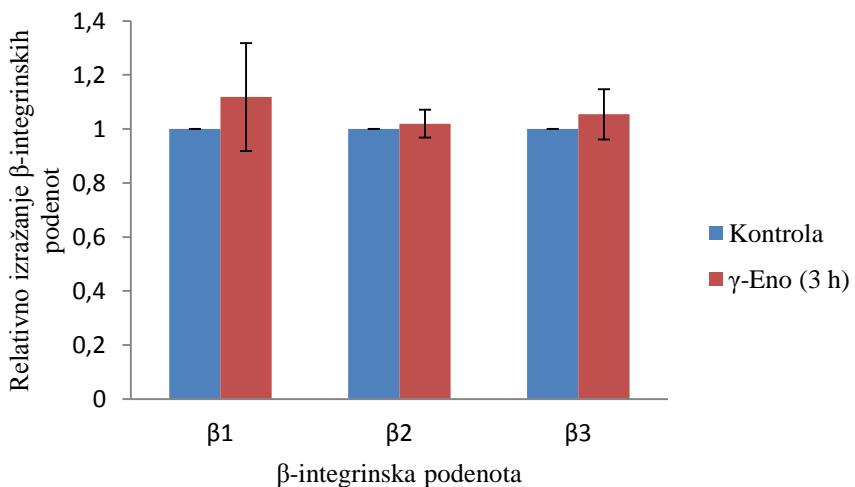
### *3.2.4. Statistično vrednotenje rezultatov*

Statistično ovrednotene rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost več (n) neodvisnih bioloških meritev  $\pm$  standardna deviacija. 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 P vrednosti in razlike med vzorci označili kot statistično značilne, če je bila vrednost  $P < 0,05$ , kar smo označili z zvezdico (\*) oz  $P < 0,1$ , kar smo označili z dvema zvezdicama (\*\*). Analiza je bila izvedena s pomočjo programske opreme Microsoft Excel 2016.

## 4. REZULTATI

### 4.1. VREDNOTENJE VPLIVA $\gamma$ -ENOLAZE IN MOLEKUL ZM NA IZRAŽANJE $\beta$ -PODENOT INTEGRINSKIH RECEPTORJEV NA POVRŠINI SH-SY5Y IN PC12 CELIC

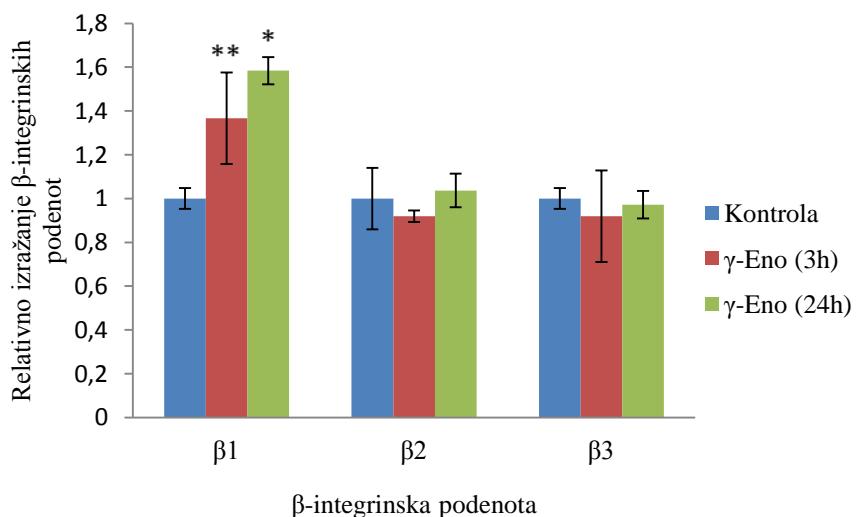
V magistrski nalogi smo želeli opredeliti vlogo  $\beta$ -integrinskih receptorjev v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Kot prvo smo preverili vpliv  $\gamma$ -enolaze na izražanje  $\beta$ -integrinskih podenot na površini membrane nevronskih celic SH-SY5Y, pri čemer smo uporabili peptid dolg 30 aminokislin ( $\gamma$ -Eno), ki posnema C-terminalni del  $\gamma$ -enolaze, odgovoren za nevrotrofično delovanje. V ta namen smo SH-SY5Y celice nasadili na plošče, ki smo jih predhodno prekrili s kolagenom, proteinom ZM. Priraščene celice smo nato tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno v brez-serumskem gojišču in po 3 h inkubacije pri 37°C celice označili s specifičnimi protitelesi proti  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - in  $\beta_3$ -integrinski podenoti ter v nadaljevanju še z ustreznimi sekundarnimi protitelesi, označenimi s fluorokromom. Izražanje  $\beta$ -integrinskih podenot na površini membrane smo pomerili s pomočjo pretočnega citometra in iz Slike 13 je razvidno, da  $\gamma$ -Eno nima statistično značilnega vpliva na izražanje katere koli izmed  $\beta$ -integrinskih podenot na površini membrane SH-SY5Y celic.



Slika 13: Izražanje  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - in  $\beta_3$ -integrinskih podenot na površini membrane SH-SY5Y celic. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom (10  $\mu$ g/mL), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) za 3 h v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumske gojišče. Relativno izražanje  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - in  $\beta_3$ -integrinskih podenot smo določili s pretočnim citometrom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija (n=3).

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Vpliv  $\gamma$ -enolaze na izražanje  $\beta$ -integrinskih podenot smo preverili tudi na površini membrane PC12 celic. Najprej smo PC12 celice priraščali v ploščah, predhodno prekritih s kolagenom, in jih tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno za 3 h in 24 h v brez-serumskem gojišču. Po končanih inkubacijah smo celice označili s specifičnimi protitelesi proti  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - in  $\beta_3$ -integrinskim podenotam, nato pa še s sekundarnimi protitelesi, označenimi s fluorokromom, in jih pomerili s pretočnim citometrom. Kot prikazuje Slika 14, rezultati pretočne citometrije pokažejo značilen porast izražanja  $\beta_1$ -integrinske podenote na površini membrane PC12 celic po 3 h tretiranja z  $\gamma$ -Eno in učinek je še bolj izrazit po 24 h. Tretiranje celic z  $\gamma$ -Eno ni imelo nobenega učinka na izražanje  $\beta_2$ - in  $\beta_3$ -podenot. (Slika 14).

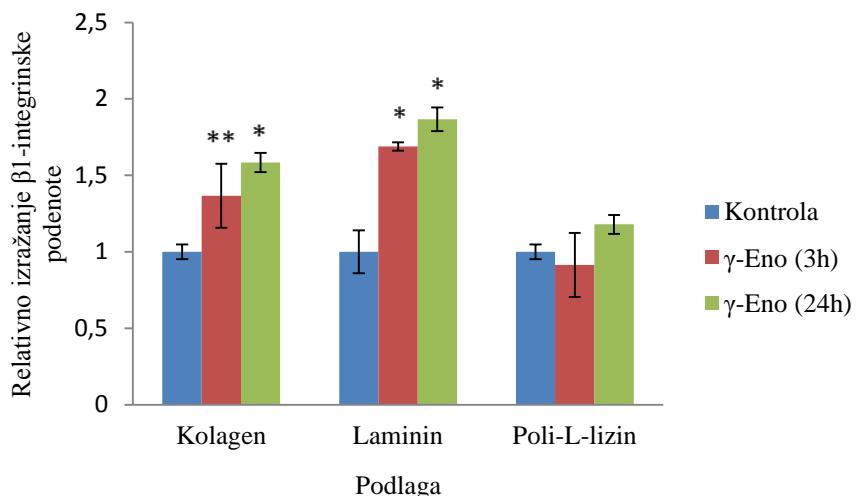


Slika 14: Izražanje  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - in  $\beta_3$ -integrinskih podenot na površini membrane PC12 celic. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom (10  $\mu$ g/mL), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) za 3 h in 24 h v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Relativno izražanje  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - in  $\beta_3$ -integrinskih podenot smo določili s pretočnim citometrom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija (n=3). \*p<0,05; \*\*p<0,1.

Dodatno smo na PC12 celicah preverili tudi vpliv molekul ZM na izražanje  $\beta_1$ -integrinske podenote, ki ga spodbudi  $\gamma$ -enolaza. PC12 celice smo priraščali v vdolbinice plošč, prekritih s kolagenom in lamininom ter poli-L-lizinom, ki je služil kot kontrolna podlaga, ter jih tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno za 3 h in 24 h. Kot navedeno zgoraj smo celice označili za izražanje  $\beta_1$ -integrinske podenote na površini PC12 celic in pomerili vzorce s pretočnim citometrom. Ugotovili smo, da različni proteini ZM, kot sta kolagen in laminin, vplivajo na izražanje  $\beta_1$ -integrinskega receptorja po tretiranju z  $\gamma$ -Eno. Kot je razvidno iz Slike 15, je

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

tako pri celicah, priraščenih na kolagenu, kot tudi pri celicah, priraščenih na lamininu. Opaziti značilen porast izražanja  $\beta_1$ -integrinske podenote po tretiranju z  $\gamma$ -Eno in učinek je bolj izrazit pri lamininu pri obeh časovnih točkah. Peptid  $\gamma$ -Eno ni povzročil značilne spremembe v izražanju  $\beta_1$ -integrina na PC12 celicah, priraščenih na poli-L-lizinu (Slika 15).



