

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MELISA FAZLIĆ

**VLOGA IN LOKALIZACIJA GAMA-ENOLAZE V CELIČNI LINIJI RAKA
DEBELEGA ČREVEESA CACO-2**

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MELISA FAZLIĆ

**VLOGA IN LOKALIZACIJA GAMA-ENOLAZE V CELIČNI LINIJI RAKA
DEBELEGA ČREVEESA CACO-2**

**THE FUNCTION AND LOCALIZATION OF GAMMA-ENOLASE IN COLON
CANCER CACO-2 CELL LINE**

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom dr. Tjaše Vižin, mag. farm. Konfokalno mikroskopijo sem opravljala na Inštitutu Jožef Štefan.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Janku Kosu za priložnost opravljanja magistrske naloge in strokovne nasvete. Za vodenje in praktične nasvete tekom raziskovalnega dela se iskreno zahvaljujem somentorici dr. Tjaši Vižin, mag. farm. Hvala tudi za spodbudo, zaupanje, potrpežljivost in skrbnost pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo za prijaznost in pomoč.

Posebna zahvala gre moji družini in prijateljem za spodbudo in podporo tekom študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom dr. Tjaše Vižin, mag. farm.

Melisa Fazlić

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	II
KAZALO PREGLEDNIC.....	III
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1 UVOD	1
1.1 Enolaza.....	1
1.2 Aktivacija in inhibicija enolaze	2
1.3 Vloga enolaze	2
1.4 Vloga enolaze pri povečani glikolizi pri raku.....	3
1.5 Gama-enolaza	3
1.6 Gama-enolaza kot nevrotrofični dejavnik.....	5
1.7 Katepsin X	7
1.7.1 Katepsin X in gama-enolaza.....	9
1.8 Aktin	10
1.8.1 Aktin in gama-enolaza.....	12
2 NAMEN DELA.....	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 Materiali.....	15
3.1.1 Reagenti in kemikalije	15
3.1.2 Standardi in protitelesa	17
3.1.3 Laboratorijska oprema	18
3.1.4 Pufri in raztopine	19
3.1.5 Celična linija.....	21

3.1.6	Gojišča	21
3.2	Metode	23
3.2.1	Delo s celičnimi kulturami	23
3.2.2	Konfokalna mikroskopija	24
3.2.3	Zmanjšanje izražanja gama-enolaze z malo interferenčno RNA	26
3.2.4	Priprava celičnih lizatov	27
3.2.5	Merjenje koncentracije proteinov po Lowry-ju.....	27
3.2.6	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS PAGE).....	28
3.2.7	Prenos western in detekcija proteinov	30
3.2.8	zaporedno označevanje s protitelesi (Stripping)«.....	32
3.2.9	Ko-immunoprecipitacija	32
3.2.10	xCELLigence RTCA DC – analiza migracije celic v realnem času.....	34
3.2.11	Statistična analiza	36
4	REZULTATI.....	37
4.1	Gama-enolaza se nahaja v citoplazmi celic in se kolokalizira z β -aktinom	37
4.2	Zmanjšanje izražanja gama-enolaze z uporabo male interferenčne RNA	38
4.3	Izolacija kompleksa gama-enolaze in β -aktina in detekcija s prenosom western	40
4.4	Migracija celic Caco-2 ob zmanjšanem izražanju gama-enolaze z utišanjem.....	42
4.6	Migracija celic ob dodatku peptida, ki predstavlja C-končni del gama-enolaze ..	44
4.5	Kolokalizacija gama-enolaze in katepsina X.....	45
5	RAZPRAVA	47
6	SKLEPI	51
7	LITERATURA.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz reakcije, katalizirane z enolazo.	1
Slika 2: Shematski prikaz terciarne strukture $\gamma\gamma$ dimera gama-enolaze.	4
Slika 3: Lokalizacija aktivnega mesta in PDZ domene na C-končnem delu gama-enolaze.	5
Slika 4: Kolokalizacija gama-enolaze in γ -1-sintrofina v človeških nevroblastomskih celicah SH-SY5Y ob normalnem in prekomernem izražanju katepsina X.	6
Slika 5: Shematski prikaz terciarne strukture prokatepsina X.	8
Slika 6: Kolokalizacija gama-enolaze in katepsina X v celični liniji U87-MG.	10
Slika 7: Polimerizacija G aktina (monomerni aktin) do F aktina (filamentozni aktin).	11
Slika 8: Kolokalizacija gama-enolaze in aktina v celični liniji SH-SY5Y.	12
Slika 9: Primer umeritvene krivulje za določanje koncentracije proteinov v celičnih lizatih.	28
Slika 10: Shematski prikaz aparature za NaDS PAGE.	29
Slika 11: Shematski prikaz iBlot prenašalnega sistema.	31
Slika 12: Shema poteka ko-imunoprecipitacije.	33
Slika 13: CIM plošča in prikaz sestavnih delov pri analizi migracije celic v realnem času.	35
Slika 14: Kolokalizacija gama-enolaze in β -aktina v celicah Caco-2.	38
Slika 15: Rezultati detekcije necepljene gama-enolaze in β -aktina s prenosom po western ter prikaz grafa z normaliziranimi rezultati.	40
Slika 16: Ko-imunoprecipitacija gama-enolaze (necepljene in celokupne) in aktina v imunoprecipitatih in supernatantih ter prikaz grafov z normaliziranimi rezultati.	42
Slika 17: Prikaz migracije celic Caco-2.	43
Slika 18: Prikaz migracije celic Caco-2.	44
Slika 19: Kolokalizacija necepljene gama-enolaze in katepsina X v celicah Caco-2.	46

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljeni reagenti in kemikalije ter njihovi proizvajalci.	15
Preglednica 2: Uporabljena primarna in sekundarna protitelesa ter standardi in njihovi proizvajalci.	17
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema in proizvajalci.	18

POVZETEK

Gama-enolaza je citoplazemski encim, ki pretvarja 2-fosfoglicerat v fosfoenolpiruvat v glikolizni poti, in se prekomerno izraža pri raku. Poleg vloge v glikolizni poti ima gama-enolaza še druge funkcije, ki niso odvisne od njene glikolitične aktivnosti. V nevronskih celicah je gama-enolaza preko dodatnega aktivnega mesta na C-koncu udeležena pri preživetju celic in spreminjanju aktina, ki je ključen proces za razrast nevrinov in migracijo celic. Podobno bi lahko bila vključena tudi v migracijo tumorskih celic in s tem imela, poleg udeležnosti v povečani glikolizi, še dodatno vlogo pri napredovanju raka. Nevrotrofično aktivnost gama-enolaze uravnava katepsin X, ki odcepi zadnji dve aminokislini s C-konca gama-enolaze in tako prepreči njen prenos do plazemske membrane, kar je pogoj za njeno nevrotrofično delovanje.

