

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDAR JANEV

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDAR JANEV

**UČINEK AMILOIDA BETA NA IZRAŽANJE GENOV ZA (PRO)KATEPSIN X IN
CISTATIN C V NEDIFERENCIRANIH CELICAH PC-12**

**THE EFFECT OF AMYLOID BETA ON THE EXPRESSION OF (PRO)CATHEPSIN
X AND CYSTATIN C GENES IN UNDIFFERENTIATED PC-12 CELLS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka, mag. farm. Eksperimentalno delo sem opravljal v laboratorijih na Katedri za farmacevtsko biologijo.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Bojanu Doljaku, mag. farm. za vse koristne nasvete, strokovno pomoč in spodbudo pri načrtovanju ter izdelavi magistrske naloge. Zahvaljujem se mu tudi za čas, ki mi ga ja posvetil. Iskrena hvala tudi vsem zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo za potrpežljivost in pomoč pri delu.

Posebno zahvalo namenjam staršema, ki sta mi omogočila študij in me vseskozi podpirala ter verjela vame. Velika zahvala gre moji sestri Ani in celi družini za vso pomoč tekom študija. Posebno se zahvaljujem moji punci Lari za brezpogojno ljubezen, podporo in razumevanje. Zahvaljujem se tudi njeni družini, ki me je tekom študija nesebično podpirala.

Iskrena hvala vsem prijateljem, ki so me skozi študij neprestano spodbujali in podpirali.

Izjava

Ijavljam, da sem magistrsko naložko samostojno opravil pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka, mag. farm.

Aleksandar Janev

Komisija za zagovor magistrske naloge:

Predsednik: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Mentor: doc. dr. Bojan Doljak

Član: doc. dr. Jurij Trontelj

Kazalo vsebine

Kazalo vsebine	i
Kazalo slik	iii
Kazalo preglednic	iv
Seznam okrajšav	v
Povzetek.....	vii
Abstract.....	viii
1. UVOD.....	1
1.1 Alzheimerjeva bolezen.....	1
1.1.1 Etiologija bolezni	1
1.1.2 Simptomi in oblike bolezni	2
1.1.3 Diagnoza	2
1.2 Amiloid beta.....	3
1.3 Katepsin X.....	5
1.3.1 Cisteinski katepsini	5
1.3.2 Struktura katepsina X.....	5
1.3.3 Vloga katepsina X pri Alzheimerjevi bolezni.....	7
1.4 Cistatin C.....	7
1.4.1 Cistatin C in katepsin X	8
2. NAMEN DELA.....	9
3. MATERIALI IN METODE	10
3.1 Materiali	10
3.1.1 Reagenti	10
3.1.2 Gojišča	11
3.1.3 Protitelesa.....	12

3.1.4	Pufri.....	12
3.1.5	Laboratorijska oprema	14
3.1.6	Vzorci.....	16
3.2	Metode.....	16
3.2.1	Delo s celično linijo PC-12	16
3.2.2	Priprava celičnih lizatov	18
3.2.3	Merjenje koncentracije celokupnih proteinov po Lowry-ju	18
3.2.4	Encimsko imunski test ELISA.....	20
3.2.5	Merjenje aktivnosti katepsina X (metoda s fluorogenim substratom)	22
3.2.6	Določanje deleža mrtvih celic s pomočjo pretočne citometrije	23
3.2.7	Statistična obdelava rezultatov	25
4.	KRATEK OPIS EKSPERIMENTALNEGA DELA.....	26
5.	REZULTATI	28
5.1	Izražanje cistatina C v celičnih lizatih nediferenciranih celic PC-12.....	28
5.2	Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih nediferenciranih celic PC-12	34
5.3	Izražanje celokupnega katepsina X v celičnih lizatih nediferenciranih celic PC-12	40
5.4	Določanje deleža mrtvih celic s pomočjo pretočne citometrije	43
6.	RAZPRAVA.....	45
7.	SKLEP	53
8.	LITERATURA	54

Kazalo slik

Slika 1: Cepitev APP in nastanek A β na celični membrani.....	3
Slika 2: Postopek oligomerizacije amiloida beta	4
Slika 3: 3D struktura katepsina X	6
Slika 4: Kristalna struktura monomerne človeškega cistatina C.....	7
Slika 5: Morfologija suspenzijskih celic PC-12.....	16
Slika 6: Princip metode določanja proteinov po Lowry-ju.....	19
Slika 7: Princip testa sendvič ELISA.....	20
Slika 8: Princip določanja encimske aktivnosti z uporabo fluorogenih substratov	22
Slika 9: Shema pretočnega citometra.....	24
Slika 10: Shema eksperimentalnega dela gojenja celic PC-12 z A β_{25-35}	26
Slika 11: Umeritvena krivulja standardnih raztopin cistatina C	28
Slika 12: Vpliv A β_{25-35} na izražanje gena za cistatin C v lizatih nediferenciranih celic PC-12 v časovni točki 8 h.	29
Slika 13: Izražanje cistatina C v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 8-urnem gojenju z A β_{25-35} na stresalniku	30
Slika 14: Vpliv A β_{25-35} na izražanje gena za cistatin C v lizatih nediferenciranih celic PC-12 v časovni točki 24 h.	31
Slika 15: Izražanje cistatina C v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 24-urnem gojenju z A β_{25-35} na stresalniku	32
Slika 16: Grafični prikaz umeritvene krivulje za aktivnost katepsina X	34
Slika 17: Aktivnost katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 8-urni inkubaciji z A β_{25-35}	35
Slika 18: Aktivnost katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 8-urni inkubaciji z A β_{25-35} na stresalniku.....	36
Slika 19: Aktivnost katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 24-urni inkubaciji z A β_{25-35}	37
Slika 20: Aktivnost katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 24-urni inkubaciji z A β_{25-35} na stresalniku.....	38
Slika 21: Umeritvena krivulja standardnih raztopin katepsina X	40
Slika 22: Izražanje celokupnega katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 8- urnem gojenju z A β_{25-35} na stresalniku.....	41

Slika 23: Vpliv A β ₂₅₋₃₅ na izražanje celokupnega katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 v časovni točki 24 h	42
Slika 24: Primer točkovnega diagrama in histogramov za določitev deleža mrtvih celic.	43
Slika 25: Vpliv A β ₂₅₋₃₅ na delež mrtvih celic PC-12.....	44
Slika 26: Ekstrapolacija deleža mrtvih celic PC-12 na eksponentno trendno krivuljo.....	44
Slika 27: Prenos po westernu lizatov celic treh celičnih linij z uporabljenimi protitelesi AF-934	50

Kazalo preglednic

Preglednica I - Seznam uporabljenih reagentov in topil z navedenim proizvajalcem	10
Preglednica II - Seznam uporabljenih gojišč in njihova sestava.....	11
Preglednica III - Seznam uporabljenih protiteles in antigenov s proizvajalcem	12
Preglednica IV - Seznam uproabljenih pufrov in njihova sestava	12
Preglednica V - Uporabljena laboratorijska oprema.....	14
Preglednica VI - Shematski prikaz priprave celičnih lizatov.....	18
Preglednica VII - Shematski prikaz metode za določanje celokupnih proteinov po Lowry-ju	19
Preglednica VIII - Shematski prikaz izvedbe testa ELISA.....	21
Preglednica IX - Shematski prikaz metode za določanje aktivnosti katepsina X.....	23
Preglednica X - Primerjava vpliva klasičnega postopka in postopka s stalnim mešanjem na vrednost cistatina C v celičnem lizatu	33
Preglednica XI - Primerjava vpliva klasičnega postopka in postopka s stalnim mešanjem na množino aktivnega katepsina X	39

Seznam okrajšav

A β	amiloid beta
Abz	orto-aminobenzoil
AD	ang. "Alzheimer's disease", Alzheimerjeva bolezen
APP	amiloidni prekurzorski protein
BSA	ang. "bovine serum albumine", goveji serumski albumin
C99	C-končni fragment APP
Da	dalton
dH ₂ O	deionizirana voda
DTT	ang. "dithiothreitol", ditiotreitol
DMEM	po Dulbeccu spremenjeno Eaglovo gojišče
DMSO	dimetil sulfoksid
DNP	2,4-dinitrofenil
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina
ELISA	ang. "enzyme-linked immunosorbent assay", encimskoimunski test na trdni podlagi
EMT	epitelno-mezenhimski prehod
FBS	ang. "fetal bovine serum", fetalni goveji serumski albumin.
HRP	ang. "horseradish peroxidase", encim hrenova peroksidaza
mAb	monoklonsko protitelo
MV	multivezikularna telesa
MTP	mikrotititska ploščica
NGF	živčni rastni dejavnik

pAb	poliklonsko protitelo
PBS	ang. "phosphate buffered saline", fosfatni pufer
PI	ang. "propidium iodide", propidijev jodid
rCC	rekombinantni cistatin C
rcatX	rekombinantni katepsin X
RPMI	večnamensko, splošno uporabljeno gojišče, primerno za sesalske celice
RSM	ang. "reduced serum medium", gojišče za sesalske celice z manj seruma
RSD	ang. »relative standard deviation«, relativni standardni odklon
sAPP β	N-terminalni fragment APP
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

Povzetek

Alzheimerjeva bolezen (AD) je kronična progresivna nevrodegenerativna motnja, ki predstavlja glavni vzrok za demenco. Glavne nevropatološke značilnosti AD so zunajcelični senilni plaki, znotrajcelične nevrofibrilarne pentlje ter izguba sinaps in nevronov. Senilni plaki so sestavljeni večinoma iz netopnih depozitov amiloida beta ($A\beta$), ki so produkt presnove amiloidnega β -prekurzorskega proteina (APP). Cistatin C je endogeni inhibitor cisteinskih proteaz, ki je poleg svojih normalnih bioloških funkcij, vpletен v številne patološke procese, kot so: rak, bolezni ledvic, diabetes, epilepsija in nevrodegenerativne motnje. Skupaj z $A\beta$ ga najdemo v senilnih plakih bolnikov z AD. Nekatere študije kažejo, da cistatin C z vezavo na $A\beta$ prepreči njegovo agregacijo in tako ščiti nevrone pred toksičnostjo amiloida. Katepsin X spada v družino lizosomskih cisteinskih proteaz in je vpletен v različne patološke procese, kot so proliferacija in invazija rakavih celic ter nevrodegeneracija.

V magistrski nalogi smo preučili, ali $A\beta_{25-35}$, prisoten med gojenjem nediferenciranih celic PC-12, vpliva na izražanje genov za cistatin C in pro(katepsin) X ter na aktivnost katepsina X. Preverili smo tudi, ali na to vpliva način gojenja celic z $A\beta_{25-35}$, in sicer s klasičnim postopkom oz. s postopkom s stalnim mešanjem celične kulture. S testom ELISA smo izmerili vrednost cistatina C in celokupnega katepsina X, z encimskim testom s fluorogenim substratom ovrednotili aktivnost katepsina X, s pretočno citometrijo pa določili delež mrtvih celic v časovnih točkah 8 in 24 ur.

Ugotovili smo, da se je vrednost cistatina C po 8-urnem gojenju z $A\beta_{25-35}$ v kulturi s stalnim mešanjem znižala za 29,5 %, po 24-urnem gojenju pod enakimi pogoji pa povečala za 59,1 %. Zmanjšanje oz. povečanje aktivnosti katepsina X po 8 in 24-urnem gojenju ni bilo statistično značilno. Ugotovili smo, da gojenje celic PC-12 z $A\beta_{25-35}$ ne vpliva na izražanje celokupnega katepsina X. S pretočno citometrijo pa smo dokazali, da $A\beta_{25-35}$ deluje toksično, saj se je delež mrtvih celic v kulturah statistično značilno povečal tako po 8 kot po 24-urnem gojenju (za 25,7 % oziroma 48,3 %) glede na kontrolne kulture, v katerih celice PC-12 niso bile izpostavljene amiloidu.

KLJUČNE BESEDE: Alzheimerjeva bolezen, amiloid beta, cistatin C, katepsin X, celice PC-12

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a chronic, progressive and neurodegenerative disorder that is the most common cause of dementia. The main neuropathological characteristics of AD are extracellular senile plaques, intracellular neurofibrillary tangles and loss of synapses and neurons. Senile plaques are composed primarily of insoluble deposits of amyloid beta (A β), which is derived from amyloid precursor protein (APP) by proteolytic cleavage. Cystatin C is an endogenous cysteine protease inhibitor. In addition to its normal biological functions, it is involved in many pathological processes, such as cancer, kidney disease, diabetes, epilepsy, and neurodegenerative disorders. Cystatin C is found together with A β in the senile plaques of patients with AD. Several studies have shown that cystatin C prevents aggregation of A β by binding to it, thus protecting the neurons against the toxicity of amyloid beta. Cathepsin X belongs to the family of lysosomal cysteine proteases and is involved in various pathological processes, such as proliferation and invasion of cancer cells and neurodegeneration.

In our Master work, we examined whether the treatment of undifferentiated PC-12 cells with A β_{25-35} , had any effect on the protein expression of cystatin C, pro(cathepsin) X and the enzymatic activity of cathepsin X. We also checked the effect of continuous shaking during cell incubation. We used ELISA to determine the level of cystatin C and total cathepsin X. We quantified the enzymatic activity of cathepsin X by using specific fluorogenic substrate Abz-Phe-Glu-Lys (Dnp)-OH and determined the percentage of dead cells with flow cytometry at time intervals of 8 and 24 hours.

We showed that the value of cystatin C decreased when the cells were incubated for 8 hours with A β_{25-35} during constant shaking (by 29,5 %). The level of cystatin C in the cell lysates increased after 24 hours of incubation with continuous shaking (by 51,9 %). The reduction of the cathepsin X activity was not statistically significant after 8 and 24 hours. We showed that amyloid beta does not affect the expression of total cathepsin X. We demonstrated that the percentage of dead cells significantly increased after 8 and 24 hours (by 25,7 % and 48,3 %, respectively) compared to control PC-12 cells that were not treated with amyloid beta.

KEYWORDS: Alzheimer's disease, amyloid beta, cystatin C, cathepsin X, PC-12 cell line

1. UVOD

Svetovno prebivalstvo se stara z veliko hitrostjo, kar za starostnike pomeni dodatne zdravstvene zaplete, med katerimi so najpogostejsa artritična obolenja, kardiovaskularne bolezni, rak, respiratorne bolezni in nevrodegenerativna obolenja. Med degeneracijami živčnega sistema so najpogostejsa demence, s katerimi danes živi 35 milijonov ljudi, število obolelih pa naj bi se do leta 2030 povišalo na 65 milijonov. Demenca je klinično stanje, za katerega je značilno poslabšanje intelektualnih funkcij posameznika, npr. izguba spomina, težave pri razmišljanju in govora ter moteno reševanje vsakdanjih nalog (1).

1.1 Alzheimerjeva bolezen

Alzheimerjeva bolezen (ang. "Alzheimer's disease", AD) predstavlja najpogostejsi vzrok za ireverzibilno demenco. Nemški psihiater in nevropatolog Dr. Alois Alzheimer je leta 1906 odkril AD pri bolnici, ki je bila stara 51 let. Kljub temu, da je minilo več kot 100 let od odkritja te hude bolezni, natančnega vzroka za njen nastanek in razvoj še ne poznamo (1).

AD je progresivna in s starostjo povezana nevrodegenerativna motnja za katero so najbolj značilni zunajcelični senilni plaki, znotrajcelične nevrofibrilarne pentlje ter izguba sinaps in nevronov. Senilni plaki so sestavljeni iz netopnih depozitov amiloida β ($A\beta$), medtem ko nevrofibrilarne pentlje vsebujejo aggregate hiperfosforiliranega proteina tau (2). Klinični simptomi vključujejo progresivno in postopno zmanjšanje kognitivne funkcije, izgubo spomina ter vedenjske in duševne spremembe (2, 3, 4).

Po poročanju slovenskega združenja Spominčica, za pomoč pri demenci, ocenjujejo, da je v Sloveniji več kot 32.000 bolnikov z demenco, za katere skrbi kar 100.000 svojcev (5). Trenutno ni učinkovitih zdravil s katerimi bi lahko ustavili razvoj bolezni, na voljo so le učinkovine, ki lajšajo nekatere posledice in upočasnjujejo potek bolezni (1, 6).

1.1.1 Etiologija bolezni

Natančna etiologija AD še ni poznana. Starost in pozitivna družinska anamneza sta pomembna dejavnika tveganja. Epidemiološke raziskave so pokazale, da se AD pojavi pri približno 5 % prebivalcev starejših od 65 let. Incidenc pa se poveča na 20 % pri starejših od 80 let. AD se pogosteje pojavi pri ženskah. Genetske študije so pokazale, da so z AD povezane mutacije v genih za amiloidni prekurzorski protein (APP), presenilin I (PSEN1) in

presenilin II (PSEN2). Večje tveganje za pojav AD predstavlja tudi polimorfizem v genu za apolipoprotein E (APOE) (7).

1.1.2 Simptomi in oblike bolezni

Glede na potek bolezni, razdelimo AD na štiri oblike/faze:

- predklinično
- blago (zgodnjo),
- zmerno in
- težko (pozno).

Z napredovanjem bolezni prizadeti doživljajo večjo izgubo spomina in drugih kognitivnih funkcij. Pri predklinični obliki so lahko prisotni degenerativni procesi v možganih že veliko pred pojavom simptomov (8). Bolniki z blago stopnjo AD imajo težave s spominom, manj energije, se manj zanimajo za delo in družabne dejavnosti, slabo ravnajo z denarjem, potrebujejo dlje časa, da končajo običajne dnevne naloge, pogosto pozabljujajo, kje so pustili svoje stvari in postanejo bolj agresivni. Poleg tega lahko pride do sprememb v razpoloženju. V tej fazi AD najpogosteje diagnosticirajo. Simptomi postanejo v zmerni fazi bolj očitni, saj se poslabšajo, pogosteje pojavljajo in jih je težje prikriti. Zmerna oblika AD lahko traja od 2-10 let. Bolniki imajo težave s pisanjem in branjem, izgubijo sposobnost iskanja novih besed in izražanja misli, postanejo zmedeni in ne vedo kje se nahajajo. Za bolnike v tej fazi so značilne psihične in vedenjske spremembe. Postanejo sumničavi, agresivni in depresivni. Lahko se pojavijo halucinacije ali blodnje. Bolniki imajo spremembe v apetitu in spalnih navadah (9).

Ko bolezen napreduje v pozno fazo, potrebujejo bolniki nego in pomoč pri opravljanju bistvenih življenjskih nalog, kot so prehranjevanje, premikanje, oblačenje in uporaba kopalnice. V tej fazi so senilni plaki in nevrotibilarne pentlje razširjene po celotnih možganih, možgansko tkivo pa se znatno skrči. Še posebej pa so očitni učinki AD na fizično zdravje posameznika. Bolniki postanejo zaradi poškodb na področjih možganov, ki nadzorujejo gibanje, vezani na posteljo. Zaradi senilnih plakov, ki se nahajajo v predelu za nadzor požiranja, pride tudi do težav s prehranjevanjem. Če pri tem zaide hrana v pljuča, lahko pride do aspiracijske pljučnice in posledične smrti (9, 10).

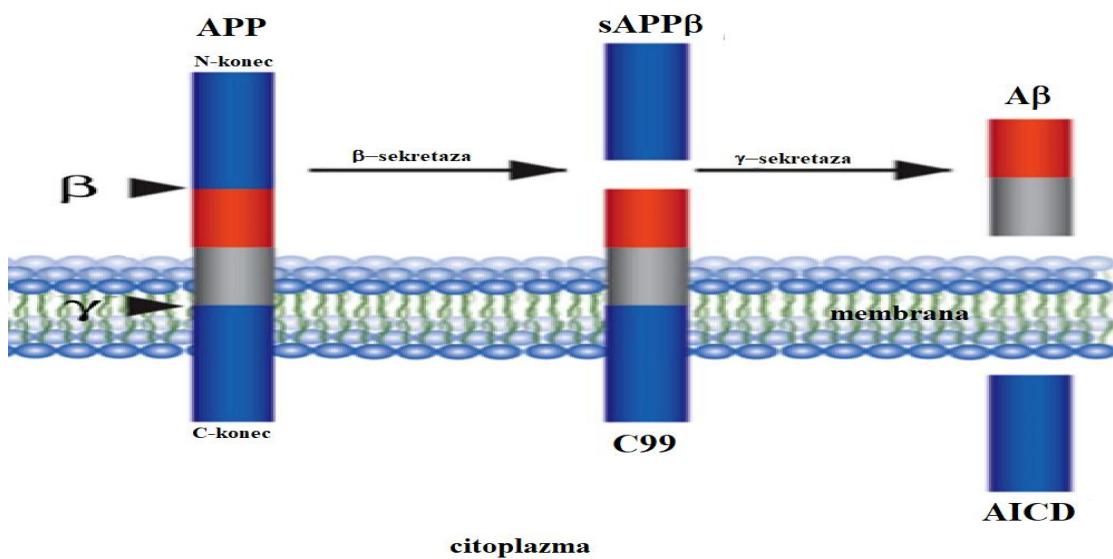
1.1.3 Diagnoza

Zlati standard za diagnozo AD je patološki pregled možganov pri obdukciji (post-mortem), s katerim ocenjujejo prisotnost in razporeditev senilnih plakov ter nevrotibilarnih pentelj v

možganih. Zdravniki lahko postavijo klinično diagnozo na podlagi anamneze, nevroloških testov, laboratorijskih preiskav, slikovnih tehnik (računalniška tomografija – CT, magnetna resonanca – MRI) in psihometričnih testov. Klinična diagnoza je pravilna v 70 do 90 % primerov (1). Podobno kot pri drugih boleznih, je tudi pri AD cilj najti biološke označevalce za diagnozo in prognozo bolezni. Biološki označevalci so snovi, ki jih lahko izmerimo, in na osnovi njihovih vrednosti natančno in zanesljivo dokažemo prisotnost bolezni. Uporabljajo se za spremljanje napredovanja bolezni in odziva na zdravljenje ter kot kriterij za izbiro bolnikov za klinične študije. Za diagnozo AD so mednarodno uveljavljeni trije biološki označevalci v cerebrospinalnem likvorju, in sicer: A β ₁₋₄₂, celokupni protein tau in fosforilirani protein tau 181 (11).

1.2 Amiloid beta

Za Alzheimerjevo bolezen (AD) je značilno nenormalno kopičenje A β v možganskih regijah. A β je sicer normalen produkt celičnega metabolizma. Izhaja iz amiloidnega prekursorja proteina (APP) (Slika 1). APP nastane v endoplazemskem retikulumu in se nato transportira do Golgijskega aparata, kjer dokončno dozori. Na plazemski membrani se zreli APP cepi s pomočjo β -sekretaze na manjši N-končni fragment (sAPP β) in daljši C-končni fragment (C99). C99 se nato cepi z γ -sekretazo, pri čemer nastanejo peptidi A β , ki se med seboj razlikujejo v dolžinah (12, 13, 14).