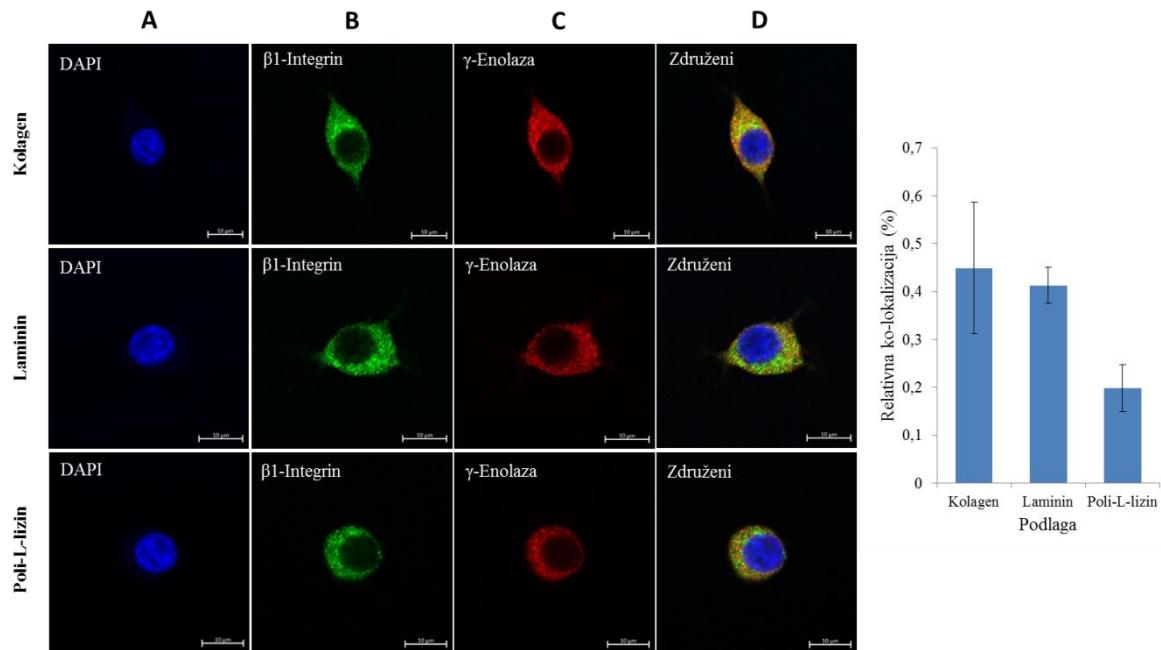
Slika 15: Izražanje  $\beta_1$ -integrinske podenote na površini membrane PC12 celic. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizino (10  $\mu$ g/mL), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) za 3 h in 24 h v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Relativno izražanje  $\beta_1$ -integrinskih podenot smo določili s pretočnim citometrom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija (n=3). \*p<0,05; \*\*p<0,1.

#### 4.2. DOLOČITEV KOLOKALIZACIJE $\beta_1$ -INTEGRINA IN $\gamma$ -ENOLAZE

Z namenom opredelitve mesta lokalizacije  $\beta_1$ -integrina in  $\gamma$ -enolaze v PC12 celicah smo ovrednotili kolokalizacijo obeh proteinov s pomočjo konfokalnega mikroskopa. Celice smo priraščali v ploščah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizino, in pripravili trajne preparate za mikroskopiranje. Pri tem smo uporabili specifična protitelesa proti  $\beta_1$ -integrinski podenoti in  $\gamma$ -enolazi. V nadaljevanju smo  $\beta_1$ -integrin označili z Alexa Fluor-488, ki po eksitaciji emitira zeleno fluorescenco,  $\gamma$ -enolazo pa z Alexa Fluor-555, ki po eksitaciji emitira rdečo fluorescenco. Opazili smo kolokalizacijo  $\beta_1$ -integrina in  $\gamma$ -enolaze v perimembranskem območju PC12 celic, kar se vidi kot rumeno-oranžno barvanje. Učinek kolokalizacije je bolj viden v PC12 celicah, ki smo jih priraščali na lamininu in kolagenu, kot v celicah, priraščenih na poli-L-lizinu (Slika 16). To potrjuje tudi ocena

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

kolokalizacije, ki jo prikazuje graf na desni, iz katerega je razvidno, da je relativna kolokalizacija  $\beta_1$ -integrina in  $\gamma$ -enolaze največja pri kolagenu in lamininu.



Slika 16: Kolokalizacija  $\beta_1$ -integrina in  $\gamma$ -enolaze v PC12 celicah. Celice smo priraščali na krovnih stekelcih, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) za 24 h v brez-serumskem gojišču.  $\beta_1$ -integrin smo označili z Alexa Fluoro-488 (stolpec B),  $\gamma$ -enolazo pa z Alexa Fluoro-555 (stolpec C). Stolpec D prikazuje kolokaliziranje  $\beta_1$ -integrina in  $\gamma$ -enolaze v perimembranskem območju celice. Stolpec A pa prikazuje celično jedro PC12 celic, ki smo ga barvali z DAPI barvilom. Slike smo posneli s konfokalnim fluorescenčnim mikroskopom. Slike so reprezentativne dveh neodvisnih poskusov ( $n=2$ ).

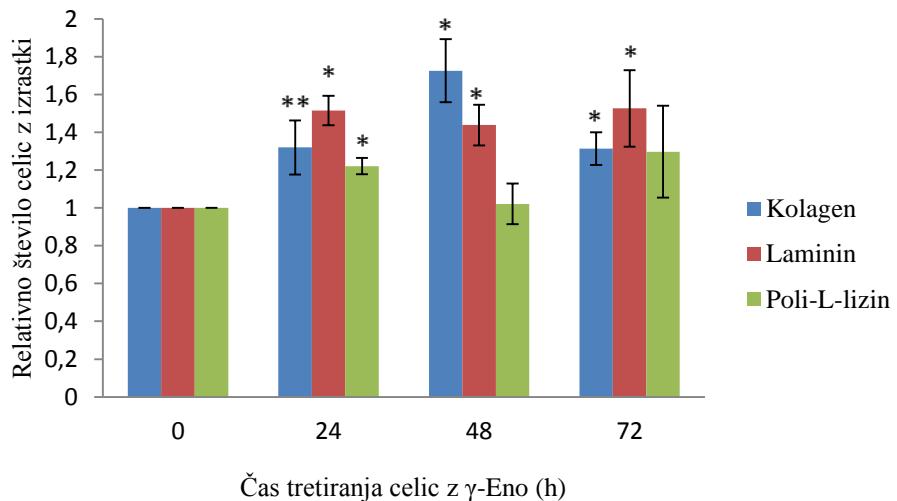
#### 4.3. VREDNOTENJE VPLIVA $\gamma$ -ENOLAZE NA RAST NEVRITOV PREKO IZRAŽANJA $\beta_1$ -INTEGRINA

V CŽS nevrotrofični dejavniki spodbujajo razvoj nevronov, ki vključuje diferenciacijo, zorenje in preživetje. Takšne lastnosti so dokazali tudi glikolitičnem encimu  $\gamma$ -enolazi [19]. Glede na dobljene rezultate o vplivu  $\gamma$ -enolaze na povečano izražanje  $\beta_1$ -integrina na membrani PC12 celic, nas je zanimal vpliv nevrotrofičnega delovanja  $\gamma$ -enolaze na celicah, priraščenih na proteinih ZM, torej kolagenu in lamininu.

Učinek  $\gamma$ -enolaze na izraščanje nevritov smo proučevali z mikroskopskim opazovanjem in štetjem izrastkov PC12 celic po stimulaciji s peptidom  $\gamma$ -Eno, ki posnema C-terminalni del  $\gamma$ -enolaze. PC12 celice smo priraščali v ploščah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom, ter tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno v brez-serumskem gojišču za 24 h, 48 h in 72 h.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Po določenih časovnih točkah smo z invertnim mikroskopom prešteli celice ter njihove izrastke in med diferencirane celice šteli tiste celice, ki so imele enega ali več izrastkov z dolžino, daljšo od premera same celice. Za vsak vzorec smo štirikrat prešteli po 100 celic in nato izračunali povprečje števila celic z izrastki.

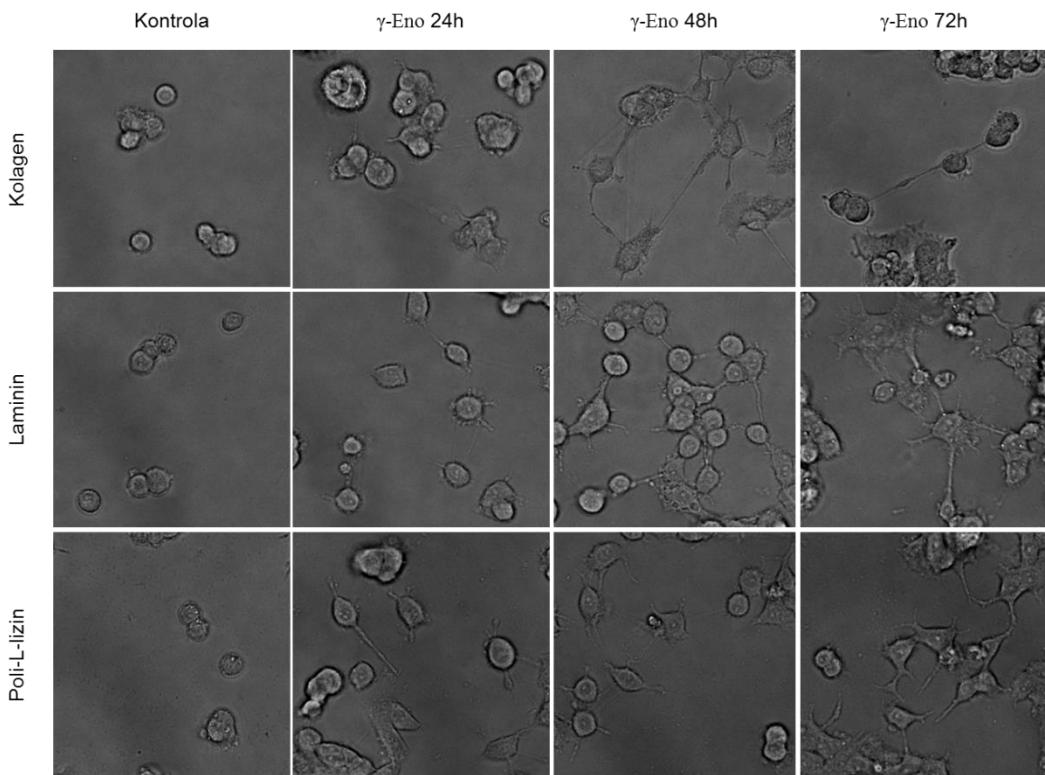


Slika 17: Relativno število PC12 celic z izrastki po tretiranju z  $\gamma$ -Eno. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom (10  $\mu$ g/mL), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) za 24 h, 48 h in 72 h v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Relativno število PC12 celic z izrastki smo določili z invertnim mikroskopom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija (n=4). \*p<0,05; \*\*p<0,1.

Slika 17 prikazuje relativno število tretiranih celic z izrastki v primerjavi s kontrolnimi celicami. Iz rezultatov je razvidno, da je peptid  $\gamma$ -Eno pri vseh podlagah spodbudil tvorbo nevritov. Največji učinek je bil opazen pri celicah, priraščenih na kolagenu in lamininu. Po 24 h in 72 h je razlika med kontrolnim in tretiranim vzorcem največja pri lamininu, po 48 h tretiranja pa pri kolagenu.