V okviru magistrske naloge smo določili lokalizacijo in vlogo gama-enolaze v celični liniji raka debelega črevesa Caco-2. S fluorescenčno konfokalno mikroskopijo smo dokazali, da se gama-enolaza nahaja predvsem v citoplazmi in to v okolici jedra, kjer delno kolokalizira z β -aktinom. Interakcijo med gama-enolazo in β -aktinom smo potrdili tudi s koimunoprecipitacijo. Dokazali smo tudi, da je gama-enolaza udeležena v migraciji celic Caco-2, saj je zmanjšanje njenega izražanja vodilo v manjšo migracijo celic. Zmanjšana migracija celic bi lahko bila posledica zmanjšane celokupne glikolize. Zato smo celicam dodali 30 aminokislin dolg peptid, ki predstavlja C-končni del gama-enolaze in ne vsebuje aktivnega mesta, odgovornega za glikolizo, vsebuje pa dodatno aktivno mesto, odgovorno za nevrotrofično aktivnost. Po dodatku peptida je bila migracija celic Caco-2 večja. To nakazuje, da gama-enolaza preko dodatnega aktivnega mesta na C-koncu molekule poveča proliferacijo tudi tumorskih celic. Gama enolaza se veže tudi na aktin in uravnava njegovo polimerizacijo. Gama-enolaza in katepsin X v celicah Caco-2 ne kolokalizirata, zato katepsin X najverjetneje ne cepi C-končnega dela gama-enolaze in posledično ne uravnava njene funkcije v celicah Caco-2. Naši rezultati kažejo, da bi bilo za zmanjšanje delovanja gama-enolaze pri napredovanju raka potrebno tako uravnavanje njene glikolitične aktivnosti, kot tudi aktivnega mesta na njenem C-koncu.

KLJUČNE BESEDE: gama-enolaza, rak, Caco-2, aktin, migracija, katepsin X

ABSTRACT

Gamma-enolase is a cytoplasmic enzyme which transforms 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate in the glycolytic pathway. It is overexpressed in cancer. Gamma-enolase could have many other functions that are independent on its glycolytic activity. In neuronal cells, gamma-enolase is involved in cell survival and actin remodelling, a key process for neurite growth and cell migration. This function is achieved through an additional active site at the C-terminus. Similarly, gamma-enolase could be included in migration of tumor cells. The activity of gamma-enolase is regulated by carboxypeptidase cathepsin X, which cleaves the last two amino acids from the C-terminal end and prevents the transfer of gamma-enolase to the plasma membrane, a prerequisite for its neurotrophic action. Within the master's thesis we determined the localization and the role gamma-enolase in the colon cancer Caco-2 cell line. Using fluorescence confocal microscopy, we demonstrated that gamma-enolase localizes mainly in the cytoplasm around the nucleus and partly colocalizes with β -actin. The interaction between gamma-enolase and β -actin was confirmed by co-immunoprecipitation. We have shown that gamma-enolase is involved in migration of Caco-2 cells, which was diminished by reduction of its expression. Reduced migration of cells could be a consequence of reduced overall glycolysis. Therefore, a 30 amino acids long peptide representing the C-terminal end of gamma-enolase containing C-terminal neurotrophic active site, but not glycolytic one, was added to the cells. The peptide promotes the migration of Caco-2 cells. This indicates that gamma-enolase through additional C-terminal active site increases the activity of cancer cells. Gamma enolase also binds actin and regulates its polymerization. Gamma-enolase and cathepsin X do not colocalize in Caco-2 cells, therefore cathepsin X is not likely to cleave the C-end of the gamma-enolase and to regulate its function. Our results indicate that in order to reduce cancer progression, both, the control of its glycolytic activity of gamma enolase and additional active site at its C-terminus would be necessary.

KEYWORDS: gamma-enolase, cancer, Caco-2, actin, migration, cathepsin X

SEZNAM OKRAJŠAV

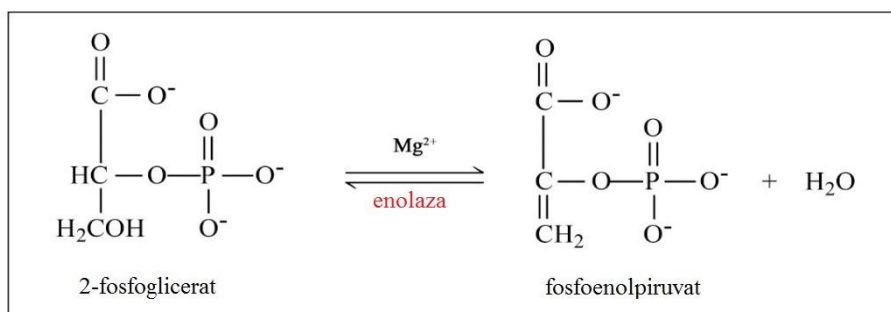
Arp	»ang. <i>actin-related protein</i> «, aktinu podobni proteini
ATP	Adenozintrifosfat
bp	bazni par
BSA	»ang. <i>bovine serum albumin</i> «, goveji serumski albumin
CIM	»ang. <i>cell invasion and migration</i> «, celična invazija in migracija
Da	Dalton
DAPI	diamino-fenilindol, fluorescenčno barvilo za obarvanje jeder celic
dH ₂ O	destilirana voda
DMEM	»ang. <i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i> «, gojišče za celične kulture
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetraacetat
F aktin	filamentozni aktin
FBS	»ang. <i>fetal bovine serum</i> «, fetalni goveji serum
G aktin	globularni aktin
GTP	Gvanozintrifosfat
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonska kislina
L-glu	L-glutamin
MAPK	z mitogenom aktivirana protein kinaza
MBP-1	C-myc promotor-vezoči protein 1
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
NaDS (SDS)	natrijev dodecilsulfat
NSE	nevronska specifična enolaza