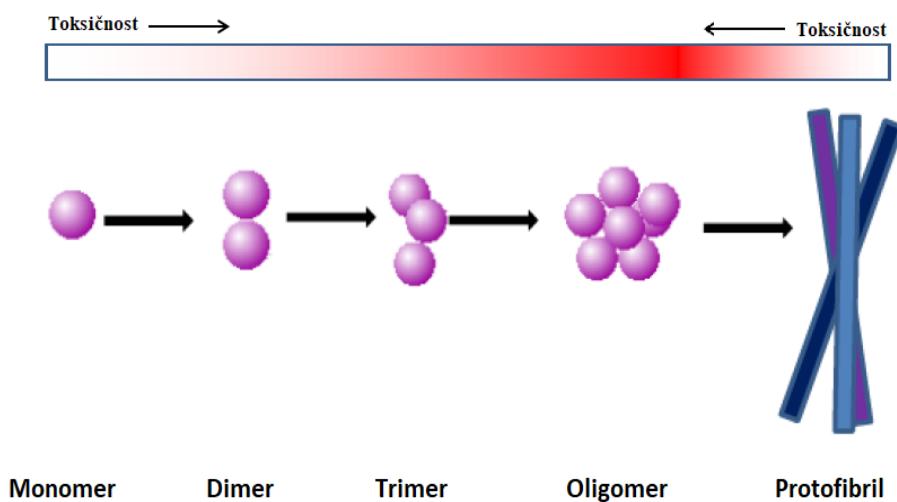
Slika 1: Cepitev APP in nastanek A β na celični membrani; prizadeno po (15).

V možganih se A β nahaja v obliki monomerov, oligomerov in fibril. Monomerji proteinov A β so neškodljivi, a po agregaciji v topne dimere, trimere, oligomere, protofibrile in netopne

fibrile, postanejo nevrotoksični. Ti se nadalje združujejo v plake, ki jih najdemo v možganih bolnikov z AD. Prehod iz monomera v oligomere in nato v fibrile velja za enega izmed osrednjih dogodkov v patogenezi AD. Senilni plaki so sestavljeni predvsem iz netopne fibrilne oblike A β . Raziskave so pokazale, da resnost bolezni ni vedno povezana s količino fibril, saj njihova gostota in porazdelitev nista vedno povezani z disfunkcijo nevronov (16).

V novejših raziskavah poročajo, da so oligomeri A β najbolj toksična oblika amiloidnih derivatov. Topni oligomeri A β reagirajo s celicami glie in nevroni, kar vodi do aktivacije provnetnih kaskad, mitohondrijske disfunkcije, povečanja oksidativnega stresa in fosforilacije proteina tau, poslabšanja znotrajceličnih signalnih poti, deregulacije v metabolizmu kalcija, indukcije apoptoze v nevronih in celično smrt (12).

Oligomere delimo glede na velikost, morfologijo in nevrotoksičnost, ki se povečuje z njihovo velikostjo (Slika 2). Znanstveniki menijo, da so oligomeri vzrok in ne posledica bolezni, saj jih lahko odkrijemo še pred nastankom fibril (16).



Slika 2: Postopek oligomerizacije amiloida beta; pritejeno po (16). Monomeri in fibrili so manj, oligomeri pa bolj citotoksične oblike peptida A β .

Prevladujoči monomerni oblici, ki tvorita oligomere in protofibrile v amiloidnih plakih, sta A β_{1-40} in A β_{1-42} , ki imata identično aminokislinsko zaporedje, s tem, da je A β_{1-42} na C-koncu daljši za aminokislini izolevcin in alanin. Kljub podobnosti, je daljša oblika A β_{1-42} bolj amilidotvorna in citotoksična. Čeprav je manj pogost, pa A β_{1-42} , tvori fibrile bistveno hitreje kot A β_{1-40} (11, 13, 17).

Poleg $A\beta_{1-40}$ in $A\beta_{1-42}$ so v možganih starejših oseb odkrili tudi krajsi fragment $A\beta_{25-35}$, ki se je v študijah *in vitro* izkazal za najbolj toksičnega med amiloidnimi derivati. $A\beta_{25-35}$ namreč hitro agregira, bistveno zmanjuje sposobnost preživetja celic, saj povečuje število apoptotičnih celic. V celični kulturi nevronov $A\beta_{25-35}$ destabilizira znotrajcelično homeostazo Ca^{2+} in povzroči nevronsko degeneracijo (18).

Molekulski mehanizmi nevrodegenerativnih učinkov omenjenih amiloidnih oblik, pa ostajajo še vedno nepojasnjeni (18).

1.3 Katepsin X

1.3.1 Cisteinski katepsini

Lizosomi so glavni organeli za razgradnjo proteinov in drugih bioloških makromolekul v celicah, saj vsebujejo najmanj 60 različnih hidrolitskih encimov. Glavni proteolitski encimi so katepsini, ki ji glede na katalitične aminokislinske ostanke v aktivnem mestu razdelimo v tri podskupine:

- serinski (catepsina A in G)
- aspartatni (catepsina D in E) in
- cisteinski katepsini.

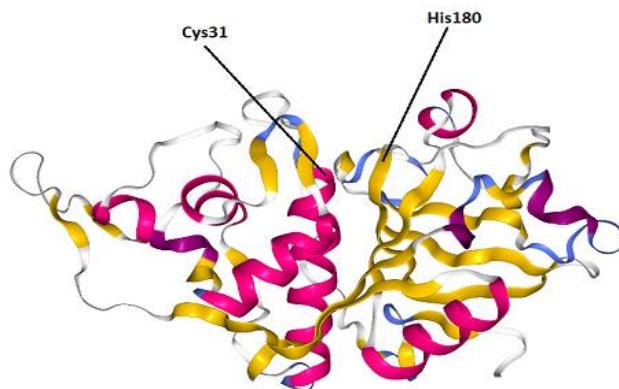
Cisteinski katepsini (B, F, C, O, K, L, H, V, S in X) so del klana cisteinskih proteaz CA, natančneje del družine C1 (papainu podobnih encimov). Z izjemo catepsina C, ki je tetramerni protein z molekulsko maso okrog 200 kDa, je ostalih deset cisteinskih katepsinov monomernih, z molekulskimi masami v območju od 25-30 kDa. Sedem cisteinskih katepsinov (F, L, K, S, O, V in W) ima endopeptidazno aktivnost (katalizirajo hidrolizo peptidne vezi znotraj polipeptidne verige), dva pa sta eksopeptidazi (catepsin X - karboksipeptidaza in catepsin C – aminopeptidaza; odstranjujeta aminokislinske ostanke iz C-konca ali N-konca polipeptidne verige). Katepsina B in H sta primarno eksopeptidazi, vendar imata lahko tudi endopeptidazno aktivnost (19, 20, 21).

1.3.2 Struktura katepsina X

Katepsin X se v literaturi pojavlja tudi pod imenom catepsin Z oz. catepsin P. Gen za catepsin X (*CTSZ*) se nahaja na kromosому 20 in kodira za globularni protein, sestavljen iz dveh domen. Glavna strukturna značilnost C-končne domene je β -struktura, medtem ko vsebuje N-končna domena α -vijačnice. Domeni tvorita režo z aktivnim mestom v obliki črke V, s katalitičnima aminokislinskima ostankoma Cys31 in His180 (Slika 3) (22).

Katepsin X vsebuje več strukturnih in funkcionalnih lastnosti, ki ga jasno ločijo od drugih cisteinskih katepsinov. Zanj je značilna zelo kratka pro-domena (38 aminokislinskih ostankov). Njegova aktivacija ne poteče avtokatalitično, ampak se v lizosому iz prokatepsina X pretvori v aktivno obliko, po delovanju katepsina L. Posebnost katepsina X je tudi vrinjenost treh dodatnih aminokislin (Ile24, Pro25 in Gln26) v zelo ohranjeno regijo med Gln22, ki je del oksianionske luknje, in katalitičnim Cys31. Ta razmeroma majhna sprememba ima velik vpliv na specifičnost encima (22, 23).

Katepsin X je med drugim izražen v imunskih celicah, predvsem monocitih, makrofagih in dendritičnih celicah. Najdemo ga v tudi v celicah mikroglie in astrocitih. Njegova biološka funkcija še vedno ni popolnoma pojasnjena. Ugotovili so, da ima prokatepsin X vezavni motiv RGD (Arg-Gly-Asp), medtem ko ima zrela oblika katepsin X vezavni motiv ECD (Glu-Cys-Asp). Preko teh vezavnih motivov katepsin X inter-reagira z integrini in tako vpliva na adhezijo in celično signalizacijo. S proteolitično aktivacijo integrinov vpliva katepsin X na migracijo, invazivnost, celično adhezijo, fagocitozo in proliferacijo limfocitov T (24).



Slika 3: 3D struktura katepsina X. Označena sta Cys31 in His180 v aktivnem mestu; povzeto po (23).

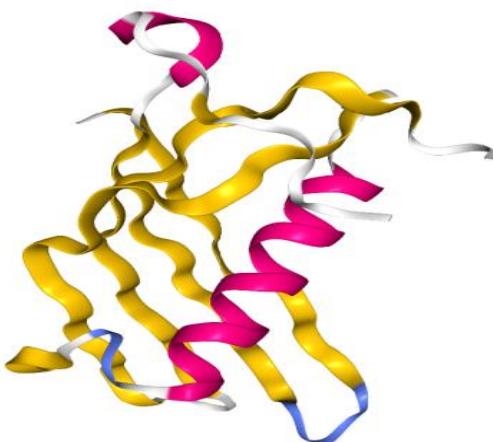
Katepsin X je vpletен v različne patološke procese, katerih posledice so nevrodgeneracije, napredovanje raka in drugih bolezni. Prekomerno izražanje gena za katepsin X so odkrili pri raku prostate, želodca in agresivni obliki malignega melanoma. Pri hepatoceličnem karcinomu so ugotovili povišane ravni katepsina X tako na nivoju RNA kot na proteinskem nivoju. Katepsin X spodbuja tumorigenezo tako, da obide celično senescenco, ki sicer predstavlja močan varovalni mehanizem pred proliferacijo in invazijo rakavih celic. Poleg tega spodbuja tudi epitelno-mezenhimski prehod (EMT) in tako dodatno prispeva k napredovanju tumorja. EMT namreč poveča odpornost rakavih celic na apoptozo, njihovo invazivnost in migracijsko sposobnost (24, 25).

1.3.3 Vloga katepsina X pri Alzheimerjevi bolezni

Katepsin X je sodeluje v različnih procesih, ki spreminjajo normalne funkcije nevronov. V možganskem tkivu ga poleg nevronov najdemo tudi v celicah glie. Celice mikroglie, ki so pri AD aktivirane, delujejo nevroprotективno z izločanjem nevrotrofičnih dejavnikov, kot je npr. γ -enolaza, ki uravnava preživetje, diferenciacijo in regeneracijo nevronov preko aktivacije signalnih poti MAPK/ERK in PI3K/Akt. Po drugi strani, pa aktivirana mikroglia tudi sama prispeva k degeneraciji nevronov, in sicer z izločanjem provnetnih in/ali citotoksičnih dejavnikov, med drugim tudi katepsina X. Katepsin X v nevronskih celicah odceplja dipeptid na C-koncu γ -enolaze ter s tem odpravlja njen nevroprotективno delovanje in preprečuje njen vezavo na ogrodni protein γ 1-sintrofin, ki je odgovoren za prenos omenjenega encima na plazemsko membrano. Študije na mišjih modelih AD kažejo na akumulacijo katepsina X in γ -enolaze v okolini senilnih plakov. Skrajšana oblika γ -enolaze je prisotna v neposredni bližini senilnih plakov, medtem ko je nespremenji encim izražen v celicah mikroglie, ki obdajajo amiloidne plake. Celice primarne mikroglie, gojene skupaj z A β , sintetizirajo in izločajo γ -enolazo, ki ščiti nevronske celice. Njen nevroprotективni učinek pa izgine po proteolitičnem delovanju katepsina X na njenem C-koncu (24, 26).

1.4 Cistatin C

Cistatin C je endogeni inhibitor cisteinskih proteaz, ki zavira nekatere člane katepsinske družine lizosomskih proteaz (catepsin B, H, L in S). Aktivna oblika človeškega cistatina C je ne-glikozilirana, 13,3 kDa velika polipeptidna veriga, sestavljena iz 120 aminokislin (Slika 4), zapisanih v genu *CST3*. Konstantno ga sintetizirajo vse človeške celice z jedrom, nahaja pa se v vseh telesnih tekočinah in tkivih (27).



Slika 4: Kristalna struktura monomernega človeškega cistatina C; povzeto po (28).

Cistatin C se v diagnostiki uporablja kot označevalec ledvične funkcije. Zaradi nizke molekulske mase in pozitivnega naboja pri fiziološki vrednosti pH, zlahka prečka glomerulno membrano. Reabsorbira se v epitelijskih celicah proksimalnih tubulov. Njegova koncentracija v serumu je dobra ocena glomerulne filtracije, saj ni odvisna od mišične mase, spola, starosti, vnetja, zvišane telesne temperature in zunanjih dejavnikov (29, 30).

Cistatin C sodeluje v številnih patoloških procesih, med drugim v oksidativnem stresu, nevrodegeneraciji in vnetju. Študije so pokazale, da na njegovo serumsko koncentracijo vplivajo kronična ledvična bolezen, okužba sečil, rak, hipertenzija, srčno-žilne bolezni, revmatoidni artritis, zdravljenje z glukokortikoidi, delovanje ščitnice in staranje (31).

Cistatin C je vpletен tudi v razvoj AD. Imunohistokemijsko so namreč dokazali, da je cistatin C prisoten v senilnih plakih, skupaj z A β . Ugotovili so tudi, da ima nevroprotективni učinek, saj se veže na A β in s tem preprečuje njegovo oligomerizacijo, tvorbo fibril in odlaganje amiloida. Povečana ekspresija cistatina C aktivira več zaščitnih mehanizmov, ki vključujejo indukcijo autofagije in celične delitve, zaviranje cisteinskih proteaz in preprečevanje amiloidogeneze. Visoke koncentracije cistatina C so citotksične, njegova nizka koncentracija pa je povezana z večjim tveganjem za razvoj AD. Genetske študije so pokazale, da je z zmanjšanim izločanjem cistatina C povezan polimorfizem v genu *CST3* (31).

1.4.1 Cistatin C in katepsin X

Ravnotežje med katepsini in njihovimi endogenimi zavirci (cistatini, tiropini in serpini), vpliva na številne patofiziološke procese v možganih. V nasprotju z drugimi cisteinskimi katepsini, pa je seznam inhibitorjev katepsina X precej kratek. Cistatini, ki so endogeni zavirci cisteinskih proteaz, so neselektivni in se vežejo na katepsin X veliko šibkeje kot na ostale cisteinske katepsine (21). Študija, ki so jo izvedli Klemenčič s sod., je najprej nakazovala, da cistatin C inhibira izolirani človeški katepsin X v nanomolnem območju, vendar se je kasneje izkazalo, da je bil vzrok za tak rezultat primes katepsina B, ki se je nahajal v izolatu človeških jeter (32). Nager in sod. pa so nato dokončno potrdili, da cistatin C ne inhibira rekombinantnega katepsina X (22).

2. NAMEN DELA

Cistatin C in (pro)katepsin X predstavljata zaradi svojih pozitivnih oz. negativnih vplivov na nevrodegenerativne procese zanimivi tarči za terapijo in diagnostiko. Namen magistrske naloge je raziskati izražanje genov za cistatin C in (pro)katepsin X v gojenih nepritrjenih celicah PC-12, ki predstavljajo celični model Alzheimerjeve bolezni. Celice PC-12 bomo izpostavili toksičnim agregatom fragmenta A β_{25-35} ter nato s testom ELISA v celičnih lizatih izmerili izraženost genov za cistatin C in (pro)katepsin X, z metodo s fluorogenim substratom pa določili aktivnost katepsina X. Izbrali bomo časovni točki 8 in 24 ur po dodatku A β_{25-35} ter primerjali izmerjene vrednosti s kontrolnimi celicami PC-12, ki ne bodo izpostavljene agregatom fragmenta A β_{25-35} .

Predviedevamo, da se bo izražanje gena za cistatin C v nediferenciranih celicah PC-12, izpostavljenih delovanju agregatom fragmenta A β_{25-35} , povečalo. Izražanje gena za (pro)katepsin X pa je na osnovi dostopnih podatkov v literaturi nemogoče napovedati. Dokazati želimo naslednjo hipotezo:

- Izražanje gena za cistatin C je v celicah PC-12, gojenih v suspenzijskih kulturah v prisotnosti toksičnih agregatov fragmenta A β_{25-35} , povečano, v primerjavi s kontrolnimi celicami PC-12, gojenimi pod enakimi pogojmi, brez dodatka A β_{25-35} .

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti

Reagenti in topila, ki smo jih uporabljali pri praktičnem delu, so navedeni v Preglednici I.

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

Reagent	Proizvajalec, država
Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH	Jiangsu Vcare Pharmatech Co., Kitajska
Amiloid beta ₍₂₅₋₃₅₎	Bachem, Švica
BSA	Sigma-Aldrich, ZDA
citronska kislina (C ₆ H ₈ O ₇)	Sigma-Aldrich, ZDA
DMSO	Gibco, ZDA
DTT	Sigma-Aldrich, ZDA
EDTA	Promega, ZDA
Etanol (70 %, 96 %)	Riedel-deHaën, Nemčija
FBS	Gibco, ZDA
Glutaraldehid	Boehringer Ingelheim Bioproducts, Nemčija
HS	Gibco, ZDA
H ₂ SO ₄	Kemika, Slovenija
KCl	Sigma-Aldrich, ZDA
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, ZDA
Kolagen	Sigma-Aldrich, ZDA
Komplet reagentov Bio-Rad DC Protein Assay	Bio-Rad, ZDA
L-cistein	Aldrich, ZDA
L-glutamin	ICN Biomedicals Inc., ZDA
Na ₂ CO ₃	Kemika, Slovenija
NaHCO ₃	Riedel-deHaën, Nemčija
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Riedel-deHaën, Nemčija
Na-acetat	Merck, ZDA
NaCl	Kemika, Slovenija

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Riedel-deHaën, Nemčija
NaN ₃	Riedel-deHaën, Nemčija
Nigrozin	Sigma-Aldrich, ZDA
PBS	Sigma-Aldrich, ZDA
Penicilin	Sigma-Aldrich, ZDA
Polietilen glikol 8000	Sigma-Aldrich, ZDA
Propidijev jodid	Abcam, Velika Britanija
RPMI 1640	Gibco BRL (Invitrogen), ZDA
Streptomycin	Sigma-Aldrich, ZDA
TMB	Sigma-Aldrich, ZDA
Triton X-100	Fluka, ZDA
Tween 20	Serva, Nemčija

3.1.2 Gojišča

Gojišča, ki smo jih uporabili pri izvajanjju magistrske naloge, so prikazani v Preglednici II.

Preglednica II: Seznam uporabljenih gojišč in njihova sestava.

Gojišče	Sestava gojišča	
Kompletno gojišče za celice PC-12 – RPMI:	83 % Advanced RPMI 10 % HS 5 % FBS 1 % penicilin/streptomycin 1 % L-glutamin	Premešamo in do uporabe hranimo v hladilniku pri 4 °C.
RSM (reduced serum medium) – RPMI:	90,5 % Advanced RPMI 5 % HS 2,5 % FBS 1 % penicilin/streptomycin 1 % L-glutamin	Premešamo in do uporabe hranimo v

	hladilniku pri 4 °C.
--	----------------------

3.1.3 Protitelesa

V Preglednici III so navedena protitelesa, ki smo jih uporabljali za izvedbo magistrskega dela.

Preglednica III: *Seznam uporabljenih protiteles in antigenov s proizvajalcem.*

Antigeni in protitelesa	Proizvajalec
Kozja poliklonska protitelesa proti (pro)katepsinu X (osnovna raztopina 0,5 mg/mL)	R&D Systems
Mišja monoklonska protitelesa 3B10, specifična za (pro)katepsin X, konjugirana s HRP	Pripravljena na UL FFA, Katedra za farmacevtsko biologijo
Kunčja protitelesa, specifična za cistatin C (osnovna raztopina 1,6 mg/mL)	Pripravljena na Intitutu Jožef Stefan
Mišja monoklonska protitelesa 1A2 proti cistatinu C, konjugirana s HRP	Pripravljena na UL FFA, Katedra za farmacevtsko biologijo
Rekombinantni katepsin x (rcatX – osnovna raztopina 940 µg/mL)	Pripravljena na UL FFA, Katedra za farmacevtsko biologijo
Rekombinantni cistatin C (rCC – osnovna raztopina 3 µg/mL)	Pripravljena na Inštitutu Jožef Stefan
Active catX – (osnovna raztopina 0,55 µg/mL)	Pripravljena na UL FFA, Katedra za farmacevtsko biologijo

3.1.4 Pufri

V Preglednici IV so navedeni pufri, ki smo jih uporabili pri izvajanju magistrske naloge.

Preglednica IV: *Seznam uporabljenih pufrov in njihova sestava.*

Pufer	Sestava pufra
<u>Pufer A</u> (za vezavo lovilnih protiteles pri testu ELISA)	1,60 g (15 mM) Na ₂ CO ₃ 2,94 g (35 mM) NaHCO ₃ 0,20 g (3 mM) NaN ₃

	Dopolnimo z dH ₂ O do 1 L in s pH-metrom uravnamo pH na 9,6.	
<u>Pufer B</u> (za spiranje mikrotitrsko plošče pri testu ELISA; WASH pufer)	8,50 g (0,15 mM) 1,34 g (7,5 mM) 2,94 g (2,5 mM) 0,50 g (0,05 %)	NaCl Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O Tween 20
	Dopolnimo z dH ₂ O do 1 L in s pH-metrom uravnamo pH na 7,2.	
<u>Pufer C</u> (za blokiranje prostih mest na mikrotitrski plošči, za redčenje standardov, vzorca in konjugiranih detekcijskih protiteles pri testu ELISA)	2 g	BSA
	Dopolnimo s pufrom B do 100 mL.	
<u>Pufer za TMB</u> (za redčenje substrata TMB)	21,0 g (0,1 M) 17,8 g (0,1 M)	C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	Dopolnimo z dH ₂ O do 1 L in s pH-metrom uravnamo pH na 6,0.	
<u>PBS</u> (fosfatni pufer z dodatkom NaCl):	1,8 g (0,10 mM) 0,2 g (1,47 mM) 8,0 g (136 mM) 0,2 g (2,68 mM)	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaCl KCl
	Dopolnimo z dH ₂ O do 1 L in s pH-metrom uravnamo pH na 7,4.	
<u>Lizirni pufer</u> (za pripravo celičnih lizatov)	1190 mg (50 mM) 877 mg (150 mM) 200 µL (1 mM) 1000 µL (1 %)	HEPES NaCl EDTA Triton
	Dopolnimo z dH ₂ O do 100 mL in s pH-metrom uravnamo pH na 6,5.	

<u>Lizirni pufer za katepsin X</u> (za pripravo celičnih lizatov katepsina X)	0,05 M 1 mM 0,1 M 0,25 %	Na-acetat, pH = 5,5 EDTA NaCl Triton X - 100
<u>Aktivacijski pufer za merjenje aktivnosti katepsina X</u>	100 mM 0,1 % 5 mM 1,5 mM	Na-acetat, pH = 5,5 PEG 8000 L-cistein EDTA

3.1.5 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabljali pri eksperimentalnem delu magistrske naloge, je navedena v Preglednici V.