Razliko v tvorbi nevritov med celicami, tretiranimi z  $\gamma$ -enolazo, in netretiranimi celicami PC12, smo posneli tudi z invertnim mikroskopom z vgrajeno digitalno kamero, ki omogoča slikanje celic v gojišču. Slika 18 nazorno prikaže, da peptid  $\gamma$ -Eno spodbudi rast izrastkov PC12 celic oz tvorbo nevritov. Na vseh podlagah je število izrastkov in povezav med celicami pri stimuliranih vzorcih večje. Na Sliki 18 je razvidna tudi sprememba oblike tretiranih celic, kjer celice po inkubaciji z  $\gamma$ -Eno pridobijo nevronom podobno obliko.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.



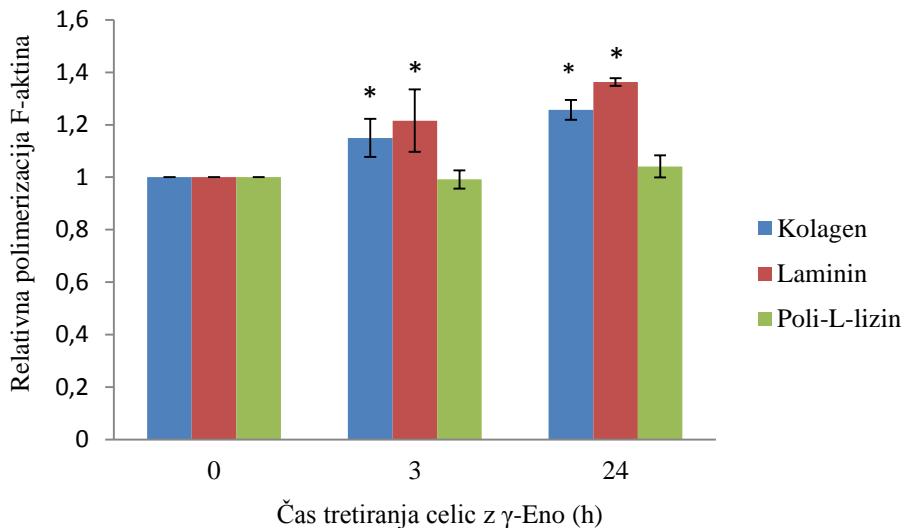
Slika 18: Vpliv stimulacije PC12 celic z  $\gamma$ -Eno na rast nevritov. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno ( $100 \text{nM}$ ) za  $24 \text{ h}$ ,  $48 \text{ h}$  in  $72 \text{ h}$  v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Slike smo posneli z invertnim mikroskopom s fotoaparatom. Slike so reprezentativne dveh neodvisnih poskusov ( $n=2$ ).

#### **4.4. VREDNOTENJE VPLIVA $\gamma$ -ENOLAZE NA POLIMERIZACIJO AKTINA PREKO IZRAŽANJA $\beta_1$ -INTEGRINA**

Rastni dejavniki in molekule ZM sprožijo strukturne spremembe aktinskega citoskeleta, ki si sledijo v določenem zaporedju: polimerizacija, depolimerizacija, stabilizacija, razvejanje in ločevanje aktinskih filamentov. S temi učinki uravnavajo znotrajcelični transport, morfologijo celice in razrast nevritov [62]. S poskusom spremeljanja polimerizacije aktina z barvilom Phalloidin-TRITC smo hoteli preveriti vpliv  $\gamma$ -enolaze in vezave PC12 celic z različnimi podlagami na reorganizacijo aktinskega citoskeleta. Najprej smo za metodo izbora uporabili pretočno citometrijo, s katero smo določili stopnjo polimerizacije aktina v PC12 celicah. Celice smo priraščali v ploščah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom, in celice nato tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno v brez-serumskem gojišču. Po  $3 \text{ h}$  in  $24 \text{ h}$  inkubaciji s peptidom smo celice označili z barvilm Phalloidin TRITC, ki se veže na F-aktin. Kot vidimo na Sliki 19, je  $\gamma$ -Eno spodbudila značilno polimerizacijo F-aktina v

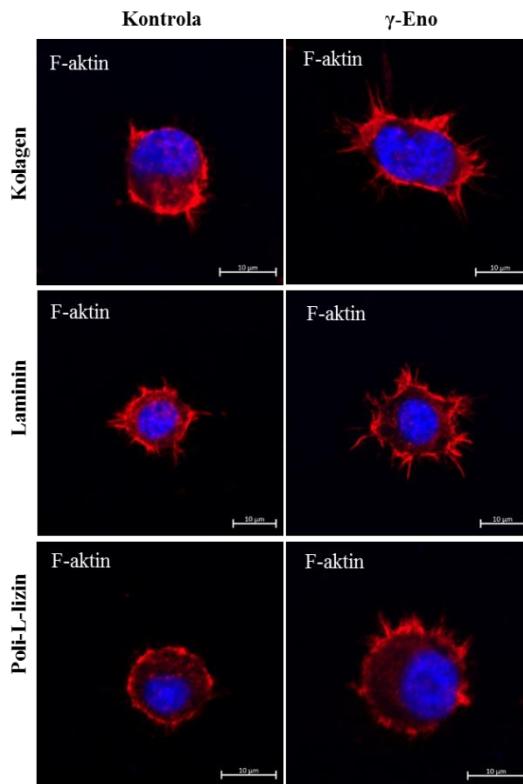
Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

celicah, priraščenih na kolagenu in lamininu, pri čemer je bil nevritogeni vpliv  $\gamma$ -Eno pri obeh časovnih točkah največji na lamininu. Celice, priraščene na poli-L-lizinu, pa po tretiranju s peptidom  $\gamma$ -Eno niso izkazale omembe vrednega odziva.



Slika 19: Relativna polimerizacija F-aktina v PC12 celicah po tretiranju z  $\gamma$ -Eno. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom (10  $\mu$ g/mL), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) za 3 h in 24 h v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Relativno polimerizacijo F-aktina smo določili s pretočnim citometrom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija (n=4). \*p<0,05.

Polimerizacijo aktina v PC12 celicah smo spremljali tudi s fluorescenčno mikroskopijo. PC12 celice smo priraščali na krovna stekelca, ki so bila predhodno prekrita s proteini ZM in poli-L-lizinom, jih tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno v brez-serumskem gojišču 24 h ter po končani inkubaciji označili z barvilm Phalloidin TRITC. Ta se veže na aktinske filamente in tako omogoča opazovanje vpliva nevritogenih učinkov. Krovna stekelca smo nato prenesli na Menzel objektna stekelca ter pripravili trajne preparate, ki smo jih opazovali s fluorescenčnim mikroskopom. Na Sliki 20 je razvidno, da tretiranje celic s peptidom  $\gamma$ -Eno spodbudi polimerizacijo aktina predvsem v celicah, ki smo jih priraščali na kolagenu in lamininu. Količina in dolžina izrastkov t.i. nevritov je pri tretiranih PC12 celicah v primerjavi s kontrolo na teh dveh podlagah vidno večja, kjer se vidi, da PC12 celice diferencirajo, medtem ko v z  $\gamma$ -Eno-tretiranih celicah, priraščenih na poli-L-lizinu, ni prišlo do večjega vpliva  $\gamma$ -Eno na rast izrastkov in diferenciacijo.



Slika 20: Vpliv stimulacije PC12 celic z  $\gamma$ -Eno na polimerizacijo F-aktina v PC12 celicah. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekrith s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom (10  $\mu$ g/mL), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) za 3 h in 24 h v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Celice smo barvali z barvilo Phalloidin TRITC, ki se veže na polimeriziran F-aktin. Slike smo posneli s konfokalnim fluorescenčnim mikroskopom. Slike so reprezentativne dveh neodvisnih poskusov (n=2).

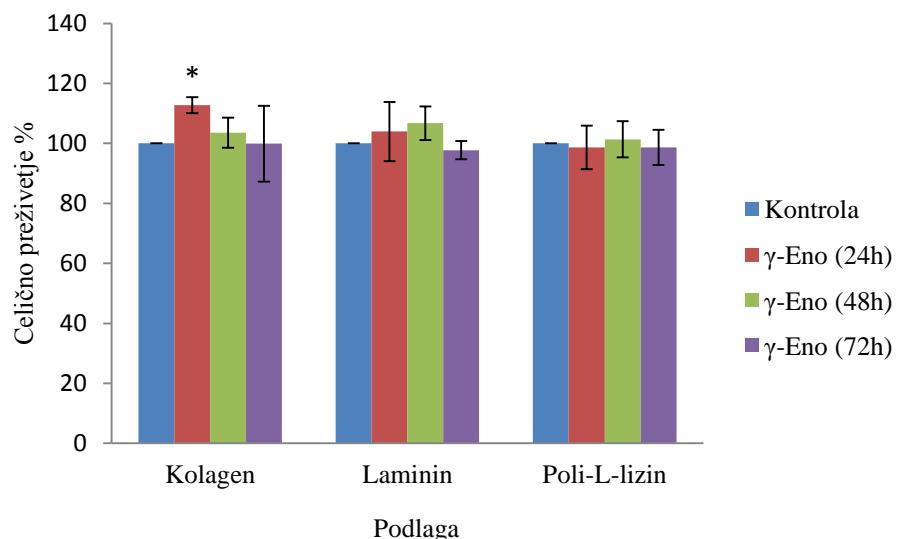
#### **4.5. VREDNOTENJE VPLIVA $\gamma$ -ENOLAZE NA CELIČNO PREŽIVETJE PREKO IZRAŽANJA $\beta_1$ -INTEGRINA**

Poleg nevritogenega učinka  $\gamma$ -enolaze smo žeeli preveriti tudi vpliv delovanja  $\gamma$ -enolaze na celično preživetje PC12 celic, priraščenih na proteine ZM. Pri tem smo se poslužili metabolnega testa, pri čemer smo uporabili reagent MTS, ki ga funkcionalne celice po prevzemu pretvorijo v produkt formazan. Z meritvijo absorbance razgradnega produkta MTS reagenta smo lahko določili delež živih celic.

PC12 celice smo priraščali na mikrotitrskie plošče, ki smo jih prekrili z različnimi podlagami (kolagen, laminin in poli-L-lizin) ter tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno v brez-serumskem gojišču za 24 h, 48 h in 72 h. Po končanih inkubacijah smo dodali MTS reagent in čez čas s čitalcem mikrotitrskih plošč celicam izmerili absorbanco, iz katere smo izračunali delež živih celic. Na Sliki 21 vidimo, da peptid  $\gamma$ -Eno ni značilno povečal

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

preživetje PC12 celic, z izjemo celic, priraščenih na kolagenu, in tretiranih z  $\gamma$ -Eno 24 h, kjer je opazen majhen porast v spodbujenem celičnem preživetju.