Obr/min	obrat na minuto
P/S	penicilin in streptomycin
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	fosfatni pufer
PC12	nesmrtna celična linija tumorja sredice nadledvične žleze (feokromocitom)
PDZ	»ang. postsynaptic density-95/Discs large/zona occludens«, domena prvič identificirana v PSD-95, Discs large in ZO-1
PI3K	fosfatidil inozitol 3-kinaza
RNA	ribonukleinska kislina
RTCA	»ang. Real-time cell analyzer«, analizator celic v realnem času
SH-SY5Y	nesmrtna celična linija celic perifernega živčevja (nevroblastom)
siRNA	mala interferenčna ribonukleinska kislina
TBS	»ang. Tris-buffered saline«, pufer Tris
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
TTBS	pufer Tris z dodanim Tween 20®

1 UVOD

1.1 Enolaza

Enolaza ali 2-fosfo-D-glicerat hidroliaza sodi v skupino encimov liaze s klasifikacijsko številko EC.4.2.1.11. Enolaza katalizira pretvorbo 2-fosfoglicerata v fosfoenolpiruvat v poti glikolize (Slika 1). Pri procesu glukoneogeneze pa katalizira reverzibilno reakcijo – hidracijo fosfoenolpiruvata v 2-fosfoglicerat (1). Enolazo sta prvič odkrila Lohmann in Meyerhof leta 1934 v ekstraktu kunčje mišice. Prisotna je v vseh organizmih, ki so zmožni glikolize ali fermentacije (2).



Slika 1: Prikaz reakcije, katalizirane z enolazo (3).

Enolaza je lahko v obliki homodimera ali heterodimera, sestavljenega iz podenot α , β in/ali γ . Aktivna oblika encima je dimer (4). Podenote α , β in γ kodirajo trije različni geni: ENO1, ENO2 in ENO3 (5). Njihovo izražanje je odvisno od številnih fizioloških, patofizioloških, metaboličnih in drugih pogojev v celici (6), zato nimajo funkcije hišnih genov. α -enolaza je sestavljena iz dveh podenot α in se nahaja v fetusu in večini tkiv odraslega človeka. Tekom razvoja se izoencim $\alpha\alpha$ v srčni mišici nadomesti z izoencimoma $\alpha\beta$ in $\beta\beta$ (β -enolaza), v skeletnih mišicah pa z $\beta\beta$ izoencimom. V nevronih in neuroendokrinih tkivih se α -enolaza zamenja z izoencimoma $\alpha\gamma$ in $\gamma\gamma$ (gama-enolaza). Znotraj celic se enolaza večinoma nahaja v citoplazmi, α -enolaza pa je prisotna tudi na celični membrani, v jedru in v zunajceličnem prostoru (4).

Podenote α , β in γ se lahko nahajajo v treh konformacijskih stanjih: v zaprti konformaciji v kompleksu z 2-fosfogliceratom ali inhibitorji, v delno zaprti konformaciji v kompleksu s fosfoenolpiruvatom, in v odprti konformaciji v odsotnosti substratov ali njihovih analogov (1).

1.2 Aktivacija in inhibicija enolaze

Enolaza je metaloencim, ki za stabilizacijo in katalitično aktivnost potrebuje divalentne katione – najpogosteje je to Mg^{2+} , ki se vežejo v aktivno mesto vsake izmed podenot (4). Vezava prvega kationa povzroči konformacijsko spremembo, drugi pa se veže, ko je prisoten substrat in na ta način aktivira encim (1). Tudi kationi Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} in Ni^{2+} lahko vplivajo na aktivacijo encima (4). Poleg aktivacije je pomembna tudi inhibicija encima. Raziskave so pokazale, da sta fluoridni anion (F^-) in fosfatni ion (P_i) pomembna pri inhibiciji enolaze. Sam F^- ne povzroči velike inhibicije, v kompleksu s P_i pa je inhibicija zelo močna. Prvi anion F^- se veže na podenoto, na katero sta že vezana Mg^{2+} in P_i , drugi pa se veže po vezavi drugega Mg^{2+} in inhibira encim. Jakost inhibicije je različna od prisotnosti različnih aktivacijskih kationov, vsekakor pa je najmočnejša v prisotnosti Mg^{2+} (1). Na obseg inhibicije vpliva tudi koncentracija Mg^{2+} , P_i in F^- - povečanje koncentracije vodi k zmanjšanju inhibicije. Dodatek substrata povzroči sprostitvev F^- ionov iz kompleksa. Optimalni pH za delovanje encima je 6,5 (2).

1.3 Vloga enolaze

Enolaza je udeležena v glikolizi, enemu izmed najbolj razširjenih in pomembnih procesov v živem svetu, pri katerem nastajajo visokoenergijske molekule ATP (4). Poleg katalitične funkcije v glikolizi ima enolaza tudi druge regulatorne funkcije in pomembno vlogo pri različnih patoloških in patofizioloških procesih, vključno z rakom. Dokazali so, da encim enolaza tvori interakcije s številnimi citoplazemskimi, jedrnimi in membranskimi molekulami.

Najbolj raziskana je α -enolaza. V celičnem jedru se nahaja alternativna spojitevna oblika α -enolaze, imenovana C-myc promotor-vezoči protein 1 (MBP-1), za katero so ugotovili, da zavira transkripcijo protoonkogenega Myc in s tem deluje kot tumorski supresor. Zaradi lizina, ki se nahaja na C-koncu molekule, ima α -enolaza vlogo receptorja za plazminogen na celični membrani monocitov, limfocitov T in B, nevronov in endotelijskih celic ter na ta način uravnava fibrinolitično aktivnost. Kot receptor za plazminogen je še posebej pomembna pri miogenezi in regeneraciji mišic. S koncentriranjem plazmina na površini vnetnih in mišičnih celic vzpostavi normalno homeostazo v poškodovanem mišičnem

tkivu. Raziskave so pokazale tudi to, da deluje α -enolaza kot nevrotrofični dejavnik, in sicer se ta funkcija kaže preko C-končnega lizina, saj njegova odcepitev vodi v zmanjšano preživetje nevronov. Encim enolaza se veže tudi na fragmente filamentoznega aktina in tubulina, pa tudi na druge glikolitične encime (6).