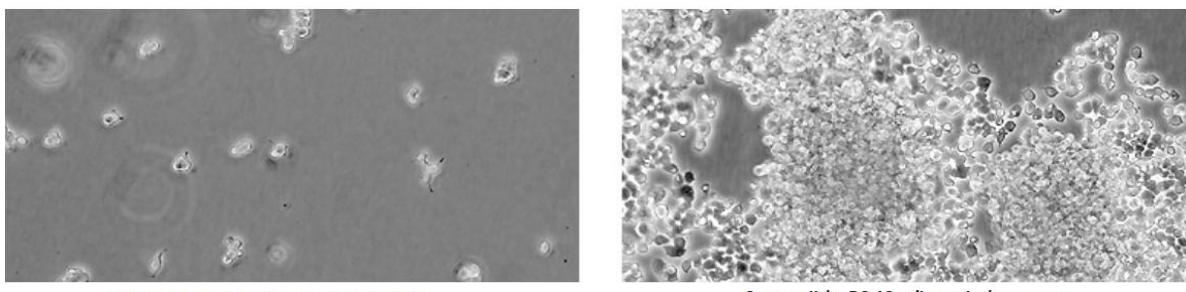
Preglednica V: Uporabljena laboratorijska oprema.

Oprema	Tip, proizvajalec, država
Analizna tehnica	AB104, Mettler-Toledo, Švica
Avtomatske pipete	e10 in e120, Biohit, Finska
Avtomatske večkanalne pipete	e1200, Biohit, Finska
Avtomatski spiralec mikrotitrskih ploščic	Wellwash Versa Microplate Washer, Thermo Scientific, ZDA
Celični inkubator CO ₂ CB 210	Binder, Nemčija
Centrifuga	Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific, ZDA
Centrifugirke (15 mL)	Sigma-Aldrich, ZDA
Čitalec mikrotitrskih ploščic (spektrofotometer)	TECAN Safire 2, Švica
Čitalec mikrotitrskih ploščic (spektrofotometer)	BIOTEK, ZDA
Gojiščne plostenke	TPP Tissue Culture Flasks; 25 cm ² , 75 cm ² , Sigma-Aldrich, ZDA
Gojiščne ploščice	TPP; s 96 vdolbinicami, s 6 vdolbinicami,

	Sigma-Aldrich, ZDA
Hladilnik (+4°C)	Gorenje, LTH, Slovenija
Invertni mikroskop	Nikon TMS-F, Japonska
Komora z laminarnim pretokom zraka	PIO SMBC 183, PIO LFVP9; Iskra, Slovenija
Konično mešalo (vortex)	Vibromix 104EV, Tehnica, Slovenija
Magnetno mešalo	Rotamix 550 MM, Tehnica; Heidolph Polymax 1040, Slovenija
Mikrocentrifugirke (epice)	Sarstedt, Nemčija
Mikrotitrská ploščica (črna) za fluorogeni substrat	Thermo Scientific, ZDA
Mikrotitrská ploščica za test ELISA in metodo po Lowry-ju	Thermo Scientific, ZDA
Mini centrifuga	Capsulefuge PMC-060, Tomy, Biosurplus, ZDA
Mini centrifuga	IKA mini G, IKA Centrifuges, Nemčija
Nastavki za pipete	Biosphere, Nemčija
Objektno steklo	Thermo Scientific, Menzel Gläser, ZDA
pH meter	HANNA HI9321 microprocessor pH meter, ZDA
Ploščica za štetje celic	Tiefe Depth Profounder 0,100 mm 0,0025 mm ² , THOMA, Nemčija
Polavtomatske pipete	0,2-2 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, Eppendorf, Biohit, Nemčija
Posoda s tekočim dušikom	Labmode Ltd, Velika Britanija
Pretočni citometer	Attune NxT, Thermo Fisher, ZDA
Suhi inkubator	WTB Binder, Nemčija
Stresalnik	VWR, ZDA
Ultrazvočna kadička	Sonis3, Iskra PIO, Slovenija
Vodna kopel (37 °C)	Keison Products, Velika Britanija
Zamrzovalnik (-20°C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80°C)	VIP series -86°C, Sanyo, ZDA

3.1.6 Vzorci

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali lizate nediferenciranih celic PC-12. Celična linija PC-12 izhaja iz tumorja nadledvične žleze (feokromocitom) podgane. Celice PC-12 (ATCC® CRL-1721™) so sposobne sintetizirati in shranjevati dopamin in noradrenalin, poleg tega pa jih je mogoče spodbuditi, da le-ta v določeni meri tudi sproščajo. Po drugi strani niso zmožne proizvajati adrenalina. Suspenzijske celice PC-12 so nagnjenje k agregaciji in plavajo v mediju (Slika 5). Po inkubaciji z živčnim rastnim dejavnikom (NGF), so celice PC-12 sposobne tvoriti nevrite (izrastke). Celična linija PC-12 je uporabna za preučevanje celične proliferacije, diferenciacije in preživetja - kot model živčnih celic (33).



Slika 5: Morfologija suspenzijskih celic PC-12; povzeto po (33).

3.2 Metode

3.2.1 Delo s celično linijo PC-12

3.2.1.1 Odmrzovanje celic

Kriovialo celic PC-12, ki je bila zamrznjena v tekočem dušiku na temperaturi -196 °C, smo odtajali v vodni kopeli s temperaturo 37 °C. Odmrznjene celice smo resuspendirali v 8 mL predhodno ogretega kompletnega gojišča RPMI in nato v centrifugirki 5 minut centrifugirali pri 271g. Supernatant smo zavrgli, sedimentirane celice pa ponovno resuspendirali v svežem gojišču ter jih prenesli v posodo za gojenje celic. Sveže gojišče smo pred uporabo v vodni kopeli segreli na 37 °C.

3.2.1.2 Gojenje in subkultivacija celic

Gojenje celic poteka v sterilnem okolju. Celično linijo PC-12 smo gojili v obliki suspenzijske celične kulture v sterilni gojiščni plastenki površine 75 cm². Celice so se razmnoževale v celičnem inkubatorju s temperaturo 37 °C in 5 % CO₂. Ko so dosegle ustrezeno gostoto (70 –

80 %) smo jih redčili s postopkom subkultivacije. Najprej smo celično kulturo PC-12 prenesli v sterilno centrifugirko, nato smo 5 minut centrifugirali pri 271g. Supernatant smo zavrgli in celice resuspendirali v 1 mL svežega gojišča. Nato smo odvzeli vzorec celične suspenzije za štetje celic. Po končanem štetju, smo ustrezno količino celične suspenzije prenesli v gojiščno plastenko s 10-12 mL svežega gojišča. Ponavadi smo celice redčili 1:4 do 1:8. Preostanek celične suspenzije smo porabili za nadaljnje poskuse ali pa zavrgli. Celicam smo najmanj vsake 2 dni zamenjali gojišče.

3.2.1.3 Štetje celic

Celice štejemo pod svetlobnim mikroskopom s hemocitometrom. Celično suspenzijo smo glede na število celic redčili z rastnim gojiščem, odvzeli 20 µL in dodali 180 µL 0,2 % raztopine nigrozina ter nanesli na vsako stran objektnega stekelca s števno komoro. Pod invertnim mikroskopom smo prešteli neobarvane (žive) celice. Nigrozin obarva mrtve celice, ki jih ne upoštevamo. Število celic v 1 mL celične suspenzije izračunamo iz povprečnega števila preštetih celic z upoštevanjem redčenja s pomočjo naslednje enačbe:

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

N.....število celic na mL gojišča

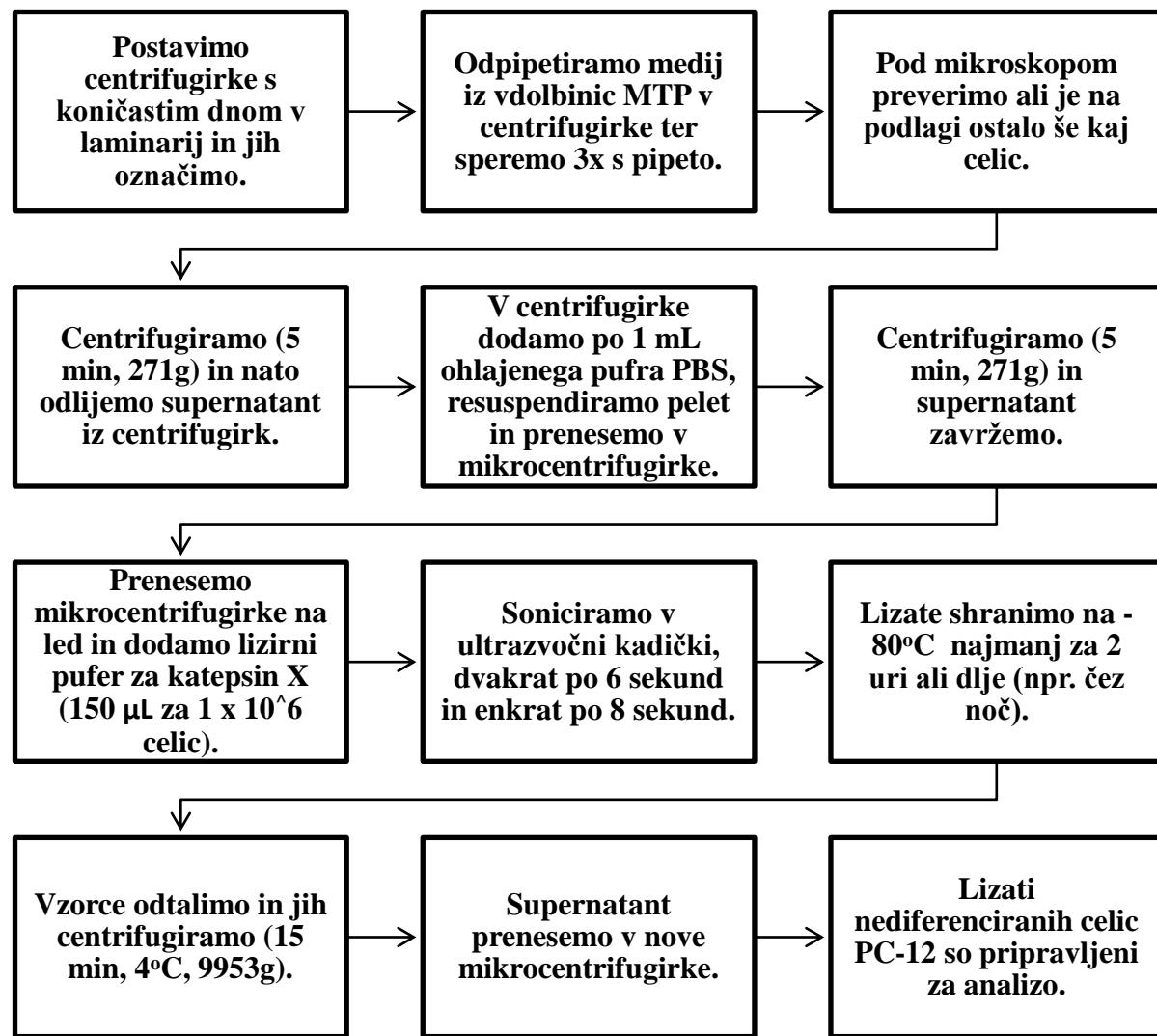
A,B..... število pod mikroskopom preštetih celic

R..... faktor redčenja

3.2.2 Priprava celičnih lizatov

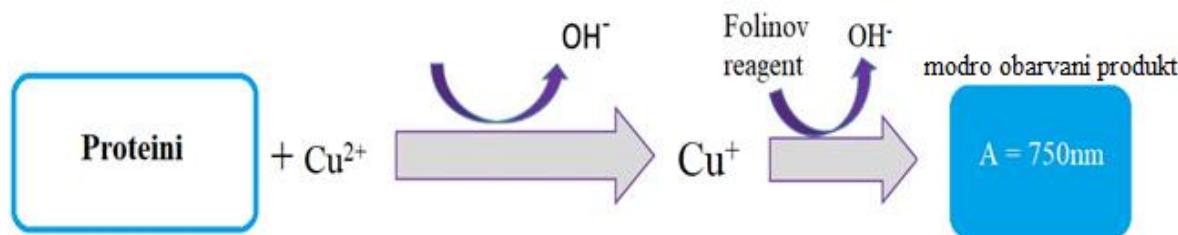
Po končani inkubaciji z amiloidom beta, smo lizate nediferenciranih celic PC-12 pripravili po shemi predstavljeni v Preglednici VI.

Preglednica VI: Shematski prikaz priprave celičnih lizatov.



3.2.3 Merjenje koncentracije celokupnih proteinov po Lowry-ju

Koncentracijo celokupnih proteinov smo določili z metodo po Lowry-ju. Ta test temelji na reakciji proteinov z alkalno raztopino bakrovega tartrata in Folinovim reagentom. V bazični raztopini proteini reagirajo z dvovalentnim bakrovim ionom, pri čemer nastane reducirani monovalentni ion. Stranske skupine triptofana, tirozina in cisteina skupaj z monovalentnim bakrovim ionom reagirajo s Folinovim reagentom. Nastale reducirane spojine imajo značilno modro barvo z maksimalno absorbanco pri valovni dolžini 750 nm (slika 6) (34).



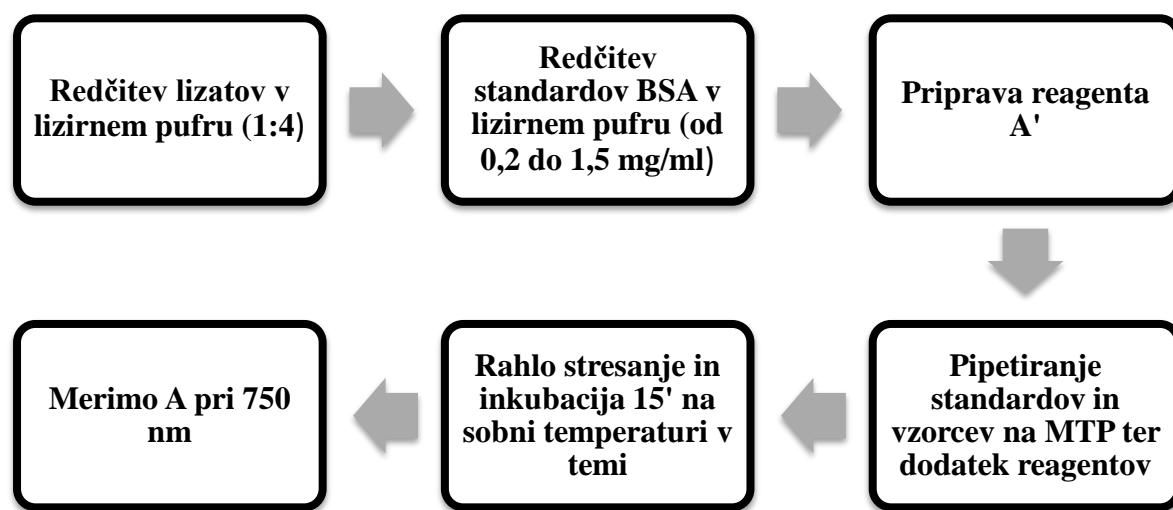
Slika 6: Princip metode določanja proteinov po Lowry-ju; pritejeno po (34).

Izvedba metode:

Za določanje koncentracije celokupnih proteinov smo uporabili komplet reagentov Bio-Rad DC Protein Assay, ki vsebuje reagent A (bazična raztopina bakrovega tartrata), reagent B (Folinov reagent) in reagent S (natrijev dodecilsulfat).

Najprej smo celične lizate redčili v lizirnem pufru v razmerju 1:4. Standardne raztopine govejega serumskega albumina (BSA) za izdelavo standardne krivulje smo pripravili v lizirnem pufru v različnih koncentracijah (od 0,2 do 1,5 mg/mL). Reagent A' smo pripravili z mešanjem reagenta A in S v razmerju 1:50. Najprej smo na mikrotitrsko ploščico (MTP) s 96 vdolbinicami v triplikatih nanesli po 5 μL standardov/vzorcev. Nato smo dodali po 25 μL reagenta A' in na koncu še 200 μL reagenta B. Mikrotitrsko ploščico smo rahlo pretresli in 15 minut inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Absorbanco smo izmerili pri valovni dolžini 750 nm. Iz standardne krivulje smo izračunali koncentracijo celokupnih proteinov v celičnih lizatih (Preglednica VII).

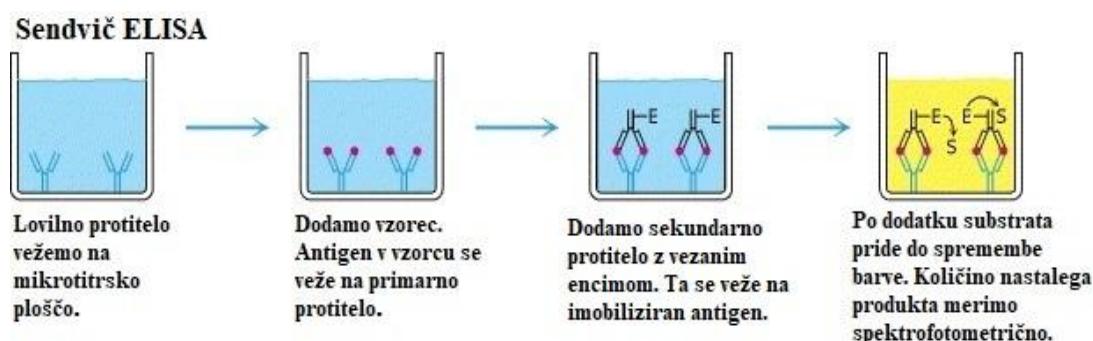
Preglednica VII: Shematski prikaz metode za določanje celokupnih proteinov po Lowry-ju.



3.2.4 Encimsko imunski test ELISA

Encimsko imunski test ELISA (angl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je visoko specifična in občutljiva metoda, ki jo uporabljamo za detekcijo antigenov ali specifičnih protiteles v vzorcu. Temelji na interakciji antigen-protitelo. Poznamo več različic ELISA testa, ki omogočajo kvalitativno ali kvantitativno določanje antigenov ali protiteles. Za kvantitativno določanje antigenov v vzorcu uporabljamo neposredni in sendvič ELISA test, medtem ko za določanje specifičnih protiteles uporabljamo posredni ELISA test (35).

Za določanje katepsina X in cistatina C v celičnih lizatih smo uporabili test sendvič ELISA. Test je dobil ime zaradi prisotnosti preiskovanega analita med dvema protitelesoma – lovilnim in detekcijskim protitelesom (Slika 7).



Slika 7: Princip testa sendvič ELISA; prizjeno po (36).

Izvedba testa:

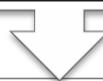
Za detekcijo katepsina X in cistatina C smo najprej prekrili MTP z lovilnimi protitelesi (kozja protitelesa proti (pro)catepsinu X in kunčja protitelesa proti cistatinu C). Lovilna protitelesa smo redčili v pufru A v skladu s preračunanimi koncentracijami. V vdolbinice smo napijetitali $50 \mu\text{L}$ pripravljene raztopine in pustili čez noč v hladilniku na $+4^\circ\text{C}$. Naslednji dan smo blokirali nevezana mesta na MTP s pufrom C. Po 30 minutah smo v vdolbinice dodali $75 \mu\text{L}$ standardov in vzorcev ter inkubirali dve uri v inkubatorju pri 37°C . Detekcijska protitelesa smo redčili v pufru C in dodali po $100 \mu\text{L}$ v vsako vdolbinico. Detekcijska protitelesa so bila konjugirana s hrenovo peroksidazo, ki pretvorí substrat v barvni produkt. Po dveh urah inkubacije z detekcijskimi protitelesi na 37°C , smo dodali po $200 \mu\text{L}$ substrata TMB, ki smo ga predhodno redčili v pufru za TMB. MTP smo prekrili s folijo in 20 minut inkubirali v temi na sobni temperaturi. Nato smo v vsako vdolbinico dodali $50 \mu\text{L}$ $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ in tako zaustavili encimsko reakcijo. Nastal je produkt rumene barve, ki smo ga kvantificirali

spektrofotometrično pri valovni dolžni 450 nm. Na podlagi izmerjenih vrednosti absorbanc posameznega vzorca in umeritvene krivulje, ki smo jo določili s pomočjo izmerjenih vrednosti standardov, smo izračunali koncentracijo katepsina X in cistatina C v posameznem vzorcu. V Preglednici VIII je prikazana natančna shema izvedbe testa ELISA.

Preglednica VIII: Shematski prikaz izvedbe testa ELISA.

Prekrivanje mikrotitrsko ploščice s kozjimi pAb proti catX/kunčjimi pAb proti cistatinu C v pufru A

50 µL, čez noč v hladilniku na +4 °C



Spiranje mikrotitrsko ploščice na avtomatskem spiralniku (**3x, pufer B**) in sušenje z udarjanjem na papirju



Blokiranje nevezanih mest na MTP s pufrom C

150 µL, sobna T, 30 min



Odlitev pufra C in sušenje z udarjanjem

Priprava standardov in lizatov v pufru C

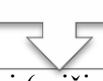


Inkubiranje z antigeni iz vzorca in standardi padajočih koncentracij

75 µL, inkubacija 2 h, 37°C



Spiranje mikrotitrsko ploščice na avtomatskem spiralniku (**3x, pufer B**)



Inkubiranje s konjugiranimi protitelesi (mišja protitelesa 1A2-HRP proti cistatinu C /mišja protitelesa 3B10-HRP proti katepsinu X)

100 µL, inkubacija 2 h, 37°C



Spiranje mikrotitrsko ploščice na avtomatskem spiralniku (**3x, pufer B**)

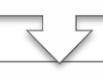


Razvijanje s substratom TMB

Redčenje s substratnim pufrom 1:1, 200 µL, sobna T, tema, 20 min



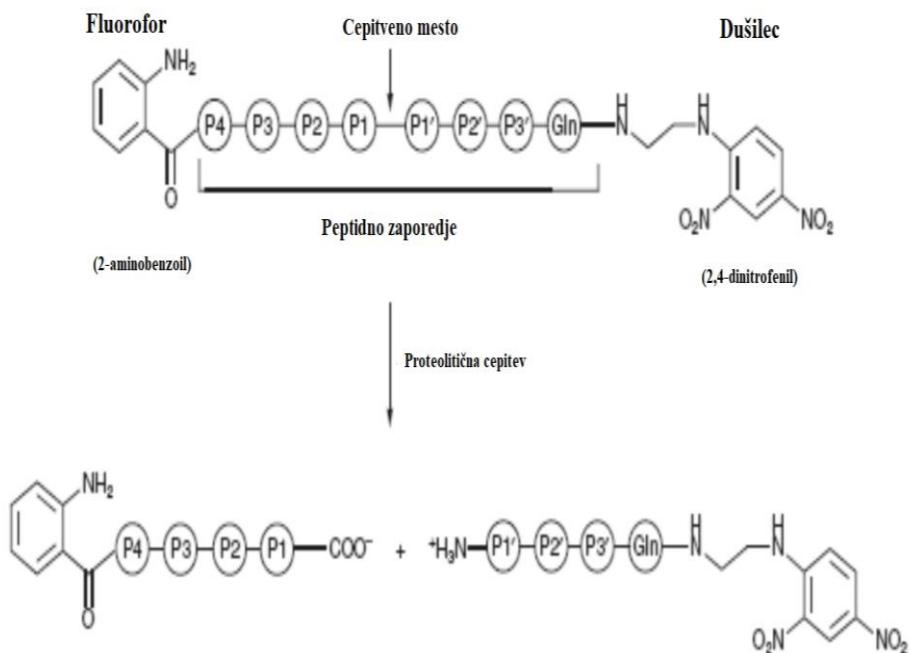
Zaustavitev reakcije s 50µL 2 M H₂SO₄



Merjenje absorbance pri 450 nm

3.2.5 Merjenje aktivnosti katepsina X (metoda s fluorogenim substratom)

Merjenje aktivnosti katepsina X temelji na razgradnji specifičnega substrata Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH. Pri tej metodi je substrat za katepsin X sestavljen iz oligopeptida, ki vsebuje cepitveno mesto, fluorofor, ki fluorescira in dušilec, ki absobira emitirano energijo fluorofora. Po cepitvi substrata se poveča razdalja med fluoroforom in dušilcem, kar zaznamo kot porast fluorescence (slika 8) (37).