Slika 21: Delež celičnega preživetja PC12 celic po tretiranju z  $\gamma$ -Eno. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizino (10  $\mu$ g/mL), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) za 24 h, 48 h in 72 h v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Po zaključeni stimulaciji z  $\gamma$ -enolazo smo v gojišče dodali MTS reagent, ter čez 1 h s čitalcem mikrotitrskih plošč pomerili absorbanco. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija (n=3). \*p<0,05.

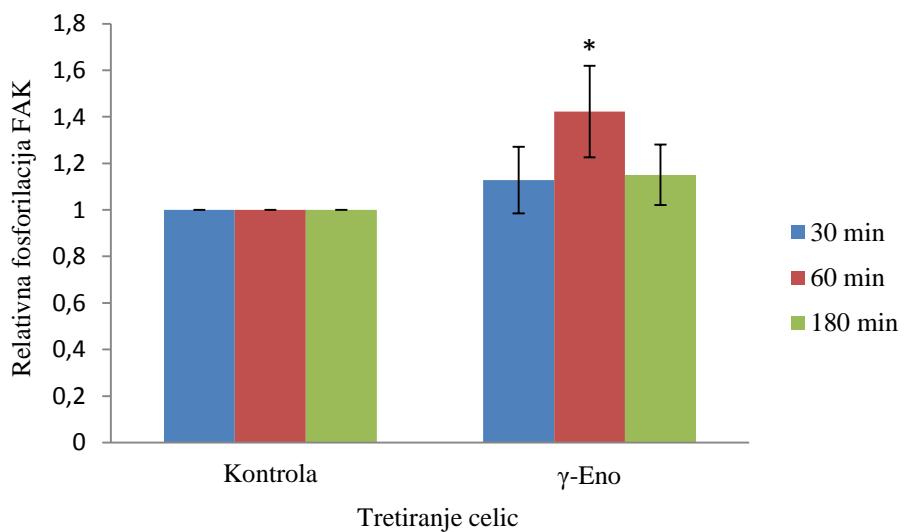
#### 4.6. VPLIV $\gamma$ -ENOLAZE NA ZNOTRAJCELIČNO SIGNALIZIRANJE, POSREDOVANO PREKO $\beta_1$ -INTEGRINA

Za nevrotrofične molekule je znano, da posredujejo preživetje, diferenciacijo in regeneracijo nevronov preko aktivacije PI3-K/Akt signalne poti in MAPK/ERK signalne poti [25]. Integrinski receptorji pa preko vezave z gradniki citoskeleta in številnimi kinazami, kot so FAK, družina Src kinaz, Ras, kot tudi kinazi PI3-K in ERK, posredujejo svoje učinke [63]. Zaradi z  $\gamma$ -enolazo-spodbujene rasti nevritov in polimerizacije aktina v PC12 celicah po izpostavitvi kolagenu in lamininu nas je zanimalo, katere signalne molekule so udeležene v nevritogeno signaliziranju, posredovano z  $\gamma$ -enolazo.

Najprej smo se osredotočili na kinazo FAK. FAK je ne-receptorska protein tirozin kinaza, ki ima glavno vlogo v integrinskih signalnih poteh. Eden od prvih dogodkov, ki jih sproži aktivacija integrinov, je ravno fosforilacija FAK kinaze [36]. Kot prvo smo hoteli določiti časovni potek fosforilacije kinaze FAK. PC12 celice smo priraščali v ploščah, prekritih s

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

kolagenom, in celice tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno v brez-serumskem gojišču za 30, 60 in 180 min. Kontrolo so predstavljale celice, tretirane samo z brez-serumskim gojiščem za posamezno časovno točko tretiranja. Po končnih točkah inkubacije smo celice najprej označili s primarnimi specifičnimi protitelesi proti fosforilirani obliki kinaze FAK, v nadaljevanju pa še s sekundarnimi protitelesi, označenimi s fluorokromom ter s pretočnim citometrom pomerili pripravljenе vzorce. Iz Slike 22 je razvidno, da pri vseh točkah tretiranja pride do povečanja fosforilacije FAK kinaze, vendar je bilo značilen učinek opaziti le po 60-minutnem tretiranju z  $\gamma$ -Eno.

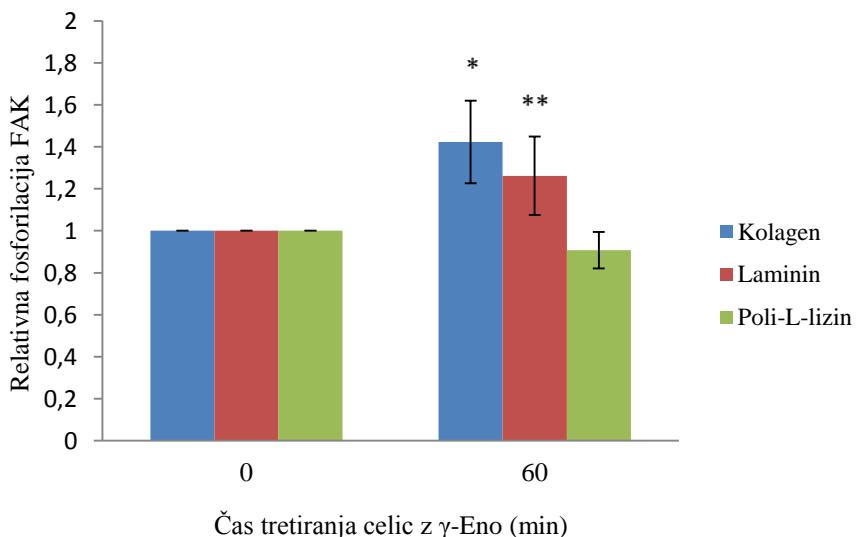


Slika 22: Relativna fosforilacija FAK v PC12 celicah po tretiranju z  $\gamma$ -Eno. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno ( $100 \text{nM}$ ) za 30, 60 in 180 min v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Relativno fosforilacijo FAK smo določili s pretočnim citometrom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija ( $n=6$ ). \* $p<0,05$ .

Poleg tega smo želeli primerjati vpliv različnih molekul ZM na povečanje fosforilacije FAK, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. V ta namen smo PC12 priraščali v ploščah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom, ter celice tretirali 60 min s peptidom  $\gamma$ -Eno v brez-serumskem gojišču. Kontrolni vzorci so bili tisti, pri katerih celic nismo stimulirali z  $\gamma$ -enolazo, temveč smo uporabili le brez-serumsko gojišče. Po končani inkubaciji smo celice zopet označili za določanje stopnje fosforilacije kinaze FAK in pripravljenе vzorce pomerili s pretočnim citometrom. Največjo stopnjo fosforilacije FAK kinaze je bilo opaziti po tretiranju PC12 celic, priraščenih na kolagenu (Slika 23). Tudi tretiranje PC12 celic z  $\gamma$ -

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Eno, predhodno priraščenih na lamininu, je izkazovalo povečano fosforilacijo FAK kinaze, vendar je bil učinek manj izrazit kot pri kolagenu. V PC12 celicah, priraščenih na poli-L-lizinu, ni bilo zaznati porasta v fosforilaciji, temveč je stimulacija z  $\gamma$ -Eno povzročila delno zmanjšanje fosforilacije FAK (Slika 23).



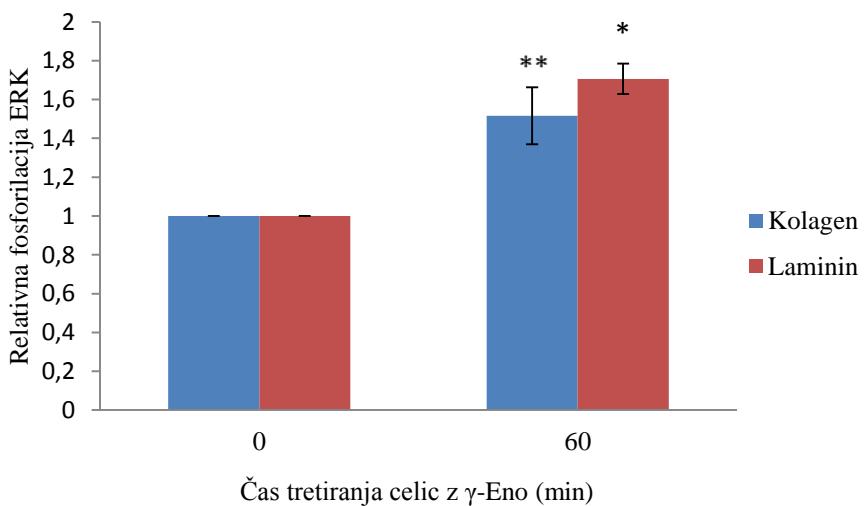
Slika 23: Relativna fosforilacija FAK v PC12 celicah po tretiranju z  $\gamma$ -Eno. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom, lamininom in poli-L-lizinom ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno ( $100 \text{nM}$ ) za  $60 \text{ min}$  v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumske gojišče. Relativno fosforilacijo FAK smo določili s pretočnim citometrom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija ( $n=6$ ). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,1$ .

MAPK/ERK pot je druga signalna pot, preko katere nevrotrofični dejavniki posredujejo svoje učinke na diferenciacijo in rast celic [34]. Nevrotrofična stimulacija aktivira člane družine Raf serin/treonin kinaz, ki nato fosforilirajo dvojno-specifično kinazo MEK (MAPK/ERK kinazo), ki nadalje fosforilira in s tem aktivira ERK1 in ERK2 kinazi, ki sta najbolj značilna predstavnika družine MAPK [64]. Zanimalo nas je, ali  $\gamma$ -enolaza preko aktivacije ERK1/2 kinaz spodbuja rast nevritov in diferenciacijo PC12 celic v nevronom podobne celice.

PC12 celice smo priraščali v ploščah, prekritih s kolagenom in lamininom, ter celice nato tretirali  $60 \text{ min}$  v brez-serumskem gojišču z ali brez dodatka  $\gamma$ -enolaze. Celice, tretirane v brez-serumskem gojišču brez dodane  $\gamma$ -enolaze, smo vzeli za kontrolo. Celice smo po zaključku tretiranja označili s primarnimi specifičnimi protitelesi proti fosforilirani obliki kinaz ERK1/2 in nato še s sekundarnimi protitelesi, označenim s fluorokromom. Z uporabo

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

pretočne citometrije smo določili relativno fosforilacijo ERK1/2 kinaz. Tako v celicah, priraščenih na lamininu kot na kolagenu, je prišlo do značilnega porasta fosforilacije kinaze ERK1/2. Iz Slike 24 je razvidno, da je učinek bolj opazen na lamininu kot na kolagenu.