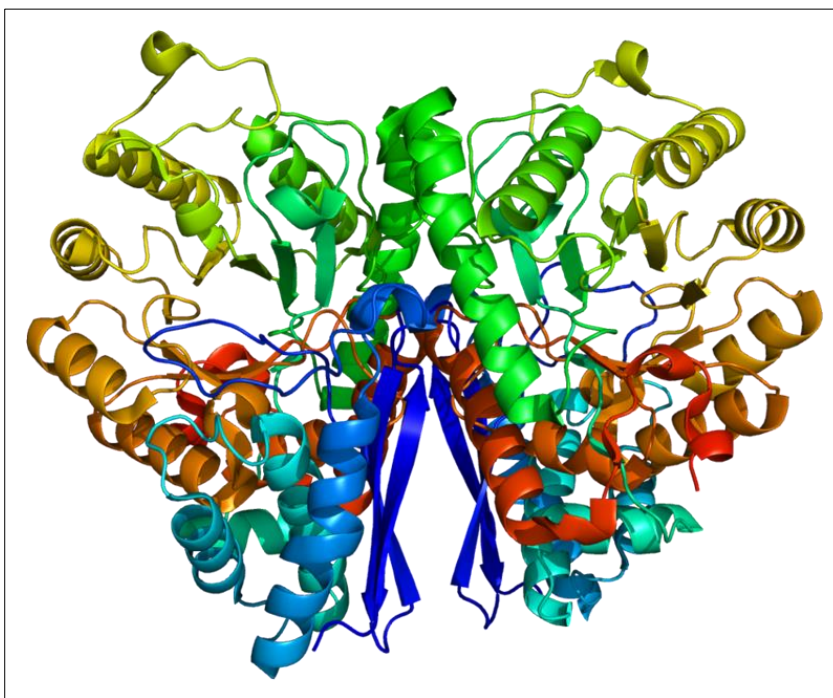
1.4 Vloga enolaze pri povečani glikolizi pri raku

V tumorskih celicah je proces glikolize močno povečan. V tumorjih, ki so slabo oskrbovani s krvjo, so celice izpostavljene okolju z zelo malo kisika. Zato namesto oksidativne fosforilacije v mitohondrijih, ki je energijsko bistveno učinkovitejša, tumorske celice energijo pridobivajo predvsem z aerobnim pretvarjanjem glukoze v laktat, za kar prisotnost kisika ni potrebna. Ker pri tem nastane manj molekul ATP, so celice prisiljene privzemati več glukoze in pospešiti proces glikolitičnih reakcij, da bi zadovoljile energijske potrebe (4). Tumorske celice uporabljajo glukozo tudi kot izvor ogljika za anabolne reakcije (7). Preklopu iz oksidativne fosforilacije v aerobno glikolizo pravijo tudi Warburgov fenomen. To omogoča tumorskim celicam, da preživijo in razraščajo, neglede na prisotnost kisika v njihovi okolici (4).

Zaradi razporeditve v več tkivih, je α -enolaza opisana kot ključni encim v glikolitični poti. Povečano izražanje α -enolaze je značilno za več vrst raka, kot so glioblastom, rak glave in vratu, rak trebušne slinavke in rak prostate. Pri nedrobnoceličnem pljučnem raku so pokazali, da se α -enolaza prekomerno izraža in vpliva na povečano glikolizo, proliferacijo, migracijo, invazijo in napredovanje raka (8). Tako kot α -enolaza, se tudi gama-enolaza prekomerno izraža pri več vrstah raka, za kar bi lahko bila odgovorna njena katalitična vloga pri glikolizi (4).

1.5 Gama-enolaza

Gama-enolaza ali nevronska-specifična enolaza (NSE) je dimerni protein, ki ga predstavljata izoencima $\alpha\gamma$ in $\gamma\gamma$ (Slika 2). Sestavljena je iz 433 aminokislin, molekulska masa encima pa je 78 kDa. Na C-končnem delu ne vsebuje lizina, zato bi lahko imela drugačne funkcije v celici kot α -enolaza (4).



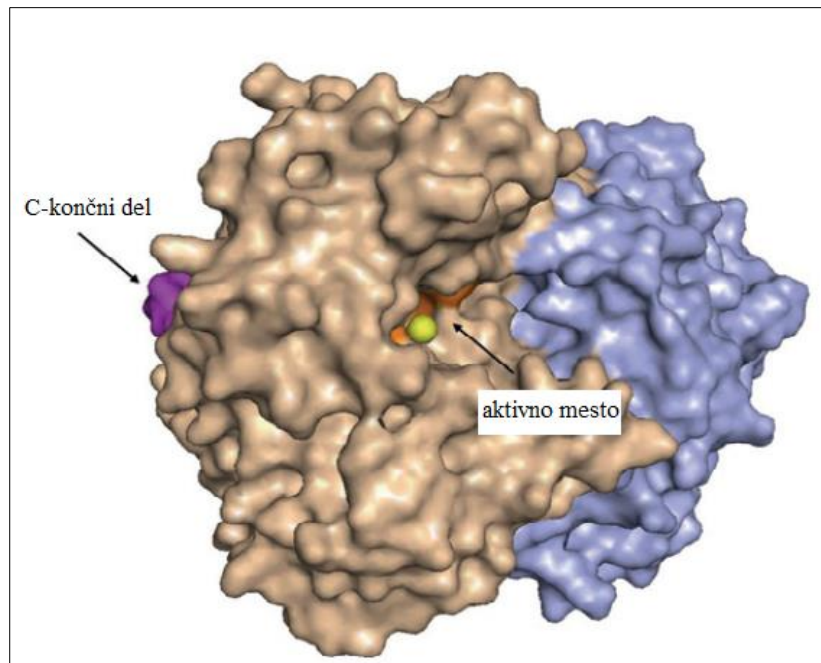
Slika 2: Shematski prikaz terciarne strukture $\gamma\gamma$ dimera gama-enolaze, ki vsebuje alfa-vijačnice in beta-verige (9).