Slika 8: Princip določanja encimske aktivnosti z uporabo fluorogenih substratov; prizadeno po (37).

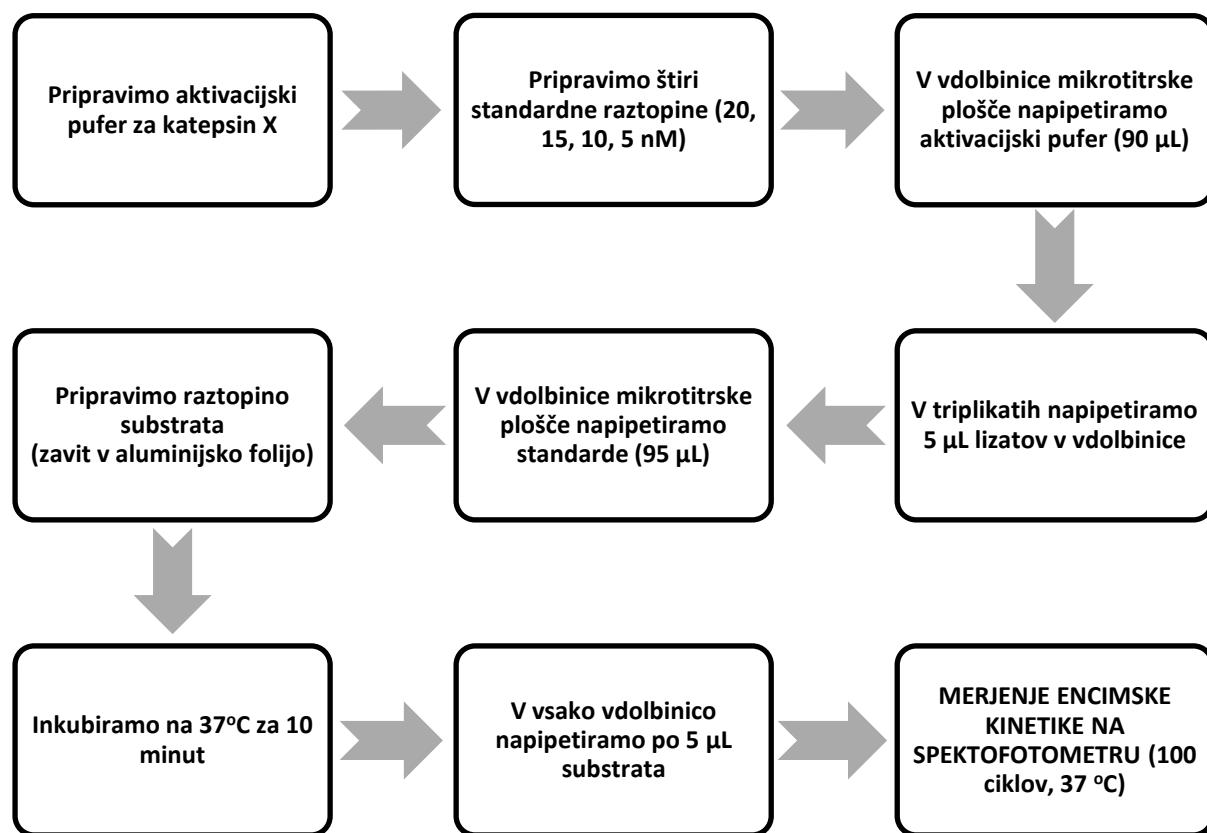
Izvedba metode:

Za določanje aktivnosti katepsina X smo najprej pripravili aktivacijski pufer. Potrebovali smo štiri standardne raztopine z različnimi koncentracijami katepsina X (20, 15, 10 in 5 nM) in raztopino substrata. V lizatih nediferenciranih celic PC-12, ki smo jih gojili v prisotnosti amiloida beta, smo izmerili aktivnost katepsina X v črni mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami.

V vsako vdolbinico, kamor smo v triplikatih nanašali vzorce, smo najprej napijetirali 90 µL aktivacijskega pufra. Nato smo dodali 5 µL lizata. V vdolbinice za standard, smo kasneje dodali 95 µL standardnih raztopin. Tik pred merjenjem smo v vsako vdolbinico napijetirali 5 µL raztopine substrata.

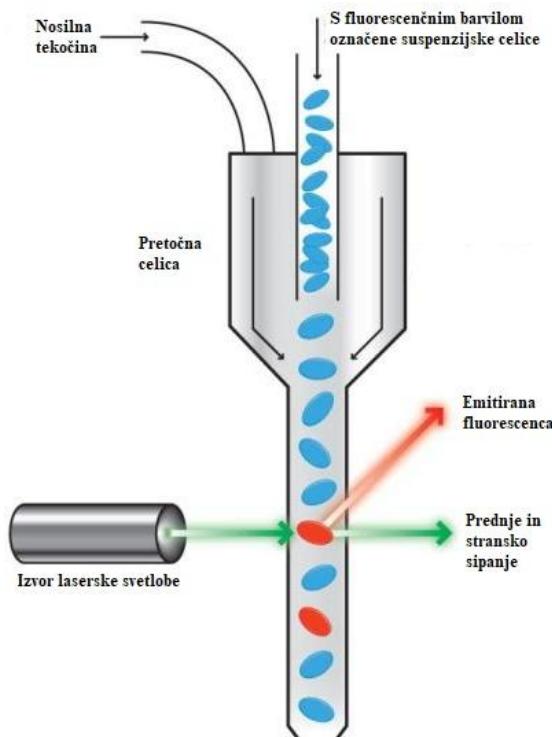
Nastajanje fluorescenčnega produkta smo nato kontinuirano merili pri valovni dolžini 420 nm. Vzbujevalna valovna dolžina je bila 320 nm. Temperatura znotraj spektrofotometričnega čitalca plošč je bila 37 °C. Meritev smo po 100 ciklih zaustavili. Aktivnost katepsina X v lizatih smo podali kot naklon linearne dela krivulje spremembe intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa (Preglednica IX). Rezultate smo normalizirali na celokupne proteine.

Preglednica IX: Shematski prikaz metode za določanje aktivnosti katepsina X.



3.2.6 Določanje deleža mrtevih celic s pomočjo pretočne citometrije

Pretočna citometrija je tehnika s katero analiziramo številne strukturne in funkcije lastnosti celic. Suspenzijske celice potujejo ena za drugo skozi kapilaro pretočnega citometra mimo izvora svetlobe (slika 9). Ko laserski žarek zadane ob celico se odbije, lomi in/ali absorbira. Signali, ki jih odda posamezna celica, so odvisni od njenih lastnosti in samega označevanja. Fotodetektorji zberejo oddano svetlobo in jo spremenijo v električni signal (38).



Slika 9: Shema pretočnega citometra; prijejeno po (39).

Za analizo celične smrti smo uporabili pretočni citometer s fluorescenčnim detektorjem. Ta zazna predhodno označene celice s fluorescentnim barvilkom ali s specifičnim protitelesom, konjugiranim s fluorokromom. Fluorokrom absorbira svetlubo, kar povzroči prehod elektronov v vzbujeno stanje. Ob prehodu nazaj v osnovno stanje, fluorokrom odda svetlubo z večjo valovno dolžino kot je valovna dolžina vzbujevalne svetlobe. Za določanje deleža mrtvih celic smo uporabili propidijev jodid (PI), ki se vgradi le v DNA mrtvih celic. PI ne more pasivno prehajati v celice, ki imajo nepoškodovano plazemsko membrano. Vezan PI detektiramo s pretočno citometrijo kot rdečo fluorescenco (40).

Izvedba testa:

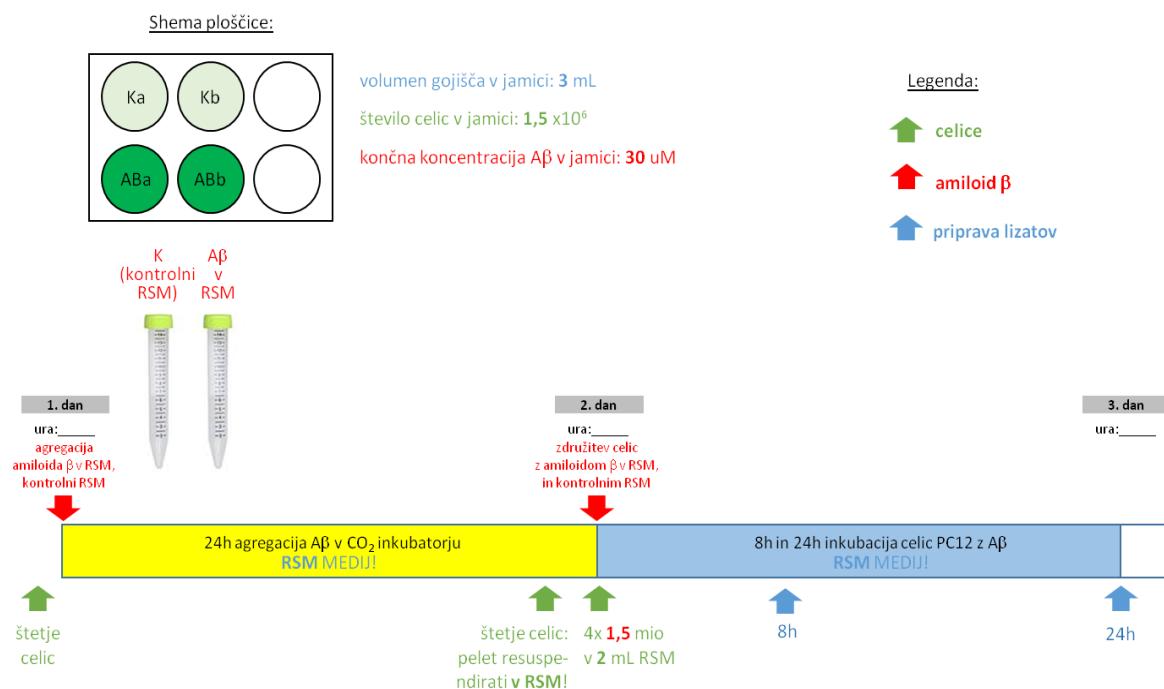
Celice PC-12 smo gojili skupaj z $A\beta_{25-35}$. Po 8 in 24-urni inkubaciji smo celice prenesli v centrifugirke in jih centrifugirali 5 min pri 271g. Supernatant smo zavrgli in celice sprali z 2 mL toplega PBS pufra. Nato smo celice prešteli in jih ponovno centrifugirali 5 minut pri 271g. Odstranili smo supernatant in celice suspendirali v 750 μ L PBS pufra, nato pa dodali 15 μ L PI. Vzorce smo nato inkubirali 15 minut pri 37°C. Meritev je potekala na pretočnem citometru Attune NxT. Rezultate smo analizirali s programsko opremo FlowJo. Kot kontrolo smo uporabili celice, ki niso bile gojene skupaj z $A\beta_{25-35}$.

3.2.7 Statistična obdelava rezultatov

Podatke (koncentracija celokupnih proteinov, vrednost cistatina C, množina aktivnega katepsina X, vrednost celokupnega katepsina X v lizatih ter delež mrtvih celic) smo analizirali s pomočjo programov Microsoft Excel 2013 in GraphPad Prism 7. Rezultate smo podali kot povprečno vrednost posameznih neodvisnih poskusov in relativni standardni odklon (RSD). Za statistično vrednotenje podatkov smo uporabili Studentov t-test za dva neodvisna vzorca, pri čemer smo podali p-vrednosti bodisi na izhodne bodisi na povprečne vrednosti rezultatov. Razliko med kontrolami in vzorci smo upoštevali za statistično značilno, če je bila vrednost p manjša od 0,05 ($p<0,05$).

4. KRATEK OPIS EKSPERIMENTALNEGA DELA

Celice PC-12 smo gojili v mikrotitrski ploščici s 6 jamicami v duplikatih. A β_{25-35} smo predhodno agregirali v 2,5 mL gojišča RSM 24 ur pri 37 °C. V jamice smo nanesli po 1,5 x 10⁶ celic, resuspendiranih v 500 μ L RSM gojišča. V kontrolne jamice smo dodali 2,5 mL predinkubiranega gojišča RSM, v ostale jamice pa 2,5 mL gojišča RSM s predhodno agregiranim A β_{25-35} do končne koncentracije 30 μ M. Mikrotitrsko ploščo s celicami smo nato inkubirali 8 in 24 ur pri 37 °C v inkubatorju s 5 % CO₂ (slika 10).



Slika 10: Shema eksperimentalnega dela gojenja celic PC-12 z A β_{25-35} .

Celice smo gojili na dva različna načina, in sicer:

- Po **klasičnem postopku** – nepritrjene celice PC-12 so med inkubacijo mirovale.

Koncentracija A β_{25-35}	Časovni intervali
30 μ M	8 ur, 24 ur

- S **stalnim mešanjem** – nepritrjene celice PC-12 so se med gojenjem mešale na stresalniku.

Koncentracija A β_{25-35}	Časovni intervali
30 μ M	8 ur, 24 ur

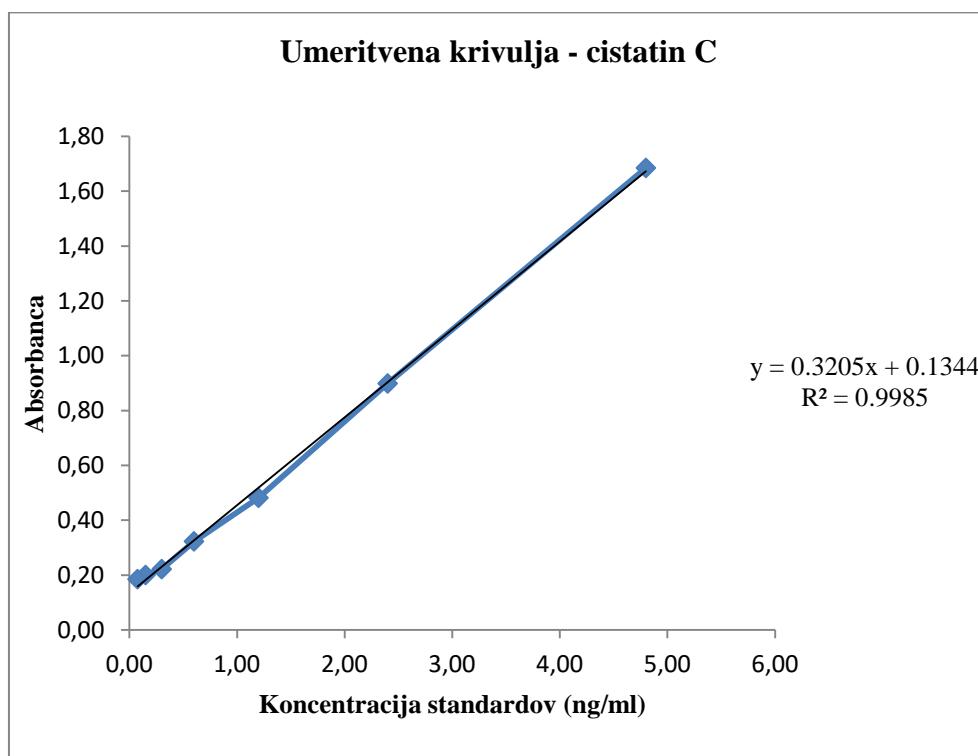
Po preteku inkubacije smo pripravili lizate celic iz posameznih jamic. Lizatom smo izmerili koncentracijo celokupnih proteinov z metodo po Lowry-ju, določili vrednost cistatina C s testom ELISA, izmerili aktivnost katepsina X z encimskim testom s fluorogenim substratom in določili vrednost celokupnega katepsina X s testom ELISA. V ločenem poskusu smo določili tudi delež mrtvih celic v kontrolnih jamicah in jamicah z A β ₂₅₋₃₅. Vse uporabljene metode so opisane v poglavju *Materiali in metode*.

-

5. REZULTATI

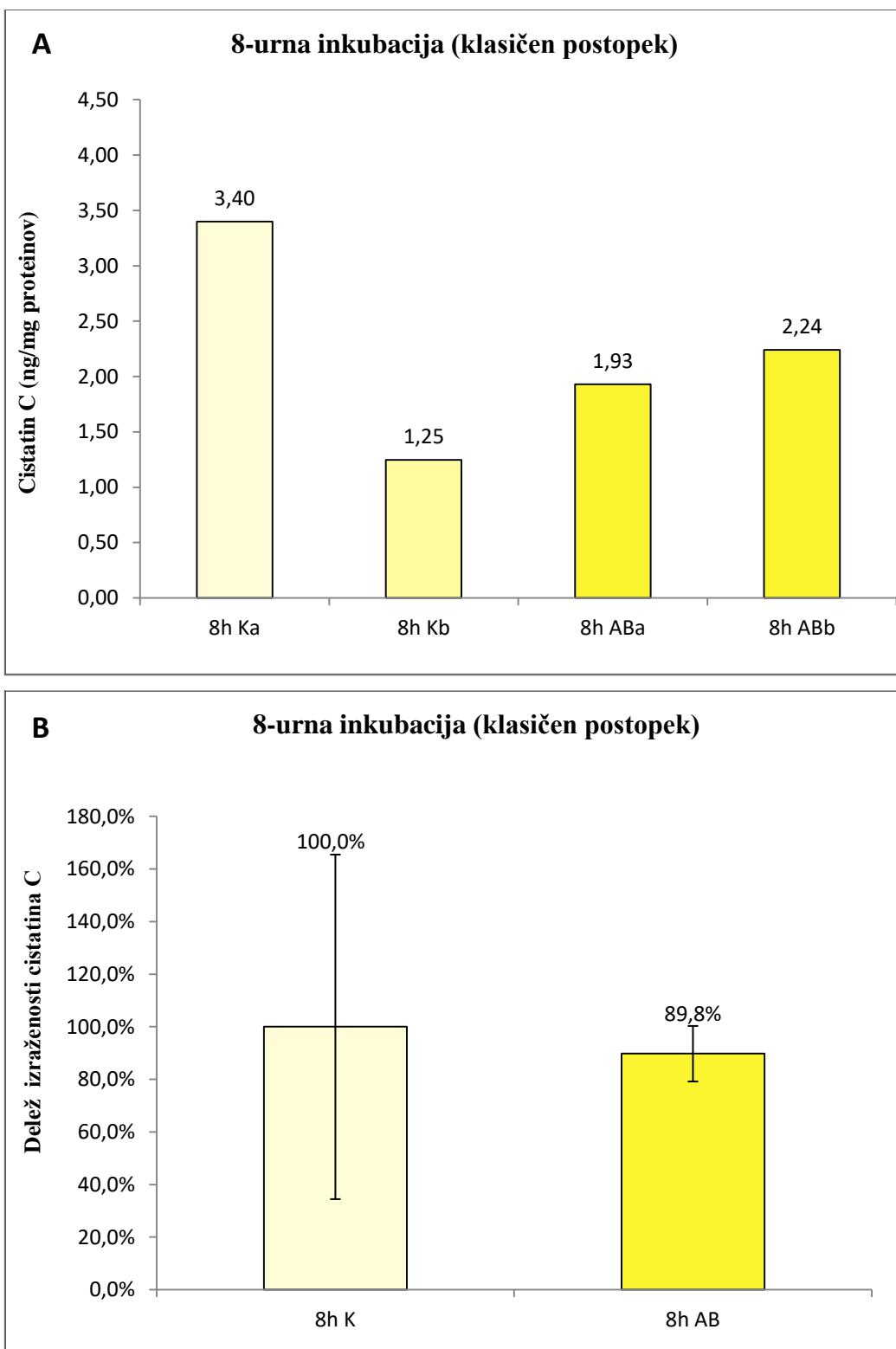
5.1 Izražanje cistatina C v celičnih lizatih nediferenciranih celic PC-12

Nediferencirane celice PC-12 smo gojili z A β ₂₅₋₃₅, pripravili celične lizate in jim izmerili koncentracijo cistatina C v dveh časovnih točkah, in sicer po 8 ter 24-urni inkubaciji. Za določanje cistatina C v celičnih lizatih smo uporabili test ELISA. Iz umeritvene krivulje standardnih raztopin rekombinantnega cistatina C (slika 11) smo določili koncentracijo cistatina C in jo preračunali na mg celokupnih proteinov v celičnem lizatu (graf A na slikah 12, 13, 14 in 15). Izražanje cistatina C smo primerjali s kontrolnimi celicami, ki niso bile izpostavljene A β ₂₅₋₃₅ in smo jim pripisali vrednost 100 % (graf B na slikah 12, 13, 14 in 15).