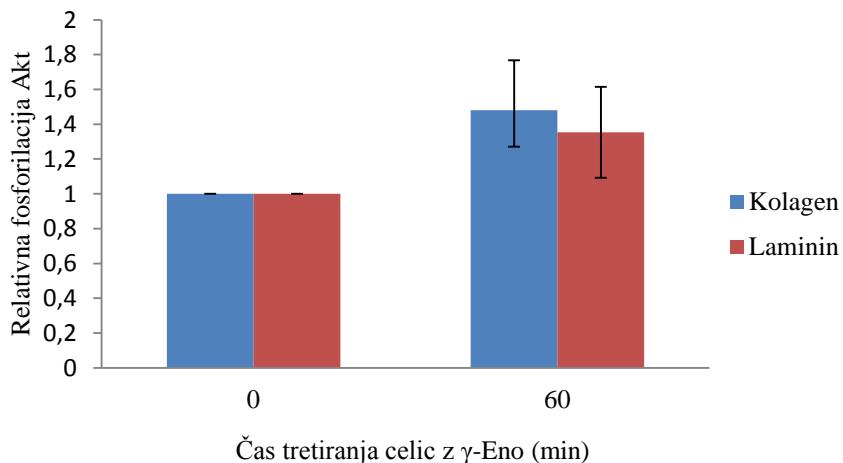


Slika 24: Relativna fosforilacija ERK v PC12 celicah. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom in lamininom ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno ( $100 \text{nM}$ ) za  $60 \text{ min}$  v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Relativno fosforilacijo ERK smo določili s pretočnim citometrom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija ( $n=2$ ). \* $p<0,05$ .

Poleg signalnih kinaz, ki so primarno udeležene v rast nevritov in diferenciacijo, nas je zanimala tudi signalna kinaza, udeležena primarno v preživetje celic. Proučevali smo vpliv  $\gamma$ -enolaze na aktivacijo kinaze Akt, ki je del PI3-K/Akt signalne poti, ki jo aktivirajo različni nevrotrofični dražljaji. Ta uravnava temeljne celične funkcije, kot so transkripcija, translacija, proliferacija, rast in preživetje [31]. V ta namen smo PC12 celice priraščali v ploščah, prekritih s kolagenom in lamininom, ter jih nato tretirali  $60 \text{ min}$  v brez-serumskem gojišču ob prisotnosti ali odsotnosti  $\gamma$ -enolaze. Vzorce brez dodane  $\gamma$ -enolaze smo vzeli za kontrolne. Po zaključenem tretiranju smo celice označili s primarnimi specifičnimi protitelesi proti fosforilirani obliki kinaze Akt, v nadaljevanju pa še s sekundarnimi protitelesi, označenimi s fluorokromom, ter pripravljene vzorce pomerili s pretočnim citometrom. Porast fosforilacije Akt kinaze smo zaznali v vseh vzorcih, ki smo

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

jih stimulirali s peptidom  $\gamma$ -Eno (Slika 25), statistično neznačilen učinek pa je bil bolj opazen pri celicah, priraščenih na kolagenu.



Slika 25: Relativna fosforilacija Akt v PC12 celicah po tretiranju z  $\gamma$ -Eno. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom in lamininom ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), in tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno ( $100 \text{nM}$ ) za 60 min v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Relativno fosforilacijo Akt smo določili s pretočnim citometrom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija ( $n=2$ ).

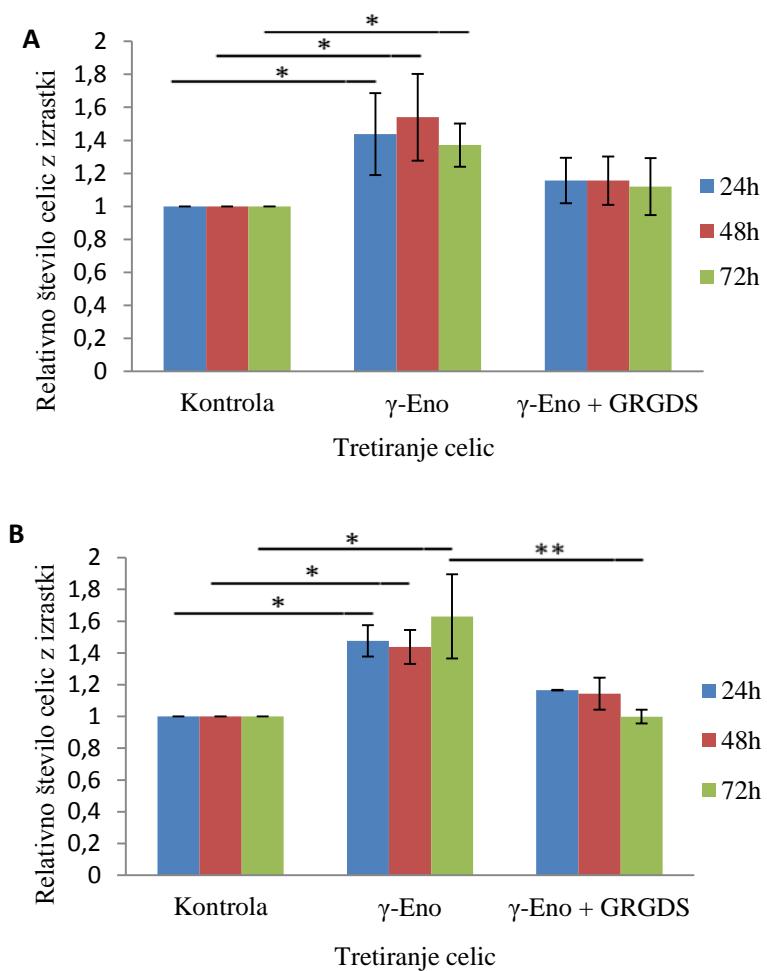
#### 4.7. VREDNOTENJE VPLIVA ANTAGONISTA INTEGRINOV NA NEVROTROFIČNO DELOVANJE $\gamma$ -ENOLAZE

Vezava celic s proteini ZM preko površinskih celičnih receptorjev, kot so integrini, sproži aktivacijo znotrajceličnih signalnih poti, ki vodijo v spremenjeno izražanje genov, diferenciacijo, migracijo in razrast nevritov [65]. V zadnjem delu magistrske naloge smo želeli potrditi delovanje  $\gamma$ -enolaze preko aktivacije integrinskega receptorja in s tem sprožitev znotrajceličnih signalnih poti, udeleženih v proces nevritogeneze. Slednje smo pokazali z uporabo antagonista integrinskih receptorjev, peptida GRGDS, ki prepreči vezavo integrinov z zunajceličnim matriksom in s tem inhibira aktivacijo znotrajceličnih signalnih poti, ki vodijo v razrast nevritov.

Najprej smo ovrednotili vpliv antagonista integrinskih receptorjev na spodbujeno nevritogenezo, posredovano z  $\gamma$ -enolazo. V ta namen smo PC12 celice priraščali v ploščah, prekritih s kolagenom in lamininom. Naslednji dan smo najprej pritrjene celice pre-tretirali za 30 min s peptidom GRGDS v brez-serumskem gojišču, nato pa dodali še peptid  $\gamma$ -Eno. Kontrolo so predstavljale celice, katerim smo dodali le brez-serumsko gojišče. Po 24 h, 48

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

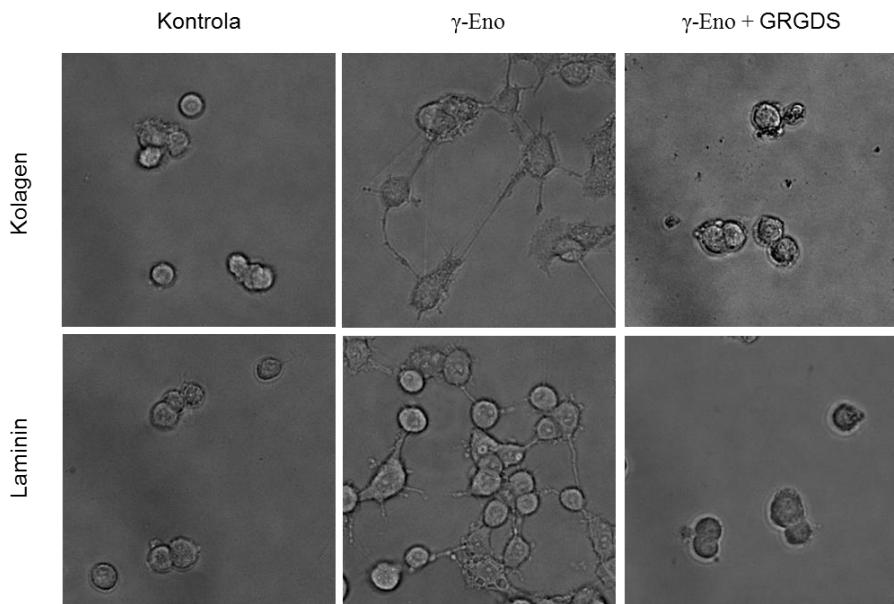
H in 72 h smo z invertnim mikroskopom prešteli celice ter njihove izrastke in med diferencirane celice šteli tiste celice, ki so imele enega ali več izrastkov z dolžino daljšo od premera same celice. Za vsak vzorec smo štirikrat prešteli po 100 celic in nato izračunali povprečje števila celic z izrastki. Iz rezultatov, predstavljenih na Sliki 26, je razvidno, da je prisotnost peptida GRGDS zmanjšala nevritogeno delovanje  $\gamma$ -Eno tako pri PC12 celicah, priraščenih na kolagenu (Slika 26A), kot celicah, priraščenih na lamininu (Slika 26B), in učinek je bil opazen pri vseh časovnih točkah opazovanja. Vendar je do značilnega učinka prišlo le po 72 h stimulaciji celic, priraščenih na lamininu.



Slika 26: Vpliv pre-tretiranja PC12 celic z GRGDS peptidom na relativno število PC12 celic z izrastki po tretiranju z  $\gamma$ -Eno. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom (A) in lamininom (B) ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), in 30 min pre-tretirali z GRGDS peptidom ( $10 \mu\text{M}$ ). Nato je sledilo tretiranje s peptidom  $\gamma$ -Eno ( $100 \text{nM}$ ) za 24 h, 48 h in 72 h v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Relativno število PC12 celic z izrastki smo določili z invertnim mikroskopom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija ( $n=2$ ). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,1$ .