Gama-enolazo so prvič izolirali iz ekstrakta možganskega tkiva, kasneje pa so jo opazili tudi v neuroendokrinih celicah in neuroendokrinih tumorjih (10). V nevronih in neuroendokrinih celicah prevladuje izoencim $\gamma\gamma$, v ne-nevronske in ne-neuroendokrinih celicah pa je prisoten predvsem izoencim $\alpha\gamma$. Gama-enolaza je zelo stabilna v bioloških tekočinah in kot topen citoplazemski encim z lahkoto prehaja v zunajcelični matriks po poškodbi celične membrane (11). Tako se po poškodbi možganskega tkiva sprosti v cerebrospinalno tekočino in posledično tudi v kri, obseg sproščanja pa je proporcionalen poškodbi (10). Povišana koncentracija gama-enolaze je zato pomemben pokazatelj obsega poškodbe možganov, kot so poškodbe glave, encefalitis, epilepsija, možganska kap, akutni miokardni infarkt in možganski tumor, uporabna pa je tudi kot histološki označevalec različnih možganskih tumorjev (12). Gama-enolaza je najpomembnejši tumorski označevalec pri drobnoceličnem pljučnem raku, kjer se uporablja predvsem za napoved poteka bolezni, za diferencialno diagnozo in za spremljanje uspešnosti kemoterapije. Povišana je tudi pri raku ščitnice in nevroblastomu (4, 13).

Gama-enolaza je v bioloških tekočinah prisotna v nizkih koncentracijah, in sicer med 3 in 14 $\mu\text{g/L}$ (14). Prisotna je tudi v eritrocitih, zato lahko že blaga hemoliza vodi v lažno povišano koncentracijo encima v serumu (do petkrat) (11). V manjših količinah se nahaja tudi v trombocitih, tkivu dojk, prostate in maternice (4).

1.6 Gama-enolaza kot nevrotrofični dejavnik

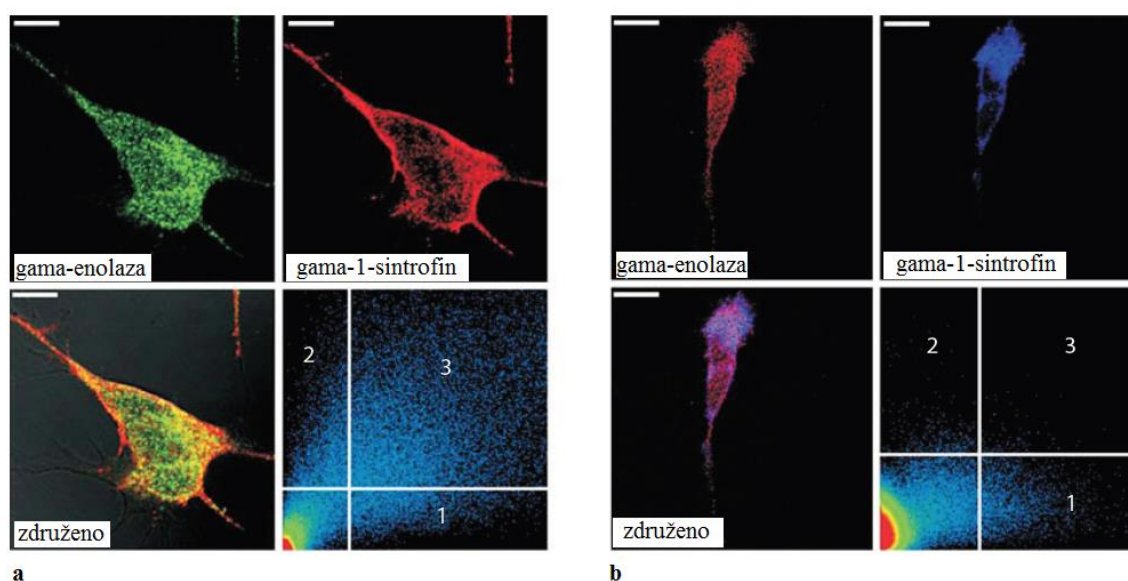
Nevrotrofični dejavniki so proteini, ki so ključni pri razvoju in preživetju nevronov ter vzdrževanju njihovih specifičnih povezav. Gama-enolaza sodi med nevrotrofične dejavnike, saj z aktivacijo fosfatidil inozitol 3-kinazne (PI3K) in z mitogenom aktivirane protein kinazne (MAPK) signalne poti uravnava preživetje, regeneracijo in diferenciacijo nevronov. Za to vlogo je ključna domena PDZ na C-končnem delu gama-enolaze, ki je sestavljena iz treh aminokislin: serina, valina in levcina (15). C-končni del gama-enolaze z domeno PDZ je odmaknjen od aktivnega mesta, odgovornega za katalizo pretvorbe 2-fosfoglicerata v fosfoenolpiruvat v poti glikolize (Slika 3) (4).



Slika 3: Lokalizacija aktivnega mesta in domene PDZ na C-končnem delu gama-enolaze. Podenoti sta prikazani z različnima barvama. Aktivno mesto in C-končni del, ki vsebuje 6 aminokislin, sta prikazana le na eni podenoti. Kofaktor Mg²⁺ je prikazan z rumeno kroglico (4).

Za peptid, ki predstavlja C-končni del gama-enolaze, so dokazali, da ima nevrotrofično aktivnost, ko je vezan na membrano nevronske celice. Za usmerjanje proteinov proti celični membrani so odgovorni ogrodni proteini, ki izboljšajo učinkovitost in specifičnost prenosa signalov. V primeru gama-enolaze je pomemben ogrodni protein γ -1-sintrofin, ki preko domene PDZ veže C-končni peptid gama-enolaze in ga prenese do membrane, kar je pogoj za aktivacijo signalnih poti PI3K in MAPK in nevrotrofično delovanje (16).

Pomembno vlogo pri uravnavanju nevrotrofične aktivnosti gama-enolaze ima lizosomska cisteinska proteaza katepsin X, ki postopoma odcepi zadnji dve aminokislini levцин in valin na C-koncu in s tem poruši strukturo domene PDZ in interakcijo gama-enolaze z γ -1-sintrofinom. V človeških nevroblastomskih celicah SH-SY5Y se gama-enolaza in γ -1-sintrofin vežeta v stabilen kompleks, katerega stabilnost se poruši v celicah s prekomernim izražanjem katepsina X. S fluorescenčno konfokalno mikroskopijo so pokazali, da gama-enolaza in γ -1-sintrofin kolokalizirata v periplazemskem membranskem prostoru in vzdolž nevitov. Kolokalizacija je bila manjša v celicah s prekomerno izraženim katepsinom X (Slika 4) (16).