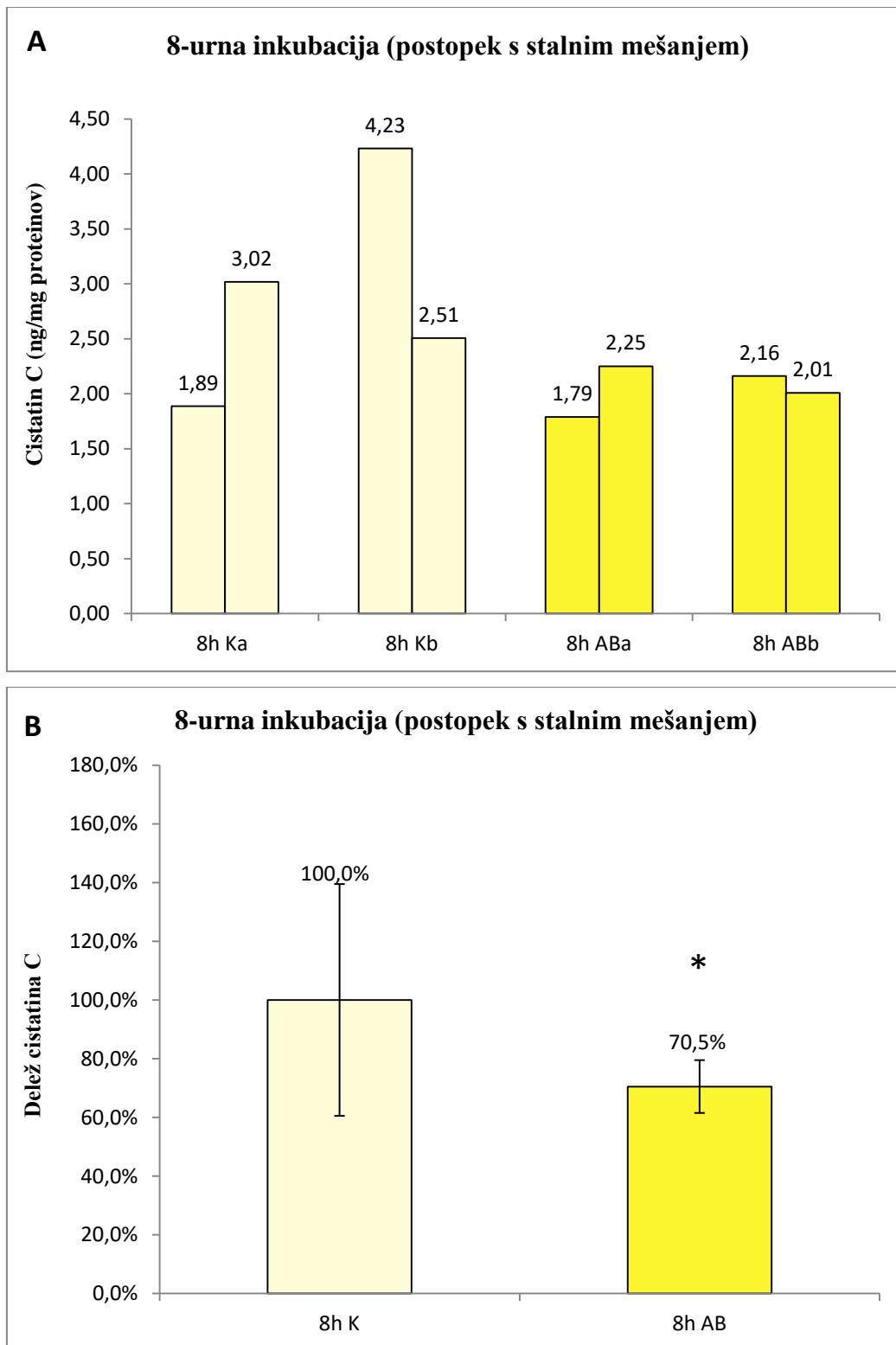


Slika 11: Umeritvena krivulja standardnih raztopin cistatina C. Na sliki je prikazana tudi enačba, ki predstavlja enačbo premice in R^2 , ki predstavlja Pearsonov koeficient korelacije.

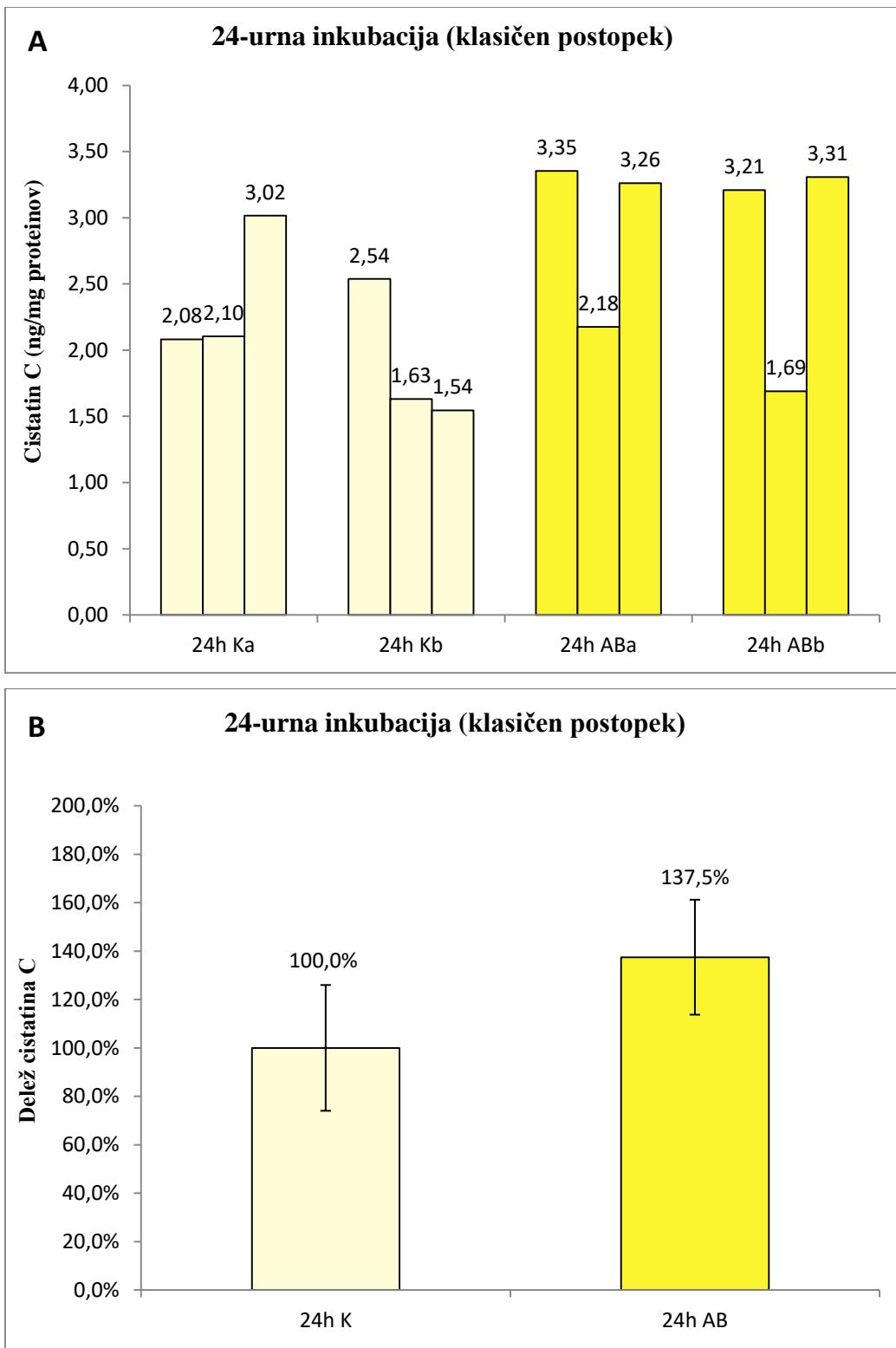
Vrednost cistatina C v celičnih lizatih se je po 8-urnem gojenju celic z A β ₂₅₋₃₅ po klasičnem postopku zmanjšala na 89,8 % ($p=0,8456$; slika 12), po 24-urnem gojenju pa se je povečala na 137,5 % ($p=0,0954$; slika 14). Vrednost cistatina C se je po 8-urnem gojenju z A β ₂₅₋₃₅ s stalnim mešanjem znižala na 70,5 % ($p=0,0369$; slika 13), po 24-urnem gojenju pa se je povečala na 159,1 % ($p=0,2420$; slika 15).



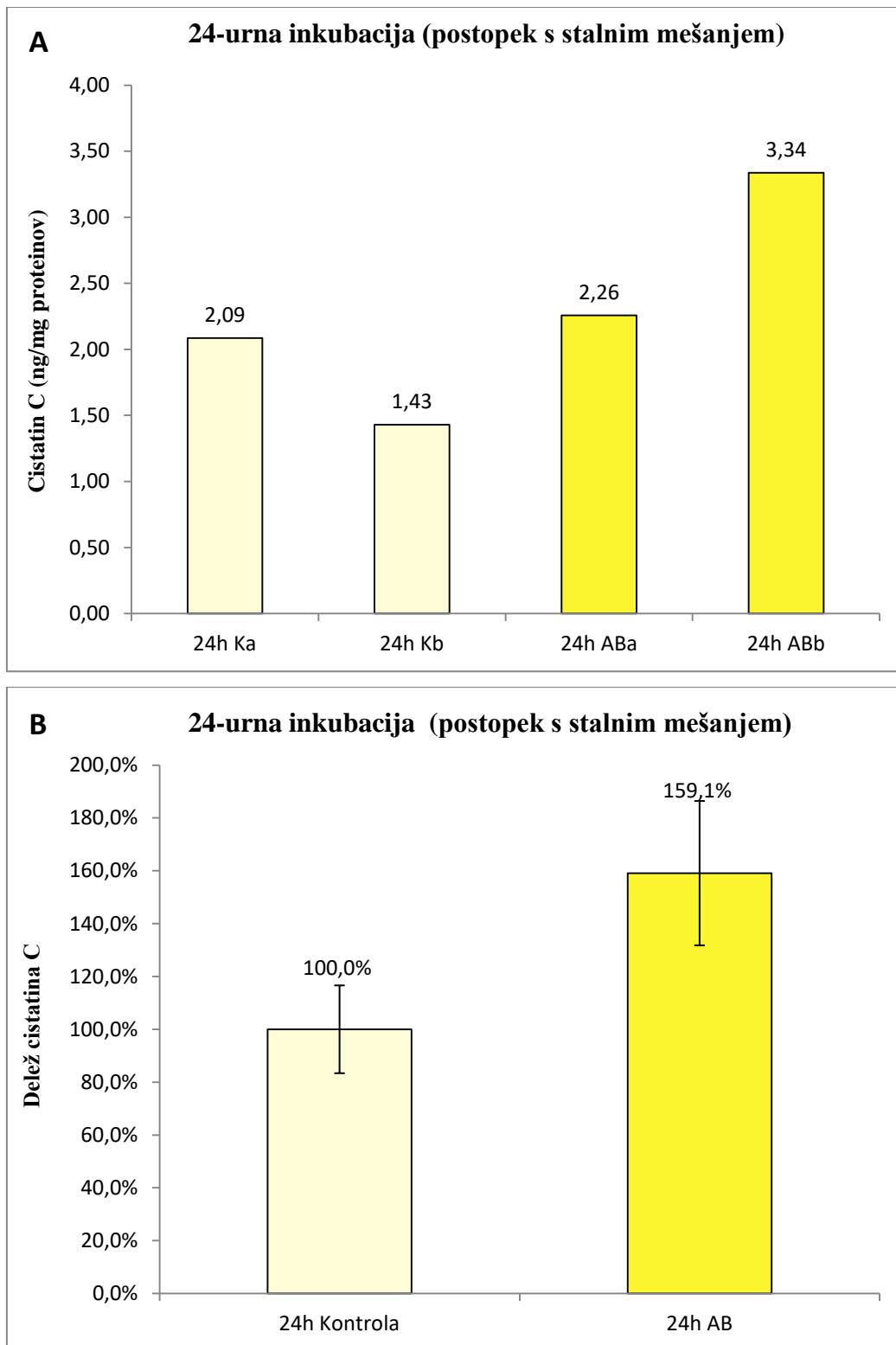
Slika 12: Vpliv $\text{A}\beta_{25-35}$ na izražanje gena za cistatin C v lizatih nediferenciranih celic PC-12 v časovni točki **8 h.** Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah. **A.** Vrednost cistatina C (ng) preračunana na mg celokupnih proteinov v lizatu. **B.** Povprečje vrednosti cistatina C, normalizirano na kontrolne celice (100 %) $\pm \text{RSD}$ ($p=0,8456$).



Slika 13: Izražanje cistatina C v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 8-urnem gojenju z $\text{A}\beta_{25-35}$ na stresalniku. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli dvakrat v dveh paralelkah. **A.** Vrednost cistatina C (ng) preračunana na mg celokupnih proteinov v lizatu. **B.** Povprečje vrednosti cistatina C, normalizirano na kontrolne celice (100 %) \pm RSD ($p=0,0369$).



Slika 14: Vpliv $\text{A}\beta_{25-35}$ na izražanje gena za cistatin C v lizatih nediferenciranih celic PC-12 v časovni točki 24 h. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli trikrat v dveh paralelkah. **A.** Vrednost cistatina C (ng) preračunana na mg celokupnih proteinov v lizatu. **B.** Povprečje vrednosti cistatina C, normalizirano na kontrolne celice (100 %) \pm RSD ($p=0,0954$).



Slika 15: Izražanje cistatina C v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 24-urnem gojenju z $\text{A}\beta_{25-35}$ na stresalniku. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah. **A.** Vrednost cistatina C (ng) preračunana na mg celokupnih proteinov v lizatu. **B.** Povprečje vrednosti cistatina C, normalizirano na kontrolne celice (100 %) \pm RSD ($p=0,2420$).

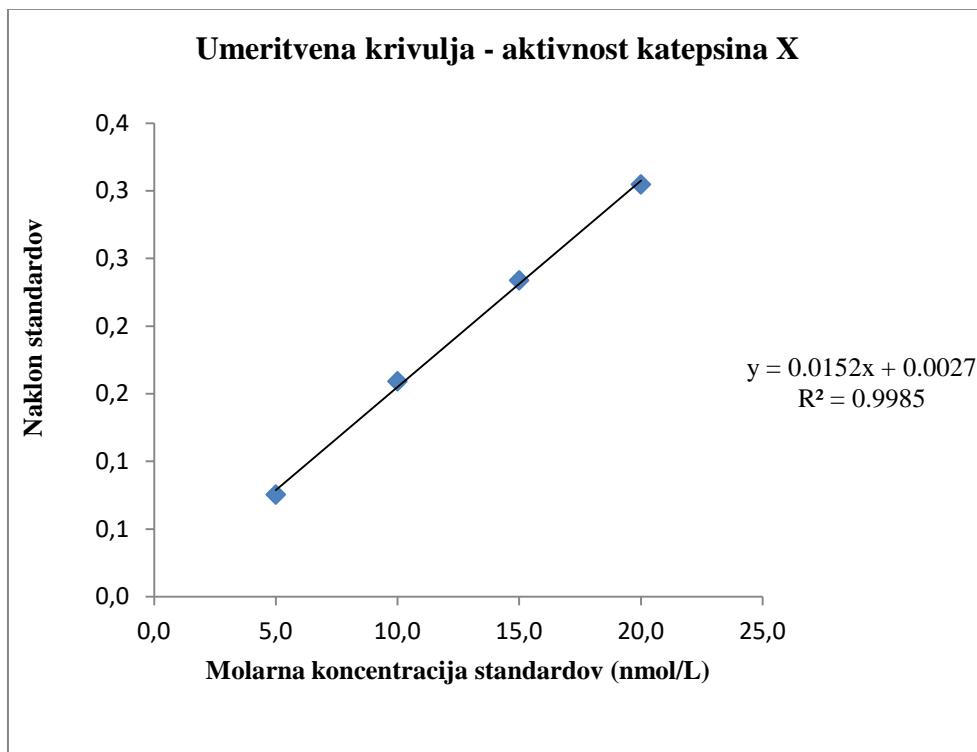
Čeprav način gojenja celic (po klasičnem postopku oz. po postopku s stalnim mešanjem) ni statistično značilno vplival na vrednosti cistatina C v celičnem lizatu, če primerjamo med seboj kontrolne celice oziroma celice, gojene z A β_{25-35} po obeh načinu gojenja, pa je viden trend povečevanja vrednosti cistatina C pri kontrolnih celicah po 8 urah stalnega mešanja (povprečna vrednost se je povečala iz 2,3 na 2,9 µg/mg protein) (Preglednica X).

Preglednica X: Primerjava vpliva klasičnega postopka in postopka s stalnim mešanjem na vrednost cistatina C v celičnem lizatu.

Vzorec	Vrednost cistatina C (ng/mg proteinov)		
	Gojenje celic po klasičnem postopku	Gojenje celic s stalnim mešanjem	p vrednost
8h Ka	3,4	2,45	0,6665
8h Kb	1,25	3,37	
8h ABa	1,93	2,02	0,8451
8h ABb	2,24	2,08	
24h Ka	2,40	2,09	0,4419
24h Kb	1,90	1,43	
24h ABa	2,93	2,26	0,9582
24h ABb	2,74	3,34	

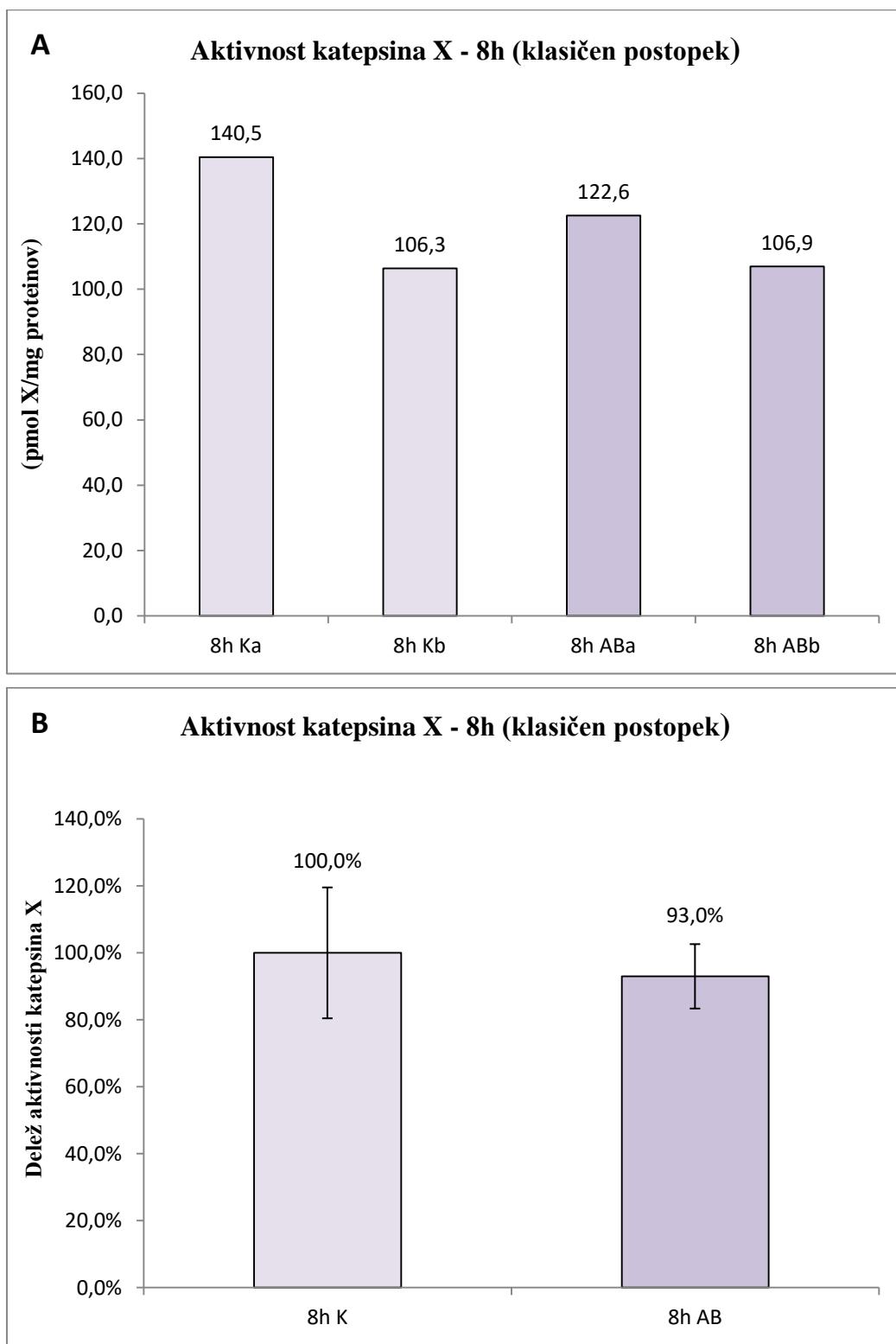
5.2 Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih nediferenciranih celic PC-12

V celičnih lizatih nediferenciranih celic PC-12, ki smo jih gojili 8 in 24 h z A β ₂₅₋₃₅, smo določili aktivnost katepsina X z uporabo fluorogenega substrata, specifičnim za katepsin X. Iz izmerjenih fluorescenc standardnih raztopin smo izrisali standardno krivuljo (slika 16), določili aktivnost katepsina X in aktivnost preračunali na mg celokupnih proteinov (graf A na slikah 17, 18, 19 in 20). Aktivnost katepsina X smo primerjali z aktivnostjo v kontrolnih celicah, ki niso bile izpostavljene A β ₂₅₋₃₅ in jim pripisali vrednost 100 % (graf B na slikah 17, 18, 19 in 20).

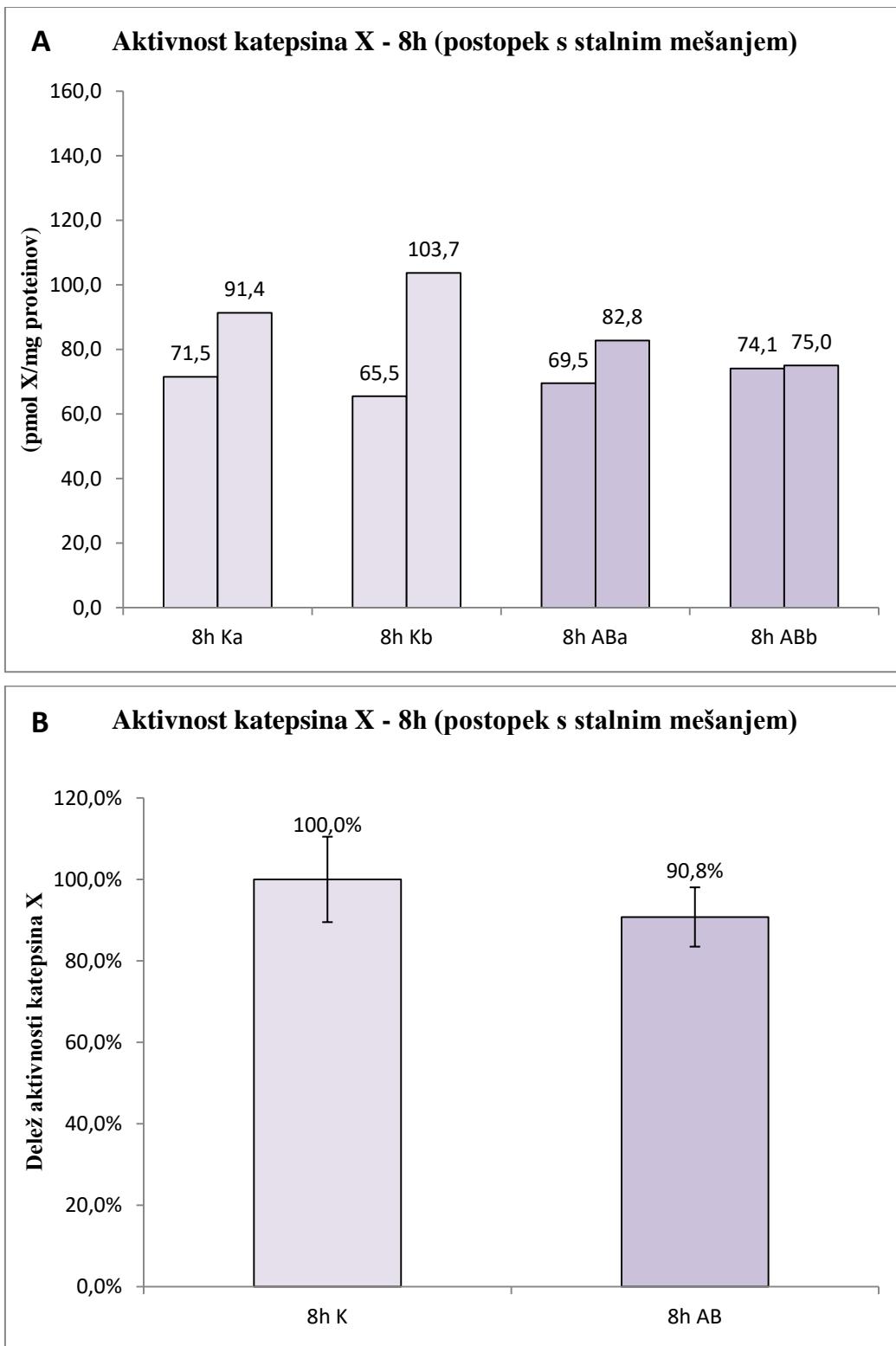


Slika 16: Grafični prikaz umeritvene krivulje za aktivnost katepsina X. Na sliki je prikazana tudi enačba, ki predstavlja enačbo premice in R^2 , ki predstavlja Pearsonov koeficient korelacije.