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

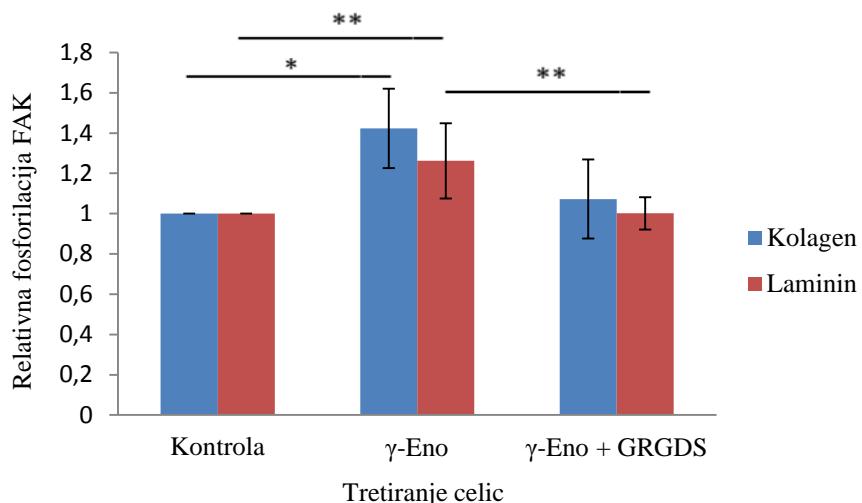
Inhibitorni vpliv peptida GRGDS na z  $\gamma$ -enolazo-posredovano rast nevritov je lepo razviden tudi s Slike 27, posnete z invertnim mikroskopom, kjer je opazna značilna zavrtja rast nevritov v prisotnosti peptida GRGDS, tako pri PC12 celicah, priraščenih na kolagenu, kot celicah, priraščenih na lamininu.



Slika 27: Vpliv pre-tretiranja PC12 celic z GRGDS peptidom na rast nevritov po tretiranju z  $\gamma$ -Eno. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom in lamininom ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), in 30 min pre-tretirali z GRGDS peptidom ( $10 \mu\text{M}$ ). Nato je sledilo tretiranje s peptidom  $\gamma$ -Eno ( $100 \text{nM}$ ) v brez-serumskem gojišču za nadalnjih 24 h. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Celice smo posneli z invertnim mikroskopom s fotoaparatom. Slike so reprezentativne dveh neodvisnih poskusov ( $n=2$ ).

Poleg vpliva na nevritogenezo smo preverili tudi vpliv peptida GRGDS na stopnjo aktivacije kinaze FAK, posredovane z  $\gamma$ -enolazo, pri čemer smo se poslužili pretočne citometrije. PC12 celice smo priraščali v ploščah, prekritih s kolagenom in lamininom, ter jih naslednji dan najprej pre-tretirali za 30 min s peptidom GRGDS, nato pa smo celicam dodali  $\gamma$ -Eno in čez 60 min določili stopnjo fosforilacije kinaze FAK. Za kontrolne vzorce smo vzeli celice, ki jim nismo dodali nobenega od peptidov, le brez-serumsko gojišče. Iz rezultatov na Sliki 28 je razvidno, da prisotnost antagonistika integrinske funkcije zmanjša oz inhibira povišano stopnjo fosforilacije FAK kinaze, posredovane s peptidom  $\gamma$ -Eno. Inhibitorni učinek je bil opazen tako pri tretiranih PC12 celicah, priraščenih na kolagenu kot lamininu.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.



Slika 28: Vpliv pre-tretiranja PC12 celic z GRGDS peptidom na relativno fosforilacijo FAK po tretiranju z  $\gamma$ -Eno. Celice smo priraščali v vdolbinicah, prekritih s kolagenom in lamininom (10  $\mu$ g/mL), in 30 min pre-tretirali z GRGDS peptidom (10  $\mu$ M). Nato je sledilo tretiranje s peptidom  $\gamma$ -Eno (100 nM) za 60 min v brez-serumskem gojišču. Kontrolo predstavlja brez-serumsko gojišče. Relativno fosforilacijo FAK smo določili s pretočnim citometrom. Rezultat je predstavljen kot povprečje  $\pm$  standardna deviacija (n=2). \*\*p<0,1.

## 5. RAZPRAVA

Prenos informacij v živčnem sistemu poteka preko živčnih celic, ki jih imenujemo tudi nevroni. Tipičen nevron je sestavljen iz telesa celice (soma), dendritov in nevrita. Vsak del ima posebno vlogo pri tvorjenju signalov in komunikaciji z drugimi nevronskimi celicami. Soma je metabolično središče celice. Dendriti so drevesasto razvezani izrastki, ki sprejemajo informacije od sosednjih nevronov in jih prenašajo proti telesu nevronske celice. Nevrit pa je običajno najdaljši, cevasti izrastek, ki prenaša signale proti drugim nevronom [1]. Za nemoteno funkcijo živčnega sistema je nujna prisotnost nevrotrofičnih dejavnikov, ki spodbujajo razvoj in regeneracijo nevronskih celic. Pomembni predstavnik nevrotrofičnih dejavnikov je družina nevrotrofinov [11]. Nevrotrofini z vezavo na receptorje spodbujajo preživetje, proliferacijo, diferenciacijo, regeneracijo in vzdrževanje živčnih celic [32]. Njihove regenerativne učinke so hoteli izrabiti v terapevtske namene, vendar sama struktura živčnega sistema in lastnosti nevrotrofinov to onemogočajo. Te lastnosti so kratkotrajna stabilnost v krvi, neustrezna farmakokinetika in neželeni sistemski učinki. V ta namen so se znanstveniki usmerili v razvoj manjših molekul, ki posnemajo delovanje nevrotrofičnih dejavnikov. Ena izmed takšnih molekul je peptid, ki posnema C-terminalni del  $\gamma$ -enolaze.  $\gamma$ -Enolaza je sicer glikolitičen encim, ki se nahaja predvsem v nevronih in celicah nevroendokrinega sistema, vendar C-terminalni del, ki ni povezan z glikolitično aktivnostjo, izkazuje nevrotrofično aktivnost [21].

Za učinkovito regeneracijo nevronov je poleg nevrotrofične podpore potrebna tudi vezava nevronskih celic z molekulami ZM. Ta povezava poteka preko površinskih celičnih adhezijskih receptorjev, imenovanih integrini [36]. Integrini so velika družina tipa transmembranskih, heterodimernih, glikoproteinskih receptorjev, ki povezujejo zunajcelično in znotrajcelično okolje. Pomembno vplivajo na delovanje aktinskega citoskeleta in imajo ključno vlogo pri celični vezavi, migraciji, proliferaciji, diferenciaciji in apoptozi [43].

Vedno več je dokazov, da se signalne poti, ki jih nevrotrofični dejavniki sprožijo preko tirozin kinaznih receptorjev, dopolnjujejo s signalnimi potmi integrinskih receptorjev. Takšno prepletanje je bistveno za uravnavanje bioloških procesov, kot sta diferenciacija in rast nevritov. V okviru magistrske naloge nas je zanimala vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v nevritogenezi, posredovani z  $\gamma$ -enolazo. Želeli smo pokazati, da je

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

nevrotrofično delovanje  $\gamma$ -enolaze delno uravnavano preko  $\beta_1$ -integrinskega receptorja in da adhezija celic na proteine ZM dodatno spodbudi nevritogeno delovanje  $\gamma$ -enolaze.

Z eksperimentalnim delom magistrske naloge smo začeli z delom na celični liniji SH-SY5Y, ker je široko uporabljena v raziskavah diferenciacije nevronov, metabolizma ter raziskavah o nevrodegenerativnih, nevrotoksičnih in nevroprotективnih procesih [48]. S prvim poskusom smo hoteli določiti vpliv  $\gamma$ -enolaze na izražanje  $\beta$ -integrinskih receptorjev. Poskus smo trikrat ponovili, vendar pri nobeni ponovitvi nismo zaznali značilnega povečanja pri kateri koli izmed treh integrinskih podenot,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  in  $\beta_3$ . Rezultati so nakazovali, da stimulacija SH-SY5Y celic s peptidom  $\gamma$ -Eno ne poveča izražanje  $\beta$ -integrinskih receptorjev. Rezultati sovpadajo z raziskavo, kjer so pokazali, da N-tip nevroblastomskih celic SH-SY5Y slabše izraža  $\beta$ -integrinske podenote kot S-tip SH-SY5Y celic. Poleg tega naj bi bila tudi razgradnja  $\beta$ -integrinske podenote v N-tipu hitrejša. Vse to ima za posledico slabše izražanje  $\beta$ -integrinskih receptorjev [66].

Ker je bilo ravno izražanje  $\beta$ -integrinskih podenot ključen predmet našega raziskovalnega dela, smo se odločili, da bomo nadaljnje poskuse izvajali na PC12 celični liniji, ki je prav tako široko uporabljena v študijah nevronske diferenciacije in je bilo v predhodnih raziskavah pokazano, da tovrstne celice na svoji površini membrane izražajo  $\beta$ -integrinske receptorje [67].

Tako smo v nadaljevanju magistrske naloge pokazali, da stimulacija PC12 celic s peptidom  $\gamma$ -Eno poveča izražanje  $\beta_1$ -integrinske podenote, ne pa podenot  $\beta_2$  in  $\beta_3$ . PC12 celice smo gojili na kolagenu in jih po končani nevrotrofični stimulaciji s peptidom  $\gamma$ -Eno označili s protitelesi proti  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - in  $\beta_3$ -integrinski podenoti. Označenim celicam smo nato s pretočnim citometrom izmerili relativno intenziteto fluorescence, ki je povezana z deležem izraženih integrinskih podenot. Povišano izražanje smo zaznali le pri  $\beta_1$ -integrinski podenoti in s tem pokazali morebitno vpletjenost  $\beta_1$ -integrinov v signalno pot, ki jo sproži  $\gamma$ -enolaza. Dodatno nas je zanimal vpliv različnih podlag na povečano izražanje  $\beta_1$ -integrinskih podenot. V ta namen smo PC12 celice gojili na sintetičnem polimeru poli-L-lizinu in proteinih ZM, kolagenu in lamininu. Do povišanega izražanja  $\beta_1$ -integrinske podenote je prišlo le pri PC12 celicah, ki smo jih priraščali na proteinih ZM, torej kolagenu in lamininu. Tako smo dokazali, da  $\gamma$ -enolaza uravnava izražanje  $\beta_1$ -podenote integrinskega receptorja na PC12 celicah, pritrjenih na ustreznom matriksu.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

Hkrati nas je zanimala morebitna interakcija  $\gamma$ -enolaze in  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v PC12 celicah, zato smo pripravili trajne preparate za konfokalno mikroskopijo. PC12 celice smo priraščali na različnih podlagah (kolagenu, lamininu in poli-L-lizinu) ter s specifičnimi protitelesi označili  $\gamma$ -enolazo in  $\beta_1$ -integrin. Na podlagi pridobljenih slik s konfokalnim mikroskopom smo ugotovili, da  $\gamma$ -enolaza in  $\beta_1$ -integrin kolokalizirata v perimembranskem delu celice. Bolj znatna kolokalizacija je bila opazna v PC12 celicah, ki smo jih priraščali na kolagenu in lamininu, kar nakazuje na njuno interakcijo v celicah in vpletenost  $\beta_1$ -integrinskega receptorja pri nevrotrofičnem delovanju  $\gamma$ -enolaze.