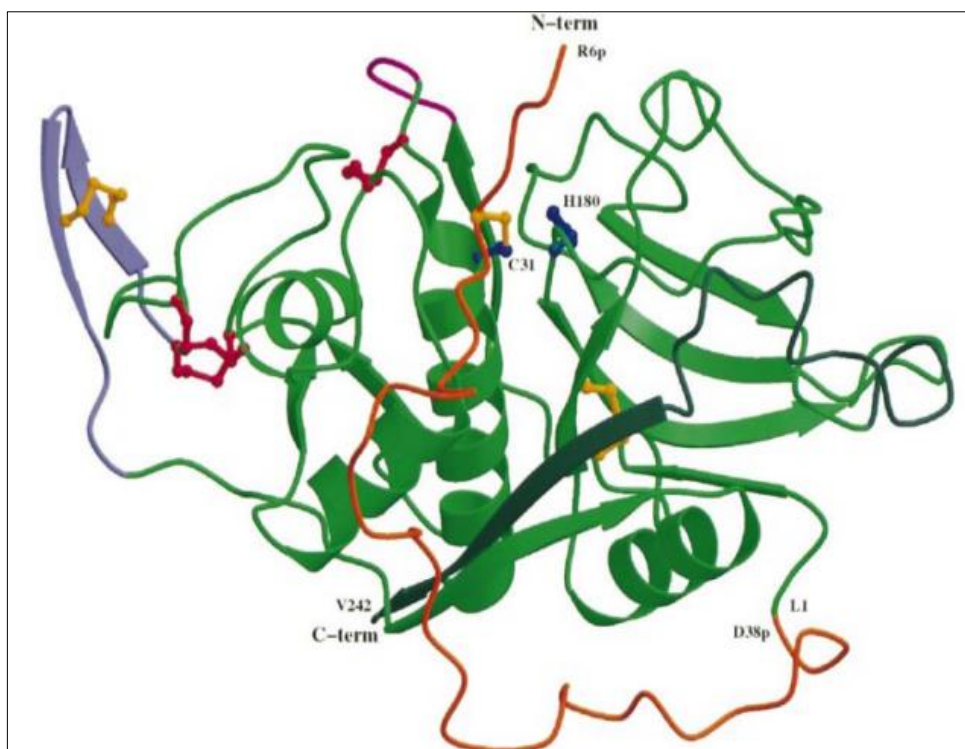
Slika 4: Kolokalizacija gama-enolaze in γ -1-sintrofina v človeških nevroblastomskih celicah SH-SY5Y ob normalnem (a) in prekomernem izražanju katepsina X (b). Desno spodaj je na diagramu prikazana ocena kolokalizacije. Pri popolni kolokalizaciji poteka diagram diagonalno. Več kot je pikselov v tretjem kvadrantu, večja je kolokalizacija. a Gama-enolaza in γ -1-sintrofin kolokalizirata predvsem na membran celice. b Ob prekomernem izražanju katepsina X, gama-enolaza in γ -1-sintrofin manj kolokalizirata. (povzeto po 16).

Gama-enolaza je bila kot dejavnik preživetja predlagana tudi pri rakavih celicah, vendar mehanizem še ni raziskan. Pri glioblastomskih celičnih linijah, izpostavljenih stradanju in hipoksičnim pogojem, se je izražanje gama-enolaze povečalo, z zmanjšanjem njenega izražanja z utišanjem pa se je zmanjšala proliferacija, migracija in preživetje glioblastomskih celic v hipoksičnih pogojih. Gama-enolaza je pri napredovanju raka tako lahko udeležena na dva načina: kot encim glikolitične poti in morebiti kot dejavnik

preživetja tumorskih celic. Zaradi tega je gama-enolaza obetavna tarča za razvoj novih učinkovin za zdravljenje raka (4, 17).

1.7 Katepsin X

Katepsin X je lizosomska cisteinska proteaza. Proteaze katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v polipeptidni verigi, pri čemer lahko delujejo kot eksopeptidaze ali endopeptidaze (18). Katepsin X deluje predvsem kot karboksi-monopeptidaza, saj odceplja po eno aminokislino iz C-končnega dela svojih tarč. Encim je monomer, sestavljen iz dveh domen, pri čemer na N-končnem delu prevladujejo alfa-vijačnice, na C-končnem delu pa beta-verige. Domeni se pri vrhu ločita in oblikujeta aktivno mesto z reaktivnimi aminokislinskimi ostanki – histidin 180 in cistein 31. Katepsin X sestavlja 242 aminokislin, od tega 11 cisteinov, izmed katerih jih 10 tvori disulfidne vezi (19). Pro-oblika katepsina X vsebuje kratko pro-regijo, ki poteka vzdolž žleba v katerem se nahaja aktivno mesto in preprečuje dostop substratu in tako uravnava proteolitično aktivnost encima. Pro-regija dodatno uravnava aktivnost katepsina X z disulfidno vezjo med cisteinom 10, ki je del pro-regije in cisteinom 31 v aktivnem mestu. Za aktivacijo katepsina X je zato nujno, da se ta disulfidna vez prekine in omogoči umik pro-regije iz aktivnega mesta. Pro-oblika katepsina X vsebuje edinstvene še tri od šestih disulfidnih vezi glede na druge cisteinske proteaze (20). Značilnost strukture so tudi trije aminokislinski ostanki (izolevcin 24, prolin 25, glutamin 26), ki oblikujejo tako imenovano »mini zanko« in imajo pomembno vlogo pri specifičnosti katepsina X. Tirozin 27 na eni strani zanke oblikuje S1 vezavno mesto za substrat, histidin 23 z druge strani zanke pa uravnava karboksi-monopeptidazno in karboksi-dipeptidazno aktivnost encima z vezavo C-končnih karboksilnih skupin substrata (19). V strukturi je prisotno tudi vstavljeno zaporedje, z zaenkrat še neznano vlogo (20).