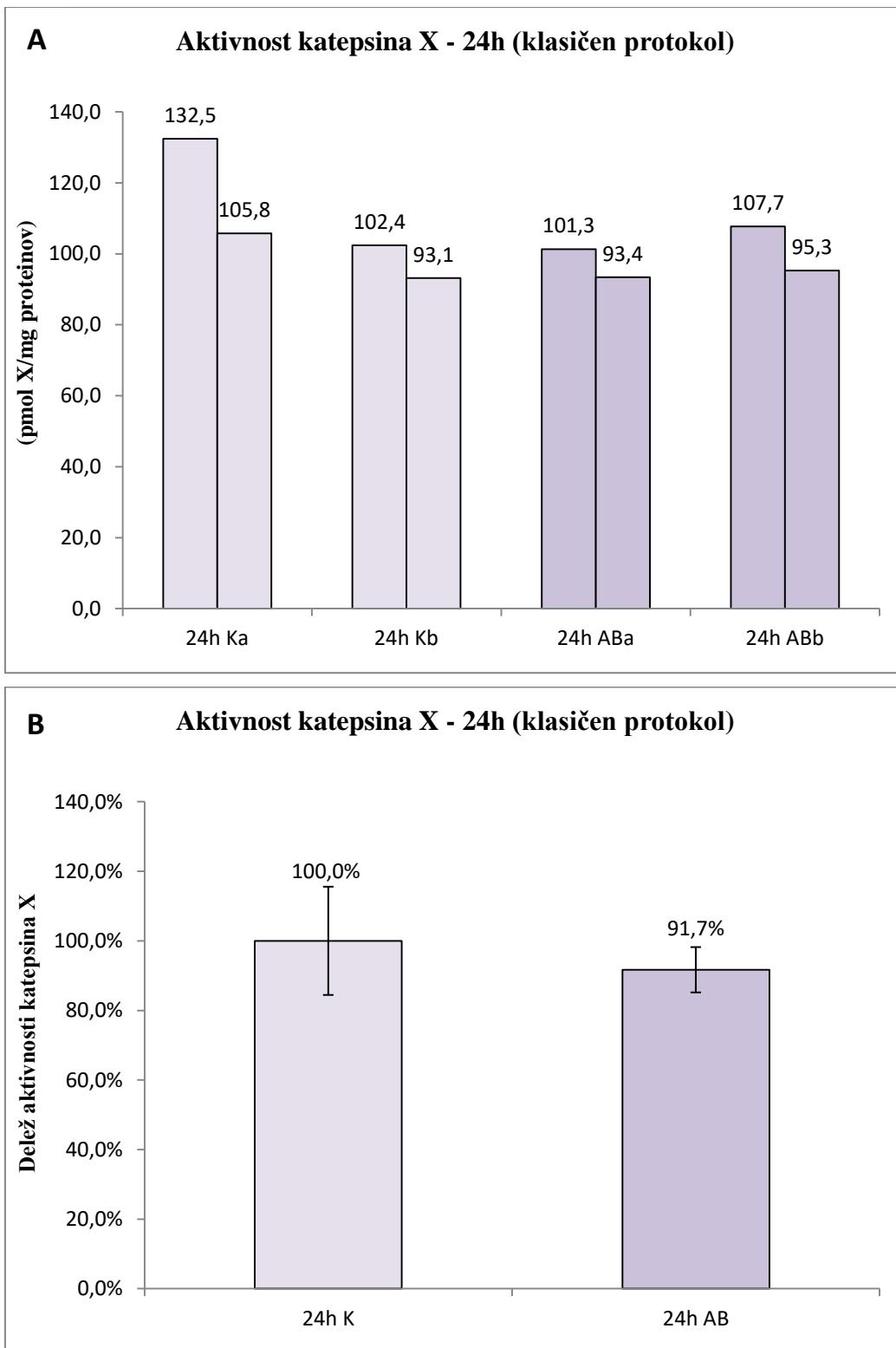
Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih se po 8-urnem gojenju celic z A β ₂₅₋₃₅ po klasičnem postopku je zmanjšala na 93 % ($p=0,6909$; slika 17), po 24-urnem gojenju celic pa na 91,7 % ($p=0,3372$; slika 19). Aktivnost katepsina X se je po 8-urnem gojenju celic z A β ₂₅₋₃₅ s stalnim mešanjem znižala na 90,8 % ($p=0,6593$; slika 18), po 24h gojenju pa je bila aktivnost katepsina X 98,5 % ($p=0,8027$; slika 20).



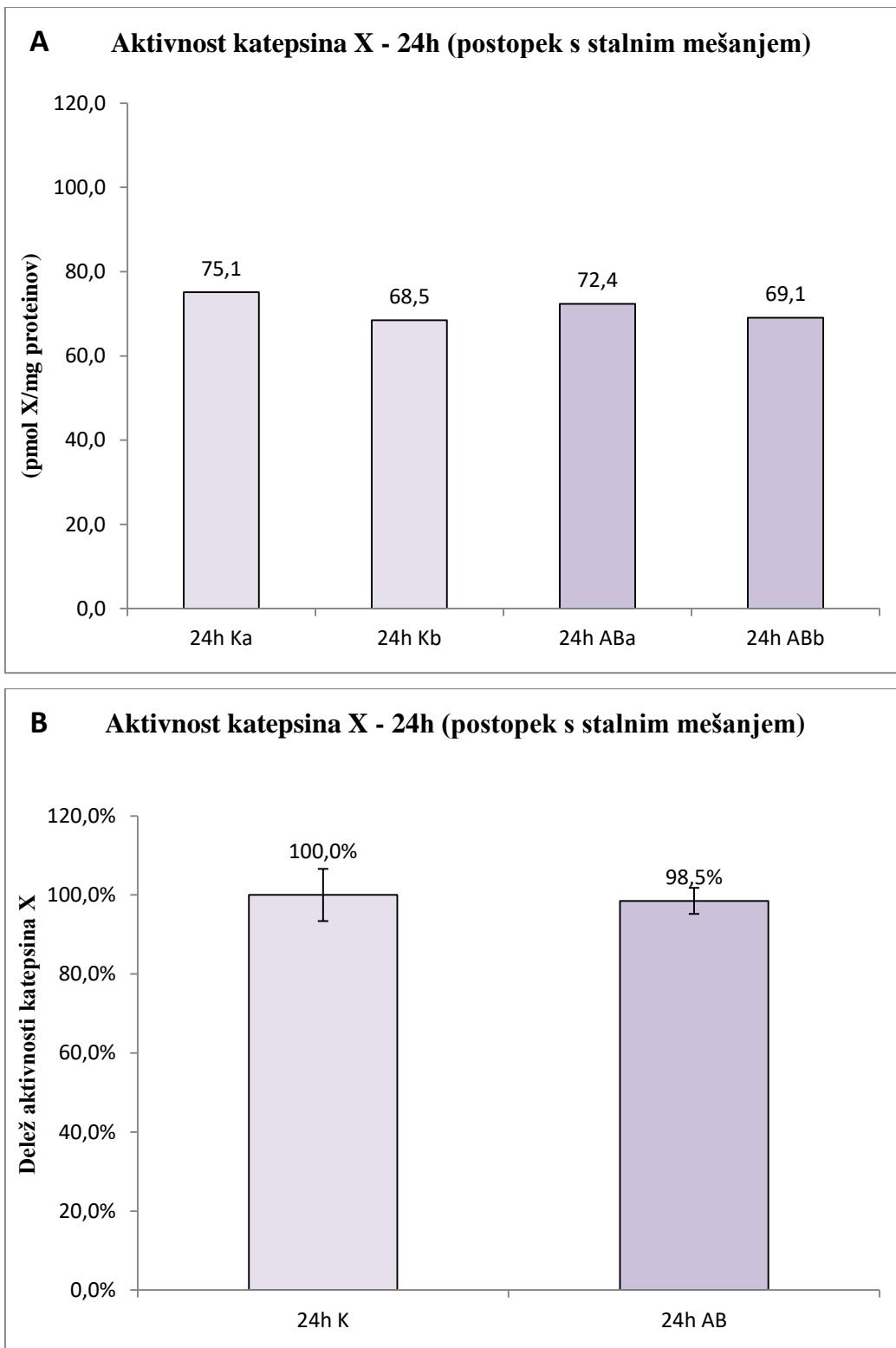
Slika 17: Aktivnost katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 8-urni inkubaciji z $\text{A}\beta_{25-35}$. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah. A. Množina aktivnega katepsina X (pmol) preračunana na mg celokupnih proteinov v lizatu. B. Povprečje množine aktivnega katepsina X, normalizirano na kontrolne celice (100 %) \pm RSD ($p=0,6909$).



Slika 18: Aktivnost katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 8-urni inkubaciji z $\text{A}\beta_{25-35}$ na stresalniku. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli dvakrat v dveh paralelkah **A.** Množina aktivnega katepsina X (pmol) preračunana na mg celokupnih proteinov v lizatu. **B.** Povprečje množine aktivnega katepsina X, normalizirano na kontrolne celice (100 %) \pm RSD ($p=0,6593$).



Slika 19: Aktivnost katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 24-urni inkubaciji z $\text{A}\beta_{25-35}$. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli dvakrat v dveh paralelkah. **A.** Množina aktivnega katepsina X (pmol) preračunana na mg celokupnih proteinov v lizatu. **B.** Povprečje množine aktivnega katepsina X, normalizirano na kontrolne celice (100 %) \pm RSD ($p=0,3372$).



Slika 20: Aktivnost katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 24-urni inkubaciji z $\text{A}\beta_{25-35}$ na stresalniku. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli enkrat v dveh paralelkah. **A.** Množina aktivnega katepsina X (pmol) preračunana na mg celokupnih proteinov v lizatu. **B.** Povprečje množine aktivnega katepsina X, normalizirano na kontrolne celice (100 %) \pm RSD ($p=0,8027$).

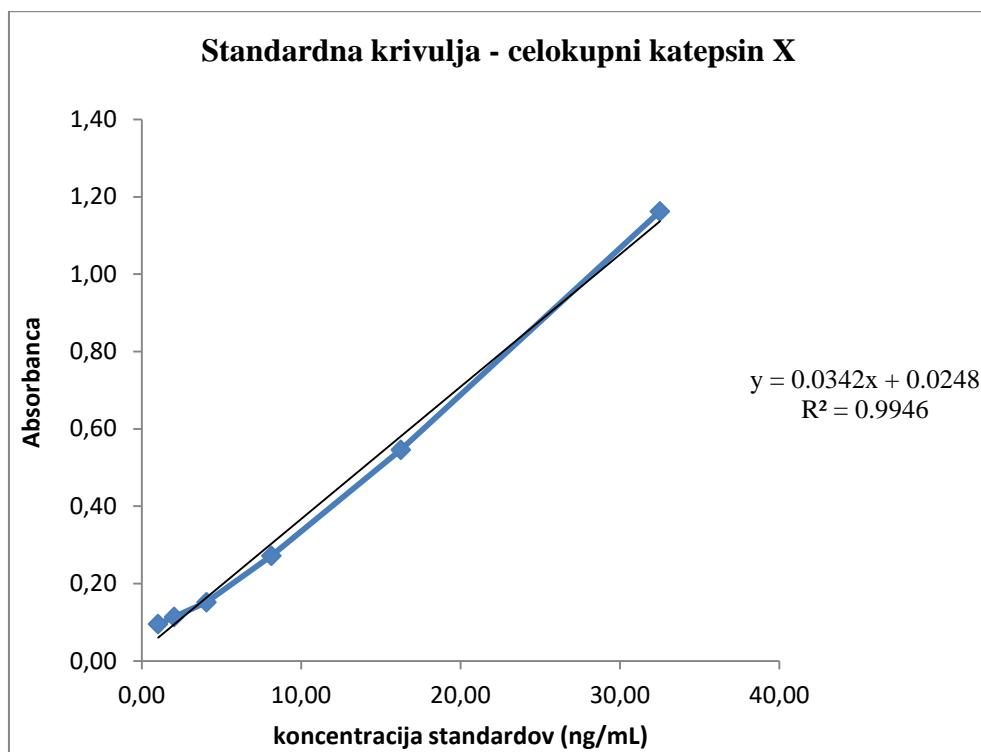
Pri gojenju s stalnim mešanjem so se vrednosti aktivnega katepsina X vsesplošno zmanjšale, statistično značilno pa le v celicah, ki so bile izpostavljene A β_{25-35} (povprečna vrednost iz 114,8 na 75,4 pmol X/mg proteinov po 8-urnem oziroma iz 99,5 na 70,8 pmol X/mg proteinov po 24-urnem gojenju z A β_{25-35}). Trend zmanjševanja množine aktivnega katepsina X je viden tudi pri kontrolnih celicah, čeprav zmanjšanje ni statistično značilno (Preglednica XI).

Preglednica XI – Primerjava vpliva klasičnega postopka in postopka s stalnim mešanjem na množino aktivnega katepsina X (* p<0,05).

Vzorec	Množina aktivnega katepsina X (pmol/mg proteinov)		p vrednost
	Gojenje celic po klasičnem postopku	Gojenje celic s stalnim mešanjem	
8h Ka	140,5	81,4	0,1430
8H Kb	106,3	84,6	
8h ABa	122,6	74,6	0,0379*
8h ABb	106,9	76,2	
24h Ka	119,1	75,1	0,0814
24h Kb	97,8	68,5	
24h ABa	101,5	72,4	0,0083*
24h ABb	97,4	69,1	

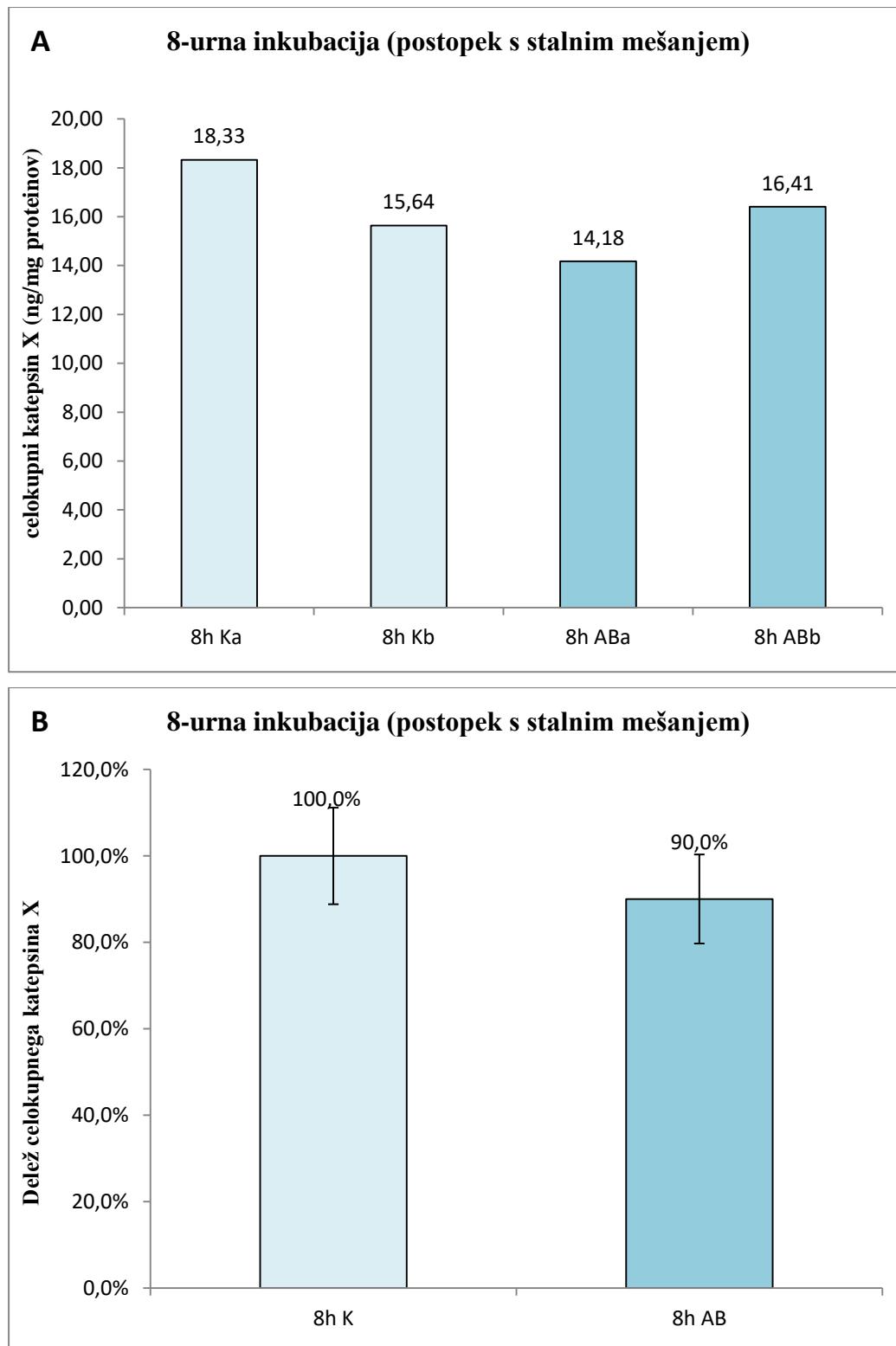
5.3 Izražanje celokupnega katepsina X v celičnih lizatih nediferenciranih celic PC-12

Celice PC-12 smo gojili z A β_{25-35} 8 in 24 ur, pripravili celične lizate in jim izmerili izraženost celokupnega katepsina X. Tako kot pri cistatinu C, izražanje celokupnega katepsina X (prokatepsin X in aktivni katepsin X skupaj) smo izmerili s testom ELISA. Iz umeritvene krivulje standardnih raztopin (slika 21) rekombinantnega katepsina X smo določili koncentracijo celokupnega katepsina X in jo preračunali na mg celokupnih proteinov v celičnem lizatu (graf A na slikah 22 in 23). Izražanje celokupnega katepsina X smo primerjali s kontrolnimi celicami, ki niso bile izpostavljene A β_{25-35} in jim pripisali vrednost 100 % (graf B na slikah 22 in 23).

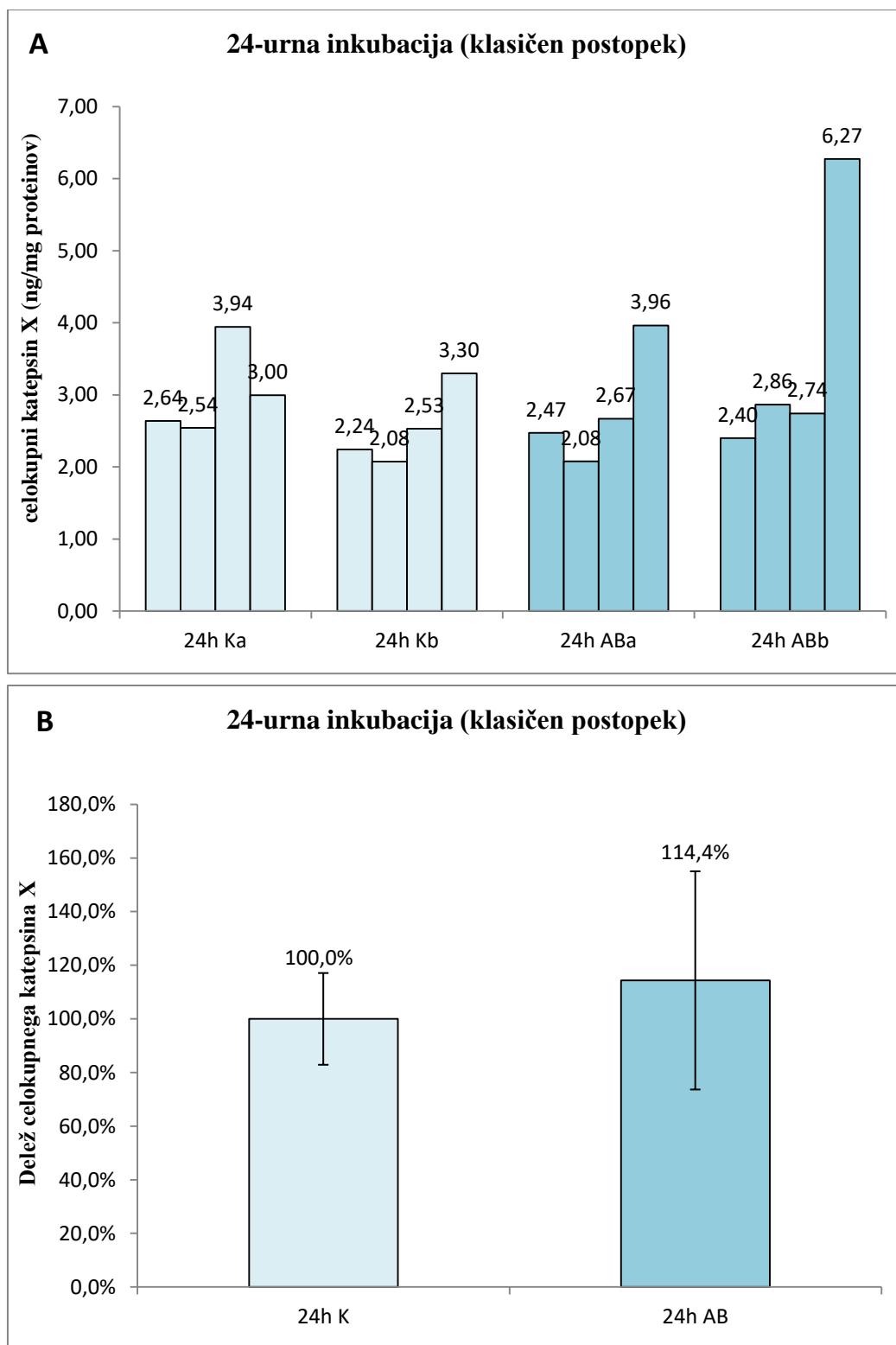


Slika 21: Umeritvena krivulja standardnih raztopin katepsina X. Na sliki je prikazana tudi enačba, ki predstavlja enačbo premice in R^2 , ki predstavlja Pearsonov koeficient korelacije.