V nadaljevanju smo tako želeli pokazati vpliv  $\gamma$ -enolaze na diferenciacijo PC12 celic, izpostavljenim proteinom ZM. V ta namen smo celice gojili na različnih podlagah ZM ter poli-L-lizinu in po različnih časovnih točkah tretiranja priraščenih PC12 celic s peptidom  $\gamma$ -Eno prešteli število izrastkov pod invertnim mikroskopom. Pri štetju smo upoštevali tiste celice, ki so imele izrastke, daljše od premera celice. S tem poskusom smo dokazali, da  $\gamma$ -enolaza spodbudi diferenciacijo PC12 celic v nevronske celice, saj se je število celic z izrastki povečalo na vseh treh podlagah. Največji odziv pa smo zaznali na PC12 celicah, ki smo jih gojili na lamininu in kolagenu. To pomeni, da vezava PC12 celic s proteini ZM dodatno spodbudi rast izrastkov, ki jo sproži  $\gamma$ -enolaza, kar dodatno nakazuje na vpletenost  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v nevritogeno delovanje  $\gamma$ -enolaze.

Nevrotrofični dejavniki preko tirozin-kinazega receptorja in z integrini uravnavajo rast novih izrastkov preko vpliva na aktinski citoskelet. Z metodo pretočne citometrije in uporabo barvila Phalloidin-TRITC smo dokazali, da tudi peptid  $\gamma$ -Eno uravnava količino F-aktina v celicah PC12 in na ta način vpliva na reorganizacijo aktinskega citoskeleta. S pretočnim citometrom smo izmerili relativno intenziteto fluorescence, ki je proporcionalna relativni vsebnosti F-aktina. Rezultati so pokazali, da stimulacija priraščenih celic z  $\gamma$ -Eno zviša količino F-aktina oz poveča polimerizacijo aktina. Največji učinek je bil opazen v PC12 celicah, ki smo jih gojili na lamininu in kolagenu. V celicah, gojenih na sintetičnem proteinu poli-L-lizinu peptid,  $\gamma$ -Eno ni povzročil spremembe v polimerizaciji aktina. S tem poskusom smo pokazali, da vezava PC12 celic z molekulami ZM dodatno spodbudi polimerizacijo F-aktina in s tem rast izrastkov, ki je posledica nevrotrofične stimulacije z  $\gamma$ -enolazo. Slednje smo potrdili tudi z mikroskopskim opazovanjem aktinskih filamentov, pri čemer smo prav tako uporabili barvilo Phalloidin-TRITC. Tretiranje celic s peptidom  $\gamma$ -Eno je povzročilo značilno polimerizacijo aktinskih vlaken v nastajajočih izrastkih, kar je

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

vodilo v samo diferenciacijo PC12 celic. Učinek je bil opazen le pri celicah, priraščenih na kolagenu in lamininu, medtem ko peptid  $\gamma$ -Eno ni izkazoval enakega nevritogenega učinka na PC12 celicah, priraščenih na poli-L-lizinu.

Poleg nevritogenega učinka smo žeeli preveriti tudi vpliv aktivacije  $\beta_1$ -integrinskega receptorja na celično preživetje PC12 celic, posredovano z  $\gamma$ -enolazo. Na mikrotitrsko plošče, ki so bile predhodno obdelane z različnimi podlagami (poli-L-lizin, laminin in kolagen) smo nasadili PC12 celice. Po končani nevrotrofični stimulaciji s peptidom  $\gamma$ -Eno smo celice inkubirali v prisotnosti MTS reagenta, ki ga žive celice po prevzetju pretvorijo v vijolično obarvan produkt formazan. Na podlagi izmerjenih absorbanc smo določili delež živih celic v posameznih vzorcih in ga primerjali s kontrolnimi vzorci. Rezultati so pokazali, da peptid  $\gamma$ -Eno spodbudi preživetje celic, priraščenih predvsem na lamininu in kolagenu, saj je bila absorbanca vzorcev, tretiranih z nevrotrofičnim peptidom, v teh vzorcih višja v primerjavi s kontrolnimi. V celicah, gojenih na poli-L-lizinu, nismo zaznali bistvenega povišanja celičnega preživetja v prisotnosti peptida  $\gamma$ -Eno. To pomeni, da vezava celic PC12 s proteini ZM in nadaljnje tretiranje z  $\gamma$ -Eno ne spodbudi samo rasti izrastkov, temveč tudi spodbuja celično preživetje celic.

V drugem delu magistrske naloge smo se osredotočili na signalne poti, spodbujene z  $\gamma$ -enolazo preko  $\beta_1$ -integrinskega receptorja. Osredotočili smo se na tri glavne signalne kinaze, ki so udeležene v nevritogenem signaliziranju. Te so kinaza FAK, kinaza Akt in kinazi ERK1/2. FAK kinaza je ne-receptorska protein-tirozin kinaza in je pomemben člen signalnih poti, posredovanih preko aktivacije integrinskih receptorjev [68]. Akt in ERK1/2 pa sta kinazi, preko katerih tudi nevrotrofični dejavniki posredujejo svoje učinke [42].

Sprva smo se osredotočili na FAK kinazo in z metodo pretočne citometrije ter uporabo specifičnih protiteles dokazali vpletenost FAK kinaze v signalno pot  $\gamma$ -enolaze. Najprej smo določili časovni potek fosforilacije FAK kinaze v tretiranih PC12 celicah, predhodno priraščenih na kolagenu. S slednjim poskusom smo pokazali vpliv  $\gamma$ -Eno na stopnjo fosforilacije FAK kinaze v časovni odvisnosti in pokazali, da je bil največji učinek dosežen po 60-minutnem tretiranju celic z  $\gamma$ -Eno. Zato smo v nadaljevanju pri tej izbrani časovni točki preverili še vpliv laminina in poli-L-lizina. Rezultati so pokazali povečano fosforilacijo kinaze FAK, ki je posledica delovanja peptida  $\gamma$ -Eno le pri celicah, izpostavljenih lamininu, medtem ko ni bilo značilnih sprememb v stopnji fosforilacije pri

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

celicah, priraščenih na poli-L-lizinu. Rezultati skupaj nakazujejo, da je kinaza FAK udeležena v nevrotrofično signaliziranje  $\gamma$ -enolaze.

Poleg FAK kinaze je v rast nevritov in diferenciacijo celic udeležena tudi MAPK/ERK signalna pot [25], zato smo želeli preveriti tudi vpletenost te poti v nevrotrofičnem delovanju  $\gamma$ -enolaze v povezavi z  $\beta_1$ -integrinskim receptorjem. Ker smo pri FAK kinazi največji porast fosforilacije zaznali po 60-minutnem tretiranju, smo ponovno izbrali enak čas inkubacije s peptidom  $\gamma$ -Eno. V ta namen smo PC12 celice, ki smo jih predhodno nasadili na proteine ZM (laminin in kolagen), podvrgli 60 min dolgi stimulaciji z  $\gamma$ -Eno. Tretirane celice smo označili s specifičnimi protitelesi proti ERK1/2 in pomerili vzorce s pretočnim citometrom. Rezultati pretočne citometrije so pokazali, da pride na obeh podlagah do povečanja fosforilacije ERK1/2 po 60-minutni izpostavitvi peptidu  $\gamma$ -Eno, največji učinek pa smo zaznali na lamininu. S tem smo potrdili vpletenost ERK1/2 kinaz v signalno pot, ki vodi v razrast nevritov in diferenciacijo PC12 celic, posredovano z  $\gamma$ -enolazo.

$\gamma$ -Enolaza je udeležena tudi v uravnavanje celičnega preživetja preko aktivacije PI-3K/Akt signalne poti, zato smo na tej stopnji želeli preveriti, ali delovanje  $\gamma$ -enolaze preko izražanja  $\beta_1$ -integrinske podenote vpliva tudi na aktivacijo kinaze Akt. PC12 celice smo priraščali na kolagenu in lamininu, jih prav tako 60 min tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno ter označili s specifičnimi protitelesi proti fosforilirani obliki kinaze Akt. Rezultati pretočne citometrije so pokazali povečano fosforilacijo kinaze Akt po stimulaciji celic s peptidom  $\gamma$ -Eno, kar dokazuje, da je PI3-K/Akt signalna pot prav tako udeležena v nevrotrofično signaliziranje  $\gamma$ -enolaze preko aktivacije  $\beta_1$ -integrinskega receptorja.

V zadnjem delu magistrske naloge pa smo želeli potrditi vpletenost  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v nevrotrofično delovanje  $\gamma$ -enolaze. Pri tem smo se poslužili uporabe peptida GRGDS, ki je antagonist integrinskih receptorjev oz peptida, ki inhibira aktivacijo integrinov in posledično znotrajcelično signalno kaskado. V ta namen smo PC12 celice priraščali na proteinih ZM in poli-L-lizinu ter naslednji dan celice tretirali s peptidom  $\gamma$ -Eno v odsotnosti ali prisotnosti peptida GRGDS. Slednji je zmanjšal spodbujeno rast nevritov, posredovano z  $\gamma$ -Eno, prav tako pa je delno inhibiral z  $\gamma$ -Eno-povečano fosforilacijo FAK kinaze, kar potrjuje vpletenost  $\beta_1$ -integrina v nevrotrofično signaliziranje in delovanje  $\gamma$ -enolaze. Antagonist integrinskih receptorjev je le delno

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

zmanjšal delovanje peptida  $\gamma$ -Eno, kar nakazuje na vpletenost drugih receptorjev, poleg integrinov, v izkazovanje nevrotrofične aktivnosti  $\gamma$ -enolaze.