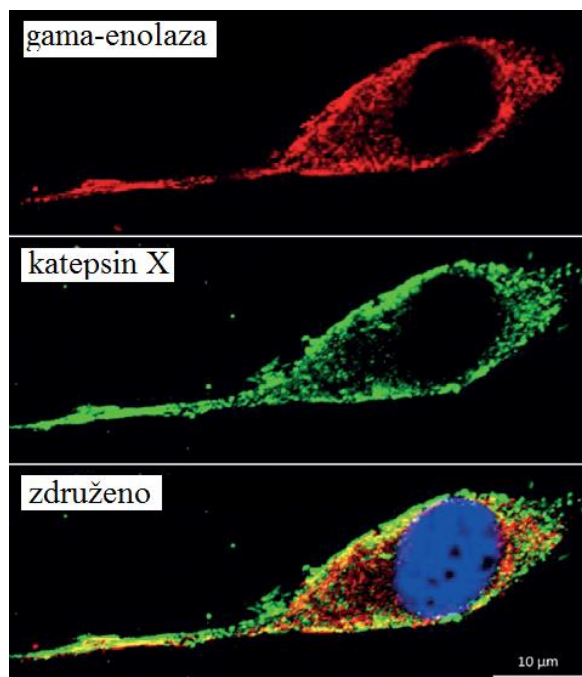
Slika 5: Shematski prikaz terciarne strukture prokatepsina X. Proregija je prikazana z rjavo barvo, aktiven encim z zeleno, zadnjih 25 aminokislin na C-koncu temno-zeleno, mini zanka z roza barvo, vstavljeno zaporedje z vijolično, disulfidne vezi z rdečo, unikatne pa z rumeno. Z modro barvo sta prikazana histidin 180 in cistein 31, ki sta del aktivnega mesta (20).

Poleg vloge v lizosomski razgradnji proteinov, je katepsin X pomemben v številnih drugih celičnih procesih (19). Izražanje katepsina X je omejeno na nekatere celice imunskega sistema, predvsem monocite, makrofage in dendritične celice, katepsin X pa regulira procese proliferacije, migracije in adhezije imunskih celic, fagocitoze in prenos signalov. Ob aktivaciji imunskih celic pride do povečanega izražanja katepsina X in njegovega izločanja iz celic. Povišane vrednosti katepsina X so tako opazili pri vnetnih procesih in nekaterih vnetno pogojenih nevrodegenerativnih boleznih, infekcijah s *Helicobacter pylori*, obsežnih poškodbah in pri tuberkulozi. Poleg tega je vključen tudi pri nastanku in napredovanju raka. Povečano izražanje katepsina X so zaznali pri raku prostate, raku želodca, raku debelega črevesa in danke, pjučnem raku, raku jeter in malignem melanomu. Povišane vrednosti katepsina X so običajno povezane z napredovanjem raka in z zmanjšanim preživetjem bolnikov. Obe obliki katepsina X sta udeleženi pri napredovanju raka, tako aktivna s svojo proteolitično aktivnostjo, kot pro-oblika, ki z vezavo pro-regije na druge molekule uravnava njihovo delovanje. Do sedaj so odkrili že številne tarče katepsina X, med njimi so kemokin CX-CL12 (21), integrinski receptor $\beta 2$ (22), profilin

(23, 24) in gama-enolaza (25). Z njihovo cepitvijo katepsin X uravnava adhezijo, migracijo in invazijo tumorskih celic. Preko pro-regije se katepsin X lahko veže na proteoglikane heparan sulfata (26) in integrinske receptorje $\beta 3$ (22, 27, 28) in uravnava adhezijo in migracijo tumorskih celic (29).

1.7.1 Katepsin X in gama-enolaza

Katepsin X zaporedoma odcepi zadnji dve aminokislini iz C-končnega dela gama-enolaze (levcin na mestu 433 - 433L in valin na mestu 432 - 432V) in s tem poruši strukturo domene PDZ in prepreči interakcijo gama-enolaze z drugimi molekulami (25). Katepsin X in gama-enolaza se močno izražata in kolokalizirata v človeški celični liniji nevroblastoma (SH-SY5Y) in v podganji celični liniji feokromocitoma (PC12). V obeh so pokazali, da dodatek peptida, ki predstavlja C-končni del gama-enolaze, poveča aktivacijo signalnih poti PI3K in MAPK in poveča preživetje, regeneracijo in diferenciacijo celic ter razrast nevrinov. Tega učinka pri za dve končni aminokislini krajšem peptidu (brez 433L in 432V), ki predstavlja cepljeno gama-enolazo, ali ob dodatku rekombinantnega katepsina X, ni bilo, kar kaže na pomembnost intaktnega C-konca gama-enolaze in vlogo katepsina X. Inhibicija proteolitičnega delovanja katepsina X z njegovim specifičnim inhibitorjem ali zmanjšanje njegovega izražanja z malo interferenčno RNA, je vodilo v povečano preživetje celic ter manjše število apoptotičnih celic. Vse to dokazuje, da katepsin X vpliva na nevrotrofično aktivnost gama-enolaze (15,16,25). Gama-enolaza in katepsin X kolokalizirata v človeških glioblastomskih celicah (U87-MG) (Slika 6). Predvidevajo, da je gama-enolaza, podobno kot v nevronskih celicah, udeležena pri prilagajanju rakavih celic na stresne pogoje, kot sta stradanje in hipoksija, pri čemer njeno funkcijo uravnava katepsin X (4).

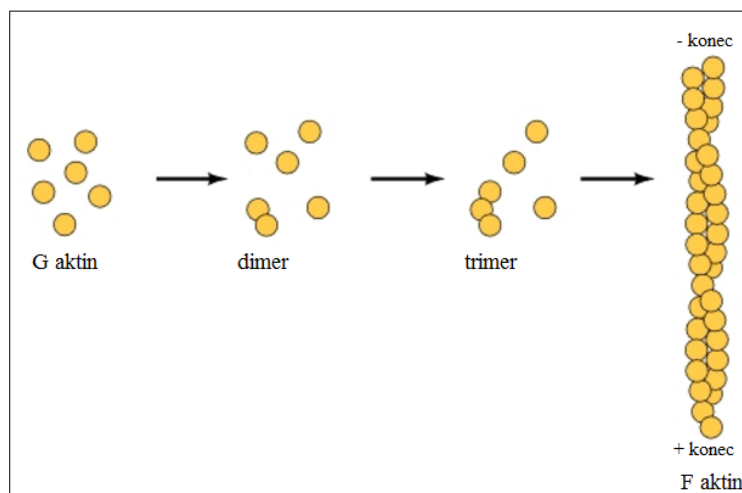


Slika 6: Kolokalizacija gama-enolaze in katepsina X v celični liniji U87-MG. Gama-enolaza je označena s kozjimi poliklonskimi protitelesi proti N-končnemu delu gama-enolaze (rdeča barva). Aktivni katepsin X je označen z mišjimi monoklonskimi protitelesi (zelena barva). Celično jedro pa je obarvano z DAPI (modra barva). Kolokalizacija je prikazana z rumeno barvo (povzeto po 4).