Vrednost celokupnega katepsina X se je po 8-urnem gojenju celic z A β_{25-35} na stresalniku s stalnim mešanjem znižala na 90 % ($p=0,4434$; slika 22). Po 24h gojenju celic z A β_{25-35} po klasičnem postopku pa se je vrednost celokupnega katepsina X povečala na 114,4 % ($p=0,4231$; slika 23).



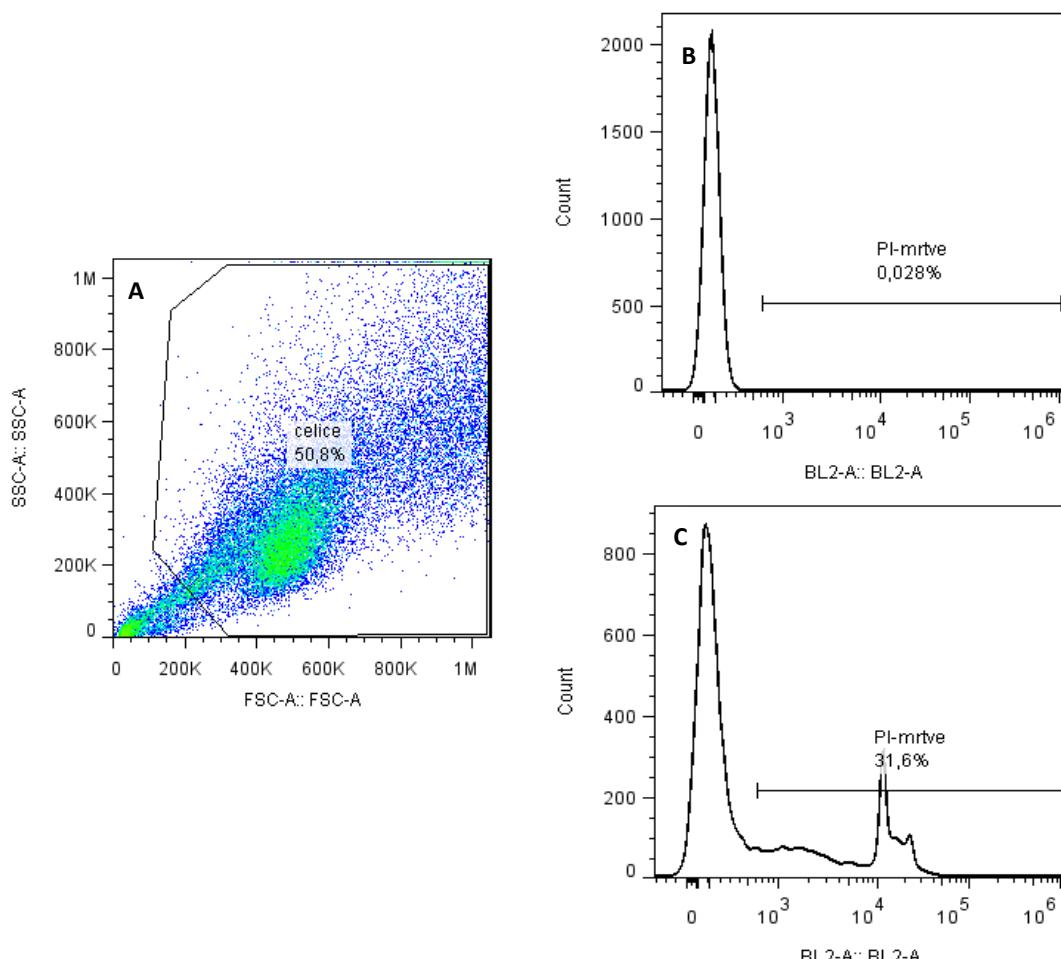
Slika 22: Izražanje celokupnega katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 po 8-urnem gojenju z $\text{A}\beta_{25-35}$ na stresalniku. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah. **A.** Vrednost celokupnega katepsina X (ng) preračunana na mg celokupnih proteinov v lizatu **B.** Povprečje vrednosti celokupnega katepsina X, normalizirano na kontrolne celice (100 %) \pm RSD ($p=0,4434$).



Slika 23: Vpliv $\text{A}\beta_{25-35}$ na izražanje celokupnega katepsina X v lizatih nediferenciranih celic PC-12 v časovni točki 24 h. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli štirikrat v dveh paralelkah. **A.** Vrednost celokupnega katepsina X (ng) preračunana na mg celokupnih proteinov v lizatu **B.** Povprečje vrednosti celokupnega katepsina X, normalizirano na kontrolne celice (100 %) \pm RSD ($p=0,4231$)

5.4 Določanje deleža mrtvih celic s pomočjo pretočne citometrije

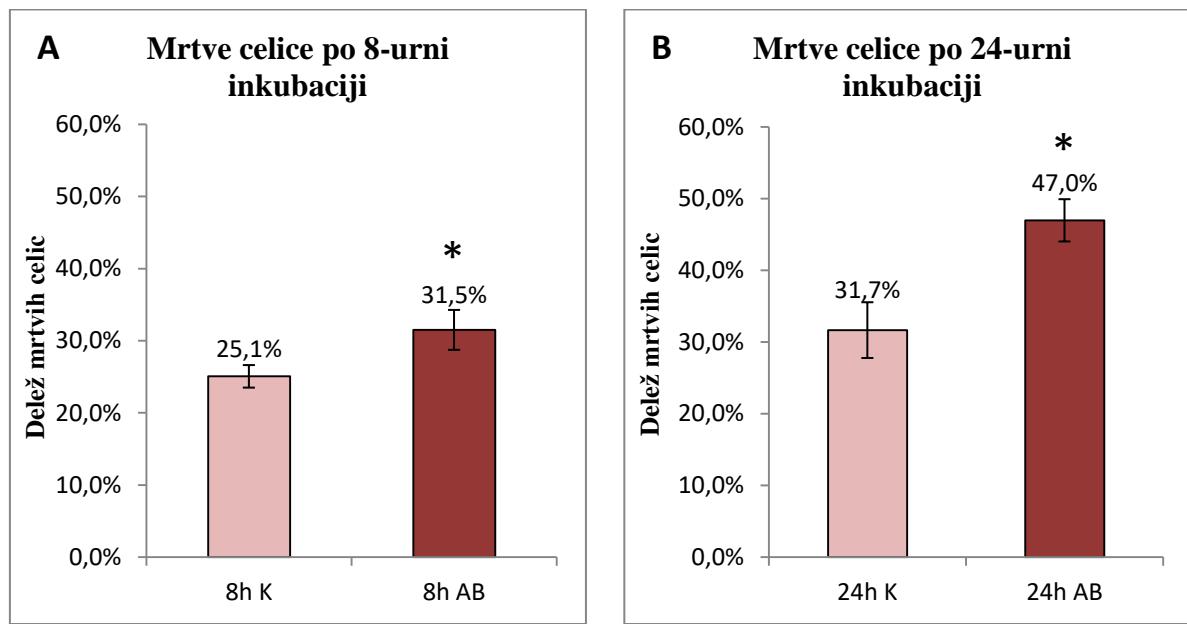
Da bi določili odstotek mrtvih celic po 8-urnem in 24-urnem gojenju z A β_{25-35} , smo nediferencirane celice PC-12 označili s propidijevim jodidom (PI) in analizirali s pretočno citometrijo. Na sliki 24a je predstavljen točkovni diagram (FSC/SSC), na katerem smo z računalniškim programom FlowJo izbrali dogodke (ang. gated), ki predstavljajo celice in ne celičnega debrisa. Na histogramih, ki prikazujejo število celic na intenzivnost emisije PI, smo celice razdelili v populacijo živih in populacijo mrtvih ter s pomočjo računalniške opreme FlowJo določili delež mrtvih celic (%) (sliki 24b in 24c).



Slika 24: Primer točkovnega diagrama in histogramov za določitev deleža mrtvih celic. **A.** Točkovni diagram dogodkov na pretočnem citometru (ograjene so celice, ostalo je celični debris) **B.** Histogram neoznačenih celic (celice brez PI). **C.** Histogram celic, označenih s PI.

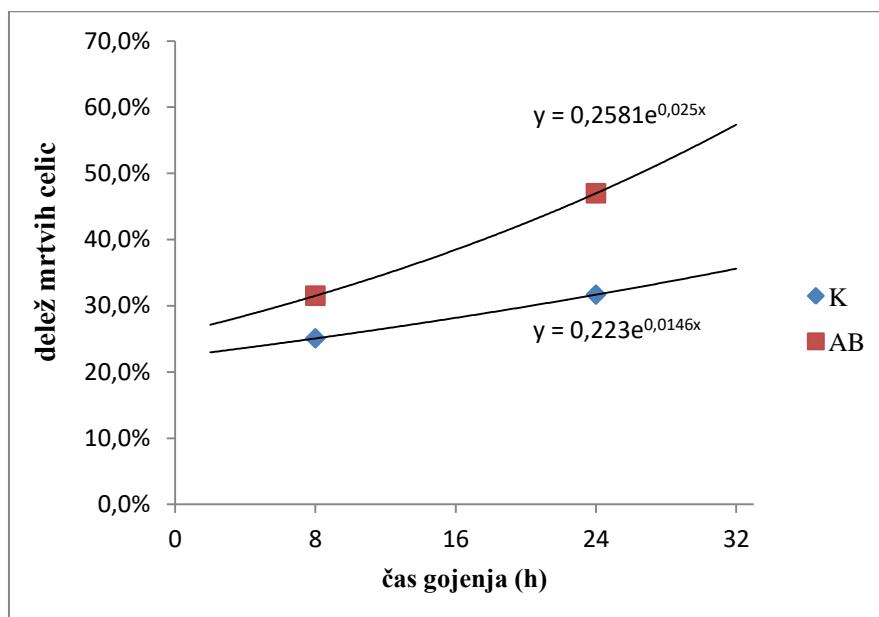
Po 8-urnem gojenju nediferenciranih celic PC-12 z A β_{25-35} je bil delež mrtvih celic za 6,4 odstotnih točk višji (31,5 %) glede na kontrolne celice (25,1 %), ki niso bile izpostavljene amiloidu, kar je statistično značilno povečanje ($p=0,0100$, graf A na sliki 25). Izrazitejši učinek A β_{25-35} je bil videno po 24-urni inkubaciji, saj je bil delež mrtvih celic za 15,3

odstotnih točk (47 %) višji glede na kontrolne celice (31,7 %), ki niso bile izpostavljene amiloidu, kar je prav tako statistično značilno povečanje ($p=0,0072$, graf B na sliki 25).



Slika 25: Vpliv $\text{A}\beta_{25-35}$ na delež mrtvih celic PC-12. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah po klasičnem postopku v mirovanju. **A.** Delež (%) mrtvih celic po 8-urni inkubaciji z $\text{A}\beta_{25-35} \pm \text{RSD}$ ($p=0,0100$). **B.** Delež (%) mrtvih celic po 24-urni inkubaciji z $\text{A}\beta_{25-35} \pm \text{RSD}$ ($p=0,0072$).

Umrljivost celic smo ekstrapolirali z eksponentno trendno črto iz katere je razvidno, da umrljivost pod vplivom $\text{A}\beta_{25-35}$ narašča hitreje kot umrljivost kontrolnih celic PC-12 (slika 26).



Slika 26: Ekstrapolacija deleža mrtvih celic PC-12 na eksponentno trendno krivuljo. Kontrola (K); $\text{A}\beta(\text{AB})$.

6. RAZPRAVA

Zakaj smo izbrali A β za simulacijo Alzheimerjeve bolezni?

Tvorba zunajceličnih amiloidnih leh je patološko-biokemični proces, značilen za AD. Poleg zunajceličnega A β , obstaja veliko dokazov, da A β nastaja in se kopiči tudi znotraj celic. A β se procesira v endoplazemskem retikulu, lizosomih, endosomih, Golgijevem aparatu in multivezikularnih telesih (MV). Oligomerizacija A β poteka predvsem znotraj endoplazemskega retikla. Izsledki študij kažejo, da škoda, ki jo povzroči amiloid beta, izhaja predvsem iz majhnih oligomernih oblik peptida A β , vendar natančen mehanizem patogenosti še ni poznan. Predpostavlja, da amiloidni plaki lahko nastanejo tudi po prenosu topnih oligomerov in netopnih zunajceličnih fibril v celico preko endocitoze. Po internalizaciji se združijo v multivezikularnih telesih, kjer spontano fibrilizirajo in motijo normalno funkcijo MV. Na koncu, celica odmre in vse znotrajcelične strukture, vključno z vsemi znotrajceličnimi amiloidnimi vrstami, se sprostijo v zunajcelični prostor (41, 42). Kopičenje A β v nevronih so odkrili pri bolnikih z AD, transgenih miši in gojenih celicah. Znotrajcelični A β se pojavi pred nastankom zunajceličnih senilnih leh. Ključno vprašanje je, ali se znotrajcelični A β kopiči kot posledica neizločanja iz celic ali pa se že izločeni amiloid morda prenese nazaj v celico (43).

Zakaj smo izbrali celice PC-12 kot model za Alzheimerjevo bolezen?

Celice PC-12 so v osnovi živčne celice, ki jih lahko diferenciramo v nevrtske celice, podobne nevronom. V literaturi so jih že uporabili kot model za AD v kombinaciji z A β . Celice so enostavne za gojenje, A β pa jih izpostavimo bodisi pritrjene na podlago bodisi nepritrjene (v suspenziji). A β deluje tako na diferencirane kot na nediferencirane celice PC-12, pri čemer je s slednjimi poskuse enostavnejše izvesti.

Zakaj smo za poskuse izbrali A β_{25-35} namesto A β_{1-40} oz. A β_{1-42} ?

V poskusih, izvedenih med magistrskim delom, smo za gojenje uporabili A β_{25-35} namesto A β_{1-40} oz. A β_{1-42} , saj A β_{25-35} izkazuje praktično enake toksične učinke kot A β_{1-40} oz. A β_{1-42} (44). Topna oblika in agregati A β_{25-35} povzročajo podobne toksične učinke kot ostali dve oblici amiloida, ki sta sicer bolj pogosti (45). Mehanizem citotoksičnega delovanja na celice A β_{25-35} v mediju še vedno ni natančno znan. Tako *in vivo* kot *in vitro* je učinke A β mogoče zaznati v obliki mitohondrijskih sprememb, sinaptične disfunkcije, ekscitoksičnosti (poškodba celic zaradi prevelike ekscitacije), spremenjene homeostaze kalcija, oksidativnega

stresa ipd. Kot zanimivost je znano, da *in vitro* A β_{25-35} poleg nevronskeih celic, vpliva tudi na smrtnost mioblastov in eritrocitov (18, 46).

Zakaj smo izbrali časovni točki 8 in 24 ur?

Iz literature je znano, da se obsežna celična smrt podganjih nevronov, izoliranih iz predela hipokampa, pojavi med 8 in 24 ur po izpostavljenosti A β_{1-42} (47). Na nevroblastnih celicah SH-SY5Y, ki so jih gojili z A β_{25-35} 6, 12, 24 in 36 ur, je amiloid povzročil statistično značilno celično smrt po 12 urah inkubacije, v primerjavi s kontrolnimi celicami (48).

Zakaj smo analizirali izraženost cistatina C v celicah PC-12?

Cistatin C, inhibitor cisteinskih proteaz, je vključen v regulacijo številnih normalnih celičnih procesov, kot so proliferacija in rast celic, resorpcija kosti, diferenciacija astrocitov, popravljanje živčnega sistema ter kot protivirusna in protibakterijska zaščita. Literurni podatki študij *in vivo* ter *in vitro* kažejo, da deluje nevroprotективno in antiamiloidotvorno (49, 50). Njegovo povečano izražanje so dokazali po 24, 48 in 72-urnem delovanju sinteznega 6-hidroksidopamina (6-OHDA) na celice PC-12, diferencirane z NGF (51). Izražanje cistatina C na ravni mRNA se je v celicah PC-12 v hiperoksičnih razmerah (50 % vrednost kisika glede na normalnih 20 %) povečalo, zato sklepajo, da se nevronske celice odzovejo na oksidativni stres s sintezo cistatina C (52). Nizke vrednosti cistatina C v serumu pri starejših moških se pojavijo že pred pojavom kliničnih simptomov AD. Njegove vrednosti v likvorju bolnikov z AD pa so nižje, v primerjavi s posamezniki, ki niso dementni (49, 53).

Eden izmed mehanizmov antiamiloidotvornega delovanja cistatina C je indukcija avtofagije preko signalne poti mTOR, kar vodi do povečanega proteolitičnega odstranjevanja razgradnih produktov iz lizosomov (31, 50). V endotelijskih celicah možganov cistatin C preusmeri cepitev APP iz amiloidne (cepitev z β -sekretazo in γ -sekretazo) v neamiloidno pot (cepitev z α -sekretazo), kar povzroči zmanjšanje nastanka A β in povečano izločanje topnega neamiloidotvornega fragmenta sAPP α . (53).

Znano je, da je vpletten v številne patogene procese, kot so: rak, bolezni ledvic, diabetes, epilepsija in nevrodegenerativne motnje (49, 50). Poleg zaščitnih učinkov cistatina C je znano tudi njegovo toksično delovanje. Vbrizgavanje cistatina C v možgane mišjega modela AD je namreč povzročilo smrt nevronskeih celic (54). Kljub velikemu številu študij, ki dokazujejo vplettenost cistatina C v nevrodegenerativne motnje, je še vedno nejasno, ali so povišane vrednosti cistatina C vzrok ali posledica bolezni.

Kako A β ₂₅₋₃₅ vpliva na izraženost cistatina C v celicah PC-12?

V magistrskem delu smo želeli preveriti, ali A β ₂₅₋₃₅ vpliva na izražanje gena za cistatin C v lizatih nediferenciranih celic PC-12. Ugotovili smo, da se vrednost cistatina C po 8-urnem gojenju celic z A β ₂₅₋₃₅ po klasičnem postopku zniža na 89,8 %, po 24-urnem gojenju pa se poveča na 137,5 %, glede na kontrolne celice (100 %), ki niso bile izpostavljene A β ₂₅₋₃₅. Njegova vrednost pa se je po 8-urnem gojenju celic z A β ₂₅₋₃₅ s stalnim mešanjem statistično značilno znižala na 70,5 %, po 24-urnem gojenju pa povečala na 159,1 %.

Zmanjšanje vrednosti cistatina C po 8 urah bi lahko bila posledica pretežnega izločanja že izraženega cistatina C iz celic preko običajne sekretorne poti ali izločanja v eksosomih. Lizat celic namreč zajame le znotrajcelično prisoten cistatin C, čigar izražanje je v običajnih razmerah konstantno. Pričakovali smo, da se bo ekspresija cistatina C v prisotnosti A β ₂₅₋₃₅ povečala, vendar je očitno, da je bila njena časovna dinamika počasnejša v prvih 8 urah, nato pa postala bolj poudarjena kasneje, kar je vidno v časovni točki 24 ur. Kljub temu, da razlike niso statistično značilne, je trend zviševanja vrednosti cistatina C po 24-urnem gojenju izrazit, tako v pogojih klasičnega gojenja kot v pogojih gojenja s stalnim mešanjem. Z večjim številom ponovitev bi po našem mnenju trend postal statistično značilen. Ker je znano, da se amiloidni fragmenti internalizirajo v celico preko endosomov, bi lahko znotrajcelično prisoten A β ₂₅₋₃₅ povzročil povečano ekspresijo cistatina C po 24 urah.

Ali stalno mešanje vpliva na izražanje gena za cistatin C v celicah PC-12?

Celice PC-12 med delitvijo tvorijo skupke, med seboj bolj ali manj rahlo povezanih celic, ki lebdijo v gojišču. Predvidevamo pa, da imajo oligomeri A β , ki se tvorijo med predhodno agregacijo, v rastnem gojišču tendenco posedanja. Zato smo želeli optimizirati gojenje celic s stalnim mešanjem, da bi izboljšali stik med njimi in agregati A β .

Način gojenja celic (po klasičnem postopku oz. po postopku s stalnim mešanjem) ni statistično značilno vplival na vrednosti cistatina C v celičnem lizatu (medsebojna primerjava kontrolnih celic po obeh načinih gojenja oziroma medsebojna primerjava celic, gojenih z A β ₂₅₋₃₅ po obeh načinih gojenja). Viden pa je bil trend povečevanja vrednosti cistatina C v kontrolnih celicah po 8 urah stalnega mešanja (povprečna vrednost se je povečala z 2,3 na 2,9 μ g/mg celokupnih proteinov).

Ali se cistatin C iz celic PC-12 tudi izloča v rastni medij?

Cistatin C se običajno izloča iz celic po klasični sekretorni poti in deluje zunajcelično (49). Kardiomiociti izločajo cistatin C v gojišče v celičnem modelu simulacije reaktivnih kisikovih zvrsti s H₂O₂ (55). V mišjih primarnih kortikalnih nevronih se cistatin C izloča v zunajcelični matriks tudi z eksosomi, skupaj s proteini in peptidi, ki so povezani z AD in kolokalizira z amiloidom v senilnih plakih (56, 57). Po izločanju iz celice se cistatin C lahko ponovno internalizira v endosome in lizosome, kjer se veže na znotrajcelični A β in tako prepreči njegovo oligomerizacijo (31).

Tudi za celice PC-12 lahko po analogiji sklepamo, da izločajo cistatin C v rastno gojišče, vendar z opisanim testom ELISA nismo mogli določiti njegove količine, najverjetneje zaradi prisotnosti serumskih proteinov, ki motijo interakcijo protiteles s cistatino C. Test ELISA z rastnim gojiščem, v katerem so bile gojene celice PC-12 smo sicer izvedli, vendar rezultati niso bili konsistentni. Za kvantitativno določitev koncentracije cistatina C v rastnem gojišču bi lahko v nadaljevanju poskusili uporabiti kakšnega od komercialno dostopnih kompletov ELISA.

Zakaj smo analizirali izraženost katepsina X v celicah PC-12?

V slabše preživetje nevronskih celic je vpletен tudi katepsin X, lizomska cisteinska proteaza, izražen predvsem v celicah imunskega sistema in centralnega živčnega sistema, predvsem v astrocitih in celicah glie. V celicah PC-12 katepsin X negativno vpliva na nevritogenezo s cepitvijo dveh aminokislin na C-koncu γ -enolaze. Inhibicija katepsina X spodbuja rast nevritov v diferenciranih celicah PC-12 in poveča njihovo preživetje. Ugotovili so, da sta se količina katepsina X in njegova aktivnost po 6, 12, 24, 48 in 72-urnem gojenju nediferenciranih celic PC-12 in celic SH-SY5Y s citotoksičnim 6-OHDA povečala, glede na kontrolne celice, ki niso bile izpostavljene 6-OHDA. Inhibicija katepsina X je zmanjšala toksične učinke 6-OHDA, kar nakazuje, da je katepsin X morda odgovoren za smrt dopaminskih nevronov in posledično vpletjen v procese, ki vodijo v razvoj nevrodegenerativnih obolenj (26, 58, 59, 60).