## 6. SKLEPI

1. Stimulacija celic s peptidom  $\gamma$ -Eno poviša izražanje  $\beta_1$ -podenote integrinskega receptorja na površini PC12 celic, priraščenih le na proteinih ZM, kolagenu ali lamininu.
2. S konfokalnim mikroskopom smo pokazali, da  $\beta_1$ -integrin in  $\gamma$ -enolaza kolokalizirata v perimembranskem območju celice, kolokalizacija pa je močnejša v celicah, priraščenih na kolagenu ali lamininu.
3. Peptid  $\gamma$ -Eno spodbudi polimerizacijo aktina ter s tem tvorbo in rast nevritov PC12 celic, a le po izpostavitvi celic kolagenu ali lamininu, hkrati pa spodbuja tudi preživetje PC12 celic.
4. Peptid  $\gamma$ -Eno izkazuje nevrotrofično delovanje preko aktivacije signalnih kinaz FAK, ERK1/2 in Akt v PC12 celicah, priraščenih na koleganu ali lamininu.
5. Izkazovanje nevrotrofične aktivnosti peptida  $\gamma$ -Eno je oslabljeno v prisotnosti antagonista integrinskega receptorja, GRGDS peptida, kar potrjuje nevrotrofično delovanje  $\gamma$ -enolaze preko nadizražanja in aktivacije  $\beta_1$ -podenote integrinskega receptorja.

## 7. LITERATURA

- [1] Kandel ER: Principles of Neural Science 5th Edition, The McGraw-Hill Companies Inc, New York, 2013: 71-89.
- [2] <https://huntingtonsdiseasenews.com/2015/09/21/new-method-allows-study-identification-proteins-brain-cell-cell-interactions/> (obiskano dne 20.2.17)
- [3] Horner PJ, Gage FH: Regenerating the damaged central nervous system. Nature. 2000; 407: 963-70.
- [4] Bandtlow CE: Regeneration in the central nervous system. Exp Gerontol 2013; 38: 79-86.
- [5] Tucker BA, Rahimtula M, Mearow KM: Integrin activation and neurotrophin signaling cooperate to enhance neurite outgrowth in sensory neurons. Journal of Comparative Neurology 2005; 486: 267-80.
- [6] Tucker BA, Rahimtula M, Mearow KM: Src and FAK are key early signalling intermediates required for neurite growth in NGF-responsive adult DRG neurons. Cell Signal. 2008; 20: 241–57.
- [7] Jacobs WB, Fehlings MG: The molecular basis of neural regeneration. Neurosurgery. 2003. 53: 943-48.
- [8] Tucker BA: Cooperation between integrin and growth factor receptor signalling in the regulation of newrite growth from rat sensory newrons, Library and Archives Canada, Ottawa, 2006: 1-89.
- [9] Kandel ER: Principles of Neural Science 5th Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc, New York, 2013: 1284-1305.
- [10] Hennigan A, O'Callaghan RM, Kelly AM: Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. Biochem Soc Trans. 2007; 35: 424-7.
- [11] Markus A, Patel TD, Snider WD: Neurotrophic factors and axonal growth. Curr Opin Neurobiol. 2002; 12: 523-31.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

- [12] Gillespie LN: Regulation of axonal growth and guidance by the neurotrophin family of neurotrophic factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003; 30: 724-33.
- [13] Davis KL: Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: 207-15.
- [14] Allen SJ, Dawbarn D: Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 110: 175-91.
- [15] 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: 379-86.
- [16] Fletcher L, Rider CC, Taylor CB: Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *Biochim Biophys Acta*. 1976; 452: 245-52.
- [17] Schmechel DE, Marangos PJ, Martin BM, Winfield S, Burkhardt DS, Roses AD, Ginns EI: Localization of neuron-specific enolase (NSE) mRNA in human brain. *Neurosci Lett*. 1987; 76: 233-8.
- [18] Hattori T, Ohsawa K, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S: Synthetic peptide corresponding to 30 amino acids of the C-terminal of neuron-specific enolase promotes survival of neocortical neurons in culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 202: 25-30.
- [19] 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: 191-8.
- [20] <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2akz/> (obiskano dne 28.4.17)
- [21] Rider CC, Taylor CB: Enolase isoenzymes in rat tissues: Electrophoretic, chromatographic, immunological and kinetic properties. *Biochim Biophys Acta*. 1974; 365: 285-300.
- [22] Vizin T, Kos J: Gamma-enolase: a well-known tumour marker, with a less-known role in cancer. *Radiol Oncol*. 2015; 49: 217–226.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

- [23] Hafner A, Obermajer N, Kos J:  $\gamma$ -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: 439-50.
- [24] Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonović UP, Kos J: Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. Int J Biochem Cell Biol. 2009; 41: 1685-96.
- [25] Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N: The role of cathepsin X in cell signaling. Cell Adh Migr. 2009; 3: 164-6.
- [26] Curtis I: Intracellular Mechanisms for Neuritogenesis, Springer Science+Business Media LLC, New York; 2007: 1-24.
- [27] Kazim SF, Iqbal K: Neurotrophic factor small-molecule mimetics mediated neuroregeneration and synaptic repair: emerging therapeutic modality for Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2016; 11: 50.
- [28] Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN: Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. Biochem Soc Trans. 2012; 40: 139-46.
- [29] Denhardt DT: Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. Biochem J. 1996; 318: 729-47.
- [30] Ahn NG, Seger R, Krebs EG: The mitogen-activated protein kinase activator. Curr Opin Cell Biol. 1992; 4: 992-9.
- [31] Fukuda M, Gotoh Y, Tachibana T, Dell K, Hattori S, Yoneda Y, Nishida E: Induction of neurite outgrowth by MAP kinase in PC12 cells. Oncogene. 1995; 11: 239-44.
- [32] Osaki M, Oshimura M, Ito H: PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. Apoptosis. 2004; 9: 667-76.
- [33] Luo J, Manning BD, Cantley LC: Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. Cancer Cell. 2003; 4: 257-62.
- [34] Osaki M, Oshimura M, Ito H: PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. Apoptosis. 2004 ; 9: 667-76.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

- [35] Kaplan DR, Miller FD: Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2000; 10: 381-91.
- [36] Chao MV: Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4: 299-309.
- [37] Tarone G, Hirsch E, Brancaccio M, De Acetis M, Barberis L, Balzac F, Retta SF, Botta C, Altruda F, Silengo L: Integrin function and regulation in development. *Int J Dev Biol.* 2000; 44: 725-31.
- [38] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular biology of the cell 5th edition, Garland Science, New York, 2008: 74-5.
- [39] Pellinen T, Ivaska J: Integrin traffic. *J Cell Sci.* 2006; 119: 3723-31.
- [40] Reyes-Reyes M, Mora N, Zentella A, Rosales C: Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF-kappaB and MAPK activation through separate signaling pathways. *J Cell Sci.* 2001; 114: 1579-89.
- [41] <http://www.ivaskalab.com/research-overview.html> (obiskano dne 28.4.2017)
- [42] Howe A, Aplin AE, Alahari SK, Juliano RL: Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10: 220-31.
- [43] Zent R, Pozzi A: Integrin Structure and Function, Springer, New York, 2009: 19-41.
- [44] Giancotti FG: A structural view of integrin activation and signaling. *Dev Cell.* 2003; 4: 149-51.
- [45] Ivankovic-Dikic I, Grönroos E, Blaukat A, Barth BU, Dikic I: Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 574-81.
- [46] Zhao X, Guan JL: Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63: 610-5.
- [47] Guo W, Giancotti FG: Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5: 816-26.

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

[48] Xie HR, Hu LS, Li GY: SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Chin Med J (Engl). 2010; 123: 1086-92.

[49] Vaudry D, Stork PJ, Lazarovici P, Eiden LE: Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. Science. 2002; 296: 1648-9.

[50] [https://ntx.iras.uu.nl/In\\_Vitro\\_systems](https://ntx.iras.uu.nl/In_Vitro_systems) (obiskano dne 20.2.17)

[51] Thorn K: A quick guide to light microscopy in cell biology. Mol Biol Cell. 2016; 27: 219–222.

[52] <http://www.labena.si/index.php/produkti/mikroskopi/mikroskopija-v-bioloskih-znanostih/celicne-kulture/invertni-mikroskop-ckx41-olympus> (obiskano dne 15.2.17)

[53] Hell SW, Wichmann J: Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt Lett. 1994; 19: 780-2.

[54] <https://spie.org/samples/TT69.pdf> (obiskano dne 22.2.17)

[56] Fonović UP, Obermajer N, Jevnikar Z, Mirković B, Rojnik M: Vaje iz farmacevtske biokemije, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo, Ljubljana, 2011: 103-4.

[57] Ginouves M, Carme B, Couppie P, Prevot G: Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against Leishmania spp. J Clin Microbiol. 2014; 52: 2131-8.

[58] Shapiro H: Practical flow cytometry, 4<sup>th</sup> edition, John Wley and Sons, New Jersey, 2003: 681.

[59] <http://archive.cnx.org/contents/4cf3c2d-dad1-4133-8dae-0c321a6577a4@1/extended-topic-microscopy-enhanced-by-the-wave-characteristics-of-light> (obiskano dne 15.2.17)

[60] Gobec M, Mencej Bedrač S, Omersel, J, Pajič T, Prodan Žitnik I: Vaje iz klinične kemije : študijsko gradivo in navodila za vaje, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Ljubljana, 2015: 23-32.

[61] [www.bio-rad-antibodies.com/static/2016/fc-guide/flow-cytometry-basics-guide.pdf](http://www.bio-rad-antibodies.com/static/2016/fc-guide/flow-cytometry-basics-guide.pdf)

Varl J. Vloga  $\beta_1$ -integrinskega receptorja v procesu nevritogeneze, posredovane z  $\gamma$ -enolazo. Magistrska naloga.

- [62] Woodring PJ, Litwack ED, O'Leary DD, Lucero GR, Wang JY, Hunter T: Modulation of the F-actin cytoskeleton by c-Abl tyrosine kinase in cell spreading and neurite extension. *J Cell Biol.* 2002; 156: 879-92.
- [63] Bonfoco E, Chen W, Paul R, Cheresh DA, Cooper NR:  $\beta_1$  integrin antagonism on adherent, differentiated human neuroblastoma cells triggers an apoptotic signaling pathway. *Neurosci.* 2000; 101: 1145–1152.
- [64] Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ: Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J Neurosci.* 1996; 16: 4707-15.
- [65] Ivins JK, Yurchenco PD, Lander AD: Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. *J Neurosci.* 2000; 20: 6551-60.
- [66] Meyer A, van Golen CM, Kim B, van Golen KL, Feldman EL: Integrin Expression Regulates Neuroblastoma Attachment and Migration. *Neoplasia.* 2004; 6: 332–342.
- [67] Westerink RH, Ewing AG: The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf).* 2008; 192: 273-85.
- [68] Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD: FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 249-56.