Ali A β ₂₅₋₃₅ vpliva na množino aktivnega katepsina X v celicah PC-12?

V magistrski nalogi smo želeli določiti ali, A β ₂₅₋₃₅ vpliva na množino aktivnega katepsina X, izmerjeno z encimskim testom s fluorogenim substratom. Ugotovili smo, da se je količina aktivnega katepsina X po 8 in 24 h gojenju z A β ₂₅₋₃₅ po klasičnem postopku znižala na 93 %

oziroma na 91,7 %, glede na kontrolne celice (100 %), ki niso bile izpostavljene A β_{25-35} . Spremembu sicer ni bila statistično značilna, nakazuje pa na tendenco zmanjševanja množine aktivnega katepsina X. Podoben učinek A β_{25-35} na aktivnost katepsina X smo opazili tudi pri gojenju celic z A β_{25-35} s stalnim mešanjem, saj se je količina aktivnega katepsina X znižala na 90,8 % (po 8 urah) oz. na 98,5 % (po 24 urah). V literaturi še ni podatka o vplivu amiloidnih agregatov na vrednosti aktivnega katepsina X v celicah *in vitro*. Iz naših rezultatov izhaja, da v uporabljenih eksperimentalnih pogojih, A β_{25-35} ne vpliva bistveno na aktivnost katepsina X. Vseeno pa je preuranjeno trditi, da aktivni katepsin X ni udeležen pri amiloidni patogenezi. Ker se katepsin X *in vivo* aktivira s pomočjo katepsina L, bi lahko bila inhibicija katepsina L s cistatinom C bila vzrok za to, da se množina aktivnega katepsina X po 24 urah ni povečala.

Ali stalno mešanje vpliva na aktivnost katepsina X v celicah PC-12?

Preverili smo tudi, ali stalno mešanje med gojenjem vpliva na množino aktivnega katepsina X. Zanimivo je, da so se absolutne vrednosti količin katepsina X tako v kontrolnih, kot amiloidnih vzorcih, zmanjšale. Statistično značilno je pa bilo zmanjšanje v celicah, ki so bile izpostavljene A β_{25-35} , ne pa tudi v kontrolnih celicah. Vpliv na absolutno množino katepsina X je bil presenetljiv, saj izgleda, da se v mirajočih celicah PC-12 aktivira več katepsina X kot med mešanjem.

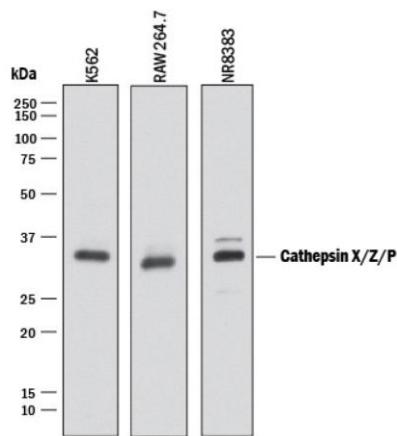
Kako A β_{25-35} vpliva na vrednosti celokupnega katepsina X v celicah PC-12?

Poleg vpliva A β_{25-35} na množino aktivnega katepsina X, smo določili tudi njegov vpliv na izražanje celokupnega katepsina X (prokatepsin X in katepsin X skupaj), izmerjenega s testom ELISA. Vrednost celokupnega katepsina X se je po 8-urnem gojenju celic z A β_{25-35} , ob stalem mešanju znižala na 90 %, po 24 h gojenja z A β_{25-35} po klasičnem postopku, pa povečala na 114,4 %. Te spremembe niso bile statistično značilne. Pri delu smo uporabljali konjugirana monoklonska protitelesa 3B10-HRP, ki prepozna pro- in aktivno obliko katepsina X (15). Ker smo pri izvedbi poskusov na Katedri za farmacevtsko biologijo porabili konjugirana protitelesa 3B10-HRP, žal nismo uspeli izmeriti količin celokupnega katepsina X v lizatih vseh poskusov (24 ur s stalnim mešanjem), pri nekaterih poskusih pa so bile dobljene vrednosti nezanesljive (8 ur gojenja v mirovanju). Na osnovi omejenega števila rezultatov pa sklepamo, da ostaja ekspresija celokupnega katepsina X nespremenjena tudi v prisotnosti A β_{25-35} .

Zakaj so bile absolutne vrednosti celokupnega katepsina X, izmerjene s testom ELISA, tako nizke?

Pri testu ELISA za celokupni katepsin X smo izmerili vrednosti reda velikosti 2-20 ng/mg proteinov, kar je absolutno gledano zelo malo (preračunano v množino je to 70-700 fmol/mg proteinov). Pri merjenju množine aktivnega katepsina X z encimskim testom pa so bile vrednosti reda velikosti 65-140 pmol/mg proteinov. Princip kinetičnega encimskega testa je težko primerljiv s principom testa ELISA, vseeno pa so podatki kontradiktorni, saj bi morala biti vrednost celokupnega katepsina X večja od vrednosti aktivnega katepsina X.

Proizvajalec kozjih poliklonskih protiteles proti katepsinu X, ki smo jih uporabili v testu ELISA kot lovilna, ponuja tudi rekombinantni katepsin X, ki je po njihovih navedbah v pro-oblki (kat. št. 934-cy), s predvideno molekulsko maso 33 kDa. Proizvajalec ne ponuja aktivne oblike katepsina X, ampak navaja postopek aktivacije pro-oblik z ditiotreitolom (DTT) (61). Ker je aktivacija neencimska (brez katepsina L, ki se običajno uporablja za odcep pro-domene), ostaja pro-domena kovalentno vezana na katepsin X tudi po aktivaciji z DTT. Sklepamo, da so to obliko katepsina X (z vezano pro-domeno) pri proizvajalcu uporabili za imunizacijo koz. Obstaja tudi verjetnost, da imajo poliklonska protitelesa precej večjo afiniteto do prokatepsina X kot do njegove aktivne oblike (če sploh). V navodilih za uporabo, ki jih proizvajalec navaja kot dokaz za specifičnost protiteles, je v lizatih treh celičnih linij zaznavna le lisa pri 33 kDa, ki ustreza prokatepsinu X, ne pa tudi lisa za aktivni katepsin X, ki bi morala biti vidna pri velikosti okoli 29 kDa (Slika 27).



Slika 27: Prenos po westernu lizatov celic treh celičnih linij z uporabljenimi protitelesi AF-934, proizvajalca R&D; pozeto po (61). Prepoznanata lisa pri 33 kDa ustreza prokatepsinu X.

V testu ELISA smo kot standard uporabili katepsin X, ki je bil pridobljen rekombinantno v kvasovki *Pichia pastoris* in aktiviran s katepsinom L, pri čemer pa aktivacija prokatepsina X

v aktivno obliko ni bila popolnoma učinkovita, zato sta v rekombinantnem standardu prisotni obe obliki, večinsko prokatepsin X (podatki sodelavcev na Katedri za farmacevtsko biologijo) (62).

Če predpostavljam, da protitelesa AF-934 v resnici prepoznavajo le pro-obliko, ki je prisotna tudi v standardu, potem smo s testom ELISA namesto celokupnega katepsina X v resnici določili le prokatepsin X! S tega zornega kota so nizke vrednosti prokatepsina X sprejemljive in nakazujejo, da je v celicah PC-12 praktično ves katepsin X v aktivni obliki. Za potrditev zapisanega pa bo v nadaljevanju potrebno preveriti ustreznost komercialnih lovilnih protiteles za določanje celokupnega katepsina X v lizatih celic PC-12.

Kako A β ₂₅₋₃₅ vpliva na smrtnost celic PC-12?

Vpliv A β ₂₅₋₃₅ na celično smrtnost smo preverili s pretočno citometrijo in propidijevim jodidom. Po 8-urnem gojenju celic z A β ₂₅₋₃₅ smo opazili statistično značilno povečanje števila mrtvih celic (za 6,4 odstotnih točk), glede na kontrolne celice, ki niso bile izpostavljene amiloidu. Izrazitejši učinek A β ₂₅₋₃₅ smo opazili po 24 h gojenja, saj se je delež mrtvih celic znatno povečal (za 15,3 odstotnih točk), glede na kontrolne celice, ki niso bile v stiku z amiloidom.

O podobno obsežni smrtnosti poročajo tudi druge študije celic PC-12, gojenih v prisotnosti A β ₂₅₋₃₅ (63, 64). Sung in sod. so raziskovali mehanizem, s katerim amiloid beta inducira celično smrt. Kot model so uporabili nediferencirane in diferencirane celice PC-12. Ugotovili so, da A β ₂₅₋₃₅ povzroči nekrozo v nediferenciranih celicah, v diferenciranih pa apoptozo. Njihovi rezultati kažejo, da je citotoksičnost A β ₂₅₋₃₅ posledica občutljivosti nediferenciranih celic PC-12 na reaktivne kisikove spojine (63).

Iz ekstrapolirane eksponentne trendne črte, ki smo jo generirali, je razvidno, da je bila smrtnost celic PC-12 v prisotnosti A β ₂₅₋₃₅ večja od smrtnosti kontrol. Celice v gojišču sicer normalno umirajo zaradi običajnega celičnega cikla, fizičnega šoka pri resuspendiranju (npr. ob menjavi gojišča, ko je potrebno skupke razbiti na posamezne celice) in/ali iztrošenosti gojišča (ki se s časom vse bolj izrablja). Pričakovali bi, da cistatin C zaščiti celice PC-12 pred toksičnim delovanjem A β ₂₅₋₃₅, vendar pa iz naše ekstrapolirane eksponentne trendne črte vidimo, da temu ni bilo tako, saj cistatin C umrljivosti ni uspel zadržati na nivoju tiste, ki smo jo zabeležili v kulturi kontrolnih celic. Seveda pa obstaja verjetnost, da bi bila smrtnost celic PC-12 še večja, če ne bi izražale večjih količin cistatina C, a to bi lahko ugotovili le, če bi v njih zavrlji bodisi transkripcijo gena za cistatin C s specifičnimi inhibitorji bodisi inaktivirali

cistatin C (npr. z nevtralizacijskimi protitelesi) ali pa zavrli njegovo izločanje iz celic, npr. z zaviralci endocitoze (v primeru, da cistatin C izboljša preživetje celic z delovanjem od zunaj).

7. SKLEP

Namen magistrske naloge je bil preveriti, ali $A\beta_{25-35}$, prisoten med gojenjem nediferenciranih celic PC-12, vpliva na izražanje genov za cistatin C in celokupni katepsin X ter na količino aktivnega katepsina X. Celice smo gojili na dva načina, in sicer po klasičnem postopku (celice so med inkubacijo mirovale) ali s stalnim mešanjem na stresalniku.

- Dokazali smo, da se je vrednost cistatina C po 8-urnem gojenju celic z $A\beta_{25-35}$ ob stalnem mešanju statistično značilno znižala, glede na kontrolne celice, ki niso bile izpostavljene amiloidu. Statistično neznačilen trend zviševanja vrednosti cistatina C pa je bil viden po 24-urnem gojenju z $A\beta_{25-35}$, in sicer tako v statičnih kot stalno mešanih celičnih kulturah.
- Dokazali smo, da zmanjšanje aktivnosti katepsina X zaradi 8 in 24-urnega delovanja amiloida na nediferencirane celice PC-12 ni bilo statistično značilno, in sicer ne glede na način njihovega gojenja. Pri gojenju s stalnim mešanjem so se absolutne vrednosti aktivnega katepsina X vsesplošno zmanjšale, statistično značilno pa le v tistih celicah, ki so bile izpostavljene $A\beta_{25-35}$. Sicer statistično neznačilen trend zmanjševanja množine aktivnega katepsina X pa je bil viden tudi pri kontrolnih celicah.
- Pokazali smo, da gojenje celic PC-12 v prisotnosti $A\beta_{25-35}$ ne vpliva na izražanje gena za (pro)catepsin X, vendar rezultati niso zanesljivi, zaradi izmerjenih nizkih vrednosti celokupnega katepsina X, v primerjavi z vrednostmi aktivnega katepsina X. Zato bi bilo potrebno izvesti dodatne raziskave, da bi preverili ustreznost uporabljenih lovilnih protiteles za določitev celokupnega katepsina X.
- S pretočno citometrijo smo dokazali, da se je delež mrtvih celic PC-12 statistično značilno povečal po njihovem 8- in 24-urnem gojenju z $A\beta_{25-35}$, v primerjavi s kontrolnimi celicami, ki niso bile izpostavljene amiloidu.

8. LITERATURA

1. Korolev, I.O: Alzheimer 's disease: A Clinical and Basic Science Review. Medical Student Research Journal, 2014; 4: 24-33.
2. Liu, Chang et al.: Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Chemokines Produced by Astrocytes and Chemokine Receptors. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014: 8342–8355.
3. Emeršič A, Pirtošek Z: Nastanek, razvoj in diagnostika Alzheimerjeve bolezni, Farmacevtski Vestnik, 2013; 64: 191-201.
4. Guo-fang Chen, et al: Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. Acta Pharmacologica Sinica, 2017; 38: 1205–1235.
5. Spominčica – Alzheimer Slovenija – Slovensko združenje za pomoč pri demenci. Dostopno na: <https://www.spomincica.si/> (19.6.2018).
6. Emeršič A, Pirtošek Z, Štrukelj B: Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni, Farmacevtski vestnik, 2013; 64: 202-7.
7. Lendon CL, Ashall F, Goate AM: Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. JAMA, 1997; 277: 825-31.
8. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM: Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 2011; 7: 280–92.
9. Förstl, H. & Kurz, A: European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences, 1999: 249-288.
10. Alzheimer's Association Report, Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & Dementia 14, 2018: 367-429
11. Harikrishnan R: Alzheimer's Disease- A Review. J. Pharm. Sci. & Res, 2016; 8: 1292-129.
12. De-Paula V.J., Radanovic M., Diniz B., Forlenza O: Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease. Subcellular Biochemistry, 2012: 65.
13. Murphy, M. Paul, LeVine H: Alzheimer's Disease and the B-Amyloid Peptide. Journal of Alzheimer's disease, 2010: 311.
14. Sadigh-Eteghad, Saeed et al: Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. Medical Principles and Practice, 2015: 1–10.

15. G.R. Frost, Y.M. Li: The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biol.*, 2017.
16. Jamasbi E, Wade JD, Separovic F, Hossain MA: Amyloid beta (A β) peptide and factors that play important roles in Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*, 2016; 23: 884–92.
17. Qiu, T.; Qiu, T.; Liu, Q.; Chen, Y.-X.; Zhao, Y.-F.; Li, Y.- M: Ab42 and Ab40: similarities and differences. *J. Pept. Sci.*, 2015; 21: 522-529.
18. Millucci L, Ghezzi L, Bernardini G, Santucci A: Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr Protein Pept Sci.*, 2010; 11: 54–67.
19. Fonovic M & Turk B: Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta*, 2014: 2560–2570.
20. Pislar A, Nanut MP, Kos J: Lysosomal cysteine peptidasesndashmolecules signaling tumor cell death and survival. *Seminars in Cancer Biology*, 2015.
21. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T: Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1824: 68–88.
22. D.K. Nagler, R.L. Zhang, W. Tam, T. Sulea, E.O. Purisima, R. Menard: Human cathepsin X: a cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* 38, 1999: 12648–12654.
23. PDB ID: 1EF7 G. Guncar, I. Klemencic, B. Turk, V. Turk, A. Karaoglanovic-Carmona, L. Juliano, D. Turk: Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure* 8, 2000: 305–313.
24. Kos J, et al.: Intracellular signaling by cathepsin X: Molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Semin Cancer Biol* (2014).
25. Teller A, Jechorek D, Hartig R, Adolf D, Reissig K, Roessner A, Franke S: Dysregulation of apoptotic signaling pathways by interaction of RPLP0 and cathepsin X/Z in gastric cancer. *Pathol Res Pract*, 2015; 211: 62–70.
26. Hafner A, Glavan G, Obermajer N, Zivin M, Schliebs R, Kos J: Neuroprotective role of gamma-enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging Cell*, 2013; 12: 604–14.
27. Mussap M, Plebani M: Biochemistry and clinical role of human cystatin C. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 2004; 41: 467–550.

28. PDB ID: 3GAX. Kolodziejczyk R, Michalska K, Hernandez-Santoyo A, Wahlstrom M, Grubb A, Jaskolski M: Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *Febs J*, 2010; 277: 1726–1737.
29. Hojs R, Bevc S, Ekart R, et al.: Serum cystatin C as an endogenous marker of renal function in patients with mild to moderate impairment of kidney function. *Nephrol Dial Transplant*, 2016; 21: 1855-1862.
30. Bokenkamp A, Herget-Rosenthal S, Bokenkamp R: Cystatin C, kidney function and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol*, 2006; 21: 1223–1230.
31. G. Kaur, E. Levy: Cystatin C in Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 5, 2012: 79.
32. Klemenčič, I., Karaoglanovic-Carmona, A., Juliano, M.A., Juliano, L., Gunčar, G., Turk, D., Križaj, I., Turk, V., Turk, B: Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxy-monopeptidase or carboxy-dipeptidase. *Eur J Biochem*, 2000; 267: 5404-5412.
33. PC-12 ATCC ® CRL-1721™ Rattus norvegicus adrenal gland pheochromocytoma. Dostopno na: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1721.aspx?geo_country=si#generalinformation (datum zadnjega dostopa: 7.7.2018).
34. Lowry, O.H: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275.
35. Crowther J.R: Basic Principles of ELISA. *Methods in Molecular Biology™*, 1995; 42.
36. ELISA- Principle, Types and Application.
Dostopno na: <http://www.microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications/> (datum zadnjega dostopa 13.7.2018)
37. Carmona, Adriana K., Juliano, Maria Aparecida, & Juliano, Luiz: The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2009, 81: 381-392.
38. Givan AL: Flow cytometry: An introduction. *Methods Mol Biol*, 2011; 699: 1–29
39. Introduction to flow cytometry. Dostopno na:
<https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry> (datum zadnjega dostopa 4.7.2018).
40. Crowley, L. C., A. P. Scott, B. J. Marfell, J. A. Boughaba, G. Chojnowski, N. J. Waterhouse: Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2016.

41. Friedrich RP, Tepper K, Rönicke R, et al.: Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of A β pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010; 107: 1942-1947.
42. Joshi P, Benussi L, Furlan R, Ghidoni R, Verderio C. Extracellular Vesicles: Alzheimer's Disease: Friends or Foes? Focus on A β -Vesicle Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015; 16: 4800-4813.
43. Kayed R, Lasagna-Reeves CA: Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimer Dis*, 2013: 67–78.
44. Naldi M, Fiori J, Pistolozzi M, et al.; Amyloid β -Peptide 25–35 Self-Assembly and Its Inhibition: A Model Undecapeptide System to Gain Atomistic and Secondary Structure Details of the Alzheimer's Disease Process and Treatment. *ACS Chemical Neuroscience*, 2012; 3: 952-962.
45. Tsai HH, Lee JB, Shih YC, Wan L, Shieh FK, Chen CY: Location and conformation of amyloid β (25-35) peptide and its sequence-shuffled peptides within membranes: implications for aggregation and toxicity in PC12 cells. *Chem Med Chem.*, 2014; 9: 1002–1011
46. Paul Carrillo-Mora, Rogelio Luna, and Laura Colín-Barenque: Amyloid Beta: Multiple Mechanisms of Toxicity and Only Some Protective Effects?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014.
47. Reifert, J., Hartung-Cranston, D., Feinstein, S.C: Amyloid b-mediated cell death of cultured hippocampal neurons reveals extensive Tau fragmentation without increased full-length tau phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 2011; 286: 20797–20811.
48. Chang W, Teng J: β -asarone prevents A β 25-35-induced inflammatory responses and autophagy in SH-SY5Y cells: down expression Beclin-1, LC3B and up expression Bcl-2. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015; 8: 20658-20663.
49. Mathews PM, Levy E: Cystatin C in aging and in Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*, 2016; 32: 38–50.
50. Tizon, Belen et al.: Induction of Autophagy by Cystatin C: A Mechanism That Protects Murine Primary Cortical Neurons and Neuronal Cell Lines. *PLoS ONE*, 2010.

51. Lee D. C., Womble T. A., Mason C. W., Jackson I. M., Lamango N. S., Severs W. B., Palm D. E.: 6-Hydroxydopamine induces cystatin C-mediated cysteine protease suppression and cathepsin D activation. *Neurochem. Int.*, 2017; 50: 607–618.
52. Nishiyama K, Konishi A, Nishio C, raki-Yoshida K, Hatanaka H, Kojima M, Ohmiya Y, Yamada M, Koshimizu H: Expression of cystatin C prevents oxidative stress-induced death in PC12 cells. *Brain Res Bull*, 2005; 67: 94–99.
53. Wang, X.-F., Liu, D.-X., Liang, Y., Xing, L.-L., Zhao, W.-H., Qin, X.-X., Shang, D.-S., Li, B., Fang, W.-G., Cao, L., Zhao, W.-D., and Chen, Y.-H: Cystatin C Shifts APP Processing from Amyloid- β Production towards Non-Amyloidgenic Pathway in Brain Endothelial Cells. *PLoS One*, 2016.
54. Nagai, A. et al.: Neuronal cell death induced by cystatin C in vivo and in cultured human CNS neurons is inhibited with cathepsin B. *Brain Res*, 2005; 1066: 120–128.
55. Xie X, Wang HT, Li CL, et al.: Ginsenoside Rb1 protects PC12 cells against betaamyloid-induced cell injury. *Mol Med*, 2010; 3: 635–639.
56. Ghidoni R, Paterlini A, Albertini V, et al.: Cystatin C is released in association with exosomes: a new tool of neuronal communication which is unbalanced in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of aging*, 2011; 32: 1435-1442.
57. Perlenfein, T. J., Mehlhof, J. D., Murphy, R. M: Insights into the mechanism of cystatin C oligomer and amyloid formation and its interaction with beta-amyloid. *Journal of Biological Chemistry*, 2017.
58. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonovic 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 B*, 2009; 41: 1685–1696.
59. Pišlar AH, Zidar N, Kikelj D, Kos J: Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology*, 2013.
60. Pišlar A, Kos J: Cysteine cathepsins in neurological disorders. *Mol Neurobiol.*, 2014; 49: 1017–1030.
61. https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-cathepsin-x-z-p-protein-cf_934-cy (datum zadnjega dostopa 21.8.2018).
62. Pečar Fonović U, Janko K: Efficient removal of cathepsin L from active cathepsin X using immunoprecipitation technique. *Acta Chimica Slovenica*, 2009; 56: 985–988.
63. Sung Y. J., Cheng C. L., Chen C. S., Huang H. B., Huang F. L., Wu P. C., Shiao M. S. and Tsay H. J: Distinct mechanisms account for beta-amyloid toxicity in PC12 and differentiated PC12 neuronal cells. *J. Biomed. Sci.*, 2003; 10: 379–388.

64. Misiti F, Sampaolesi B, Pezzotti M, et al.: AB(31-35) peptide induce apoptosis in PC 12 cells: Contrast with AB(25-35) peptide and examination of underlying mechanisms. *Neurochem Int.*, 2005; 46: 575-83.