1.8 Aktin

Aktin je najpomembnejši citoskeletni protein. Pri sesalcih kodira za aktin šest genov, in sicer α -aktin, izražen v skeletnih mišicah, v gladkih mišicah in v srčni mišici, γ -aktin v gladkih mišicah ter citoplazemska β -aktin in γ -aktin, ki se izražata povsod (30). Molekula aktina je sestavljena iz 375 aminokislin, pri čemer imajo posamezne vrste aktina podobno sekvenco (31).

Monomerna oblika aktina je globularni aktin (G aktin), ki s polimerizacijo tvori filamentozni aktin (F aktin). Prva stopnja v polimerizaciji je nukleacija, ki zajema tvorbo agregatov iz treh monomernih aktinov (Slika 7). Na pozitivni konec filamentoznega aktina se agregati vežejo 5-10 krat hitreje v primerjavi z minus koncem (31).



Slika 7: Polimerizacija G aktina (monomerni aktin) do F aktina (filamentozni aktin) (31).

Polimerizacija aktina je reverzibilen proces, saj aktinski filamenti depolimerizirajo le, ko je to potrebno, oba procesa pa uravnava aktin-vezoči proteini, npr. kofilin, profilin in Arp2/3 proteini. Dinamična tvorba in razgrajevanje filamentov z odcepljanjem aktinskih podenot sta ključni pri premikanju celic in spreminjanju njihove oblike (31). Vloga aktinskega citoskeleta pri migraciji celic je pomembna pri embrionalnem razvoju, obnavljanju tkiv, imunskemu odzivu in pri številnih boleznih. Pri raku ima remodelacija aktinskih filamentov ključno vlogo pri migraciji in invaziji tumorskih celic, kar omogoča angiogenezo, invazijo in metastaziranje tumorja (32).

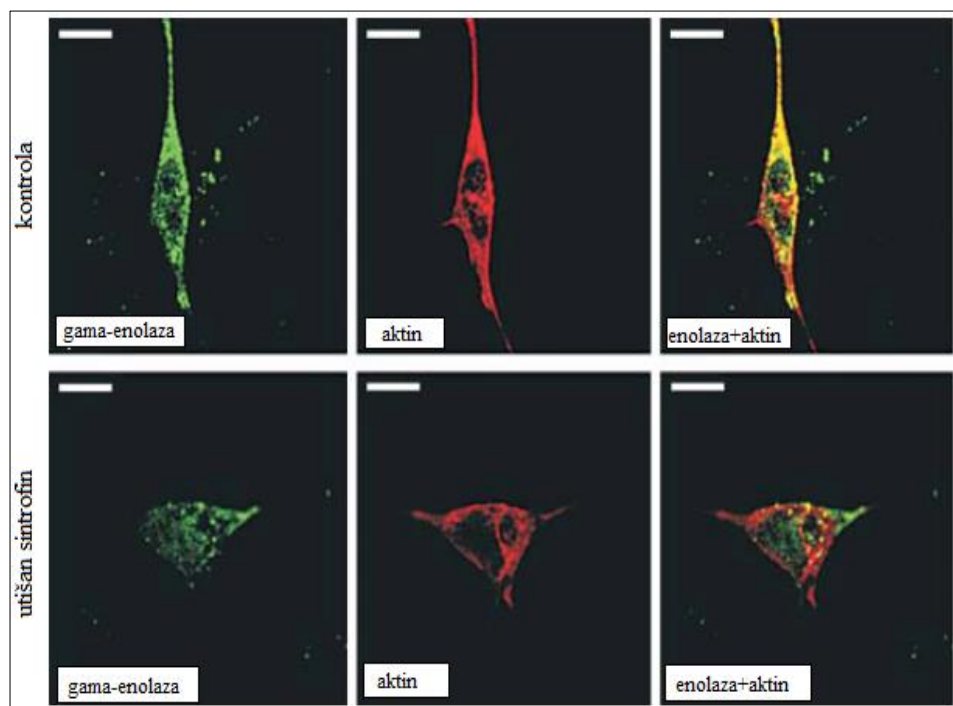
Spremembe v izražanju aktinskih izoform so povezane s patološkimi celičnimi procesi. Tako ima β -aktin vlogo pri ameboidnem gibanju, ki je ključno za prehod tumorskih celic v obtok. V nekaterih tumorskih celicah se β -aktin prekomerno izraža, kar vodi v povečano migracijo celic. Izražanje je odvisno tudi od invazivnosti tumorja. Študije so pokazale, da je pri invazivnem sarkomu β -aktin bolj izražen v primerjavi z neinvazivnim. Pri človeških celičnih linijah adenokarcinoma črevesa z višjim metastatskim potencialom (EB3, 3LNLN, 5W) pa so pokazali, da je β -aktin bolj koncentriran na membrani v primerjavi z materinsko celično linijo (LS180), kar potrjuje povezavo med povečanim izražanjem β -aktina in večjo gibljivostjo celic (33).

Aktinski filament pa imajo tudi druge vloge. Pri kvasovkah sodelujejo pri endocitozi, vendar sam mehanizem ni še pojasnjen. Poleg tega imajo aktinski filament v obliki obroča pomembno vlogo pri citokinezi pri glivah, amebah in živalih. Pri evkariontih miozin razreda V prenaša po aktinskih filamentih organele in mRNA do mesta rasti celic. Skupaj z miozinom sodeluje aktin tudi pri kontrakciji mišičnih celic (34).

1.8.1 Aktin in gama-enolaza

Migracija celic je proces oblikovanja izboklin na membrani (protruzija) kot odgovor na kemotaktične signale. Pogoj za membransko protruzijo je polimerizacija aktinskih filamentov na submembranskem področju. Strukture, ki nastanejo, so imenovane filopodiji, lamelipodiji in invadopodiji, odvisno od strukture, morfologije in funkcije. Izražanje molekul, ki pošiljajo signale za polimerizacijo aktina, pri tumorskih celicah pogosto ni uravnano, zato se poveča njihova invazija in migracija (32).

Pri človeški celični liniji nevroblastoma SH-SY5Y, aktinski filamenti kolokalizirajo z gama-enolazo na perimembranskem področju v odvisnosti od izražanja γ -1-sintrofina (Slika 8). Ob zmanjšanju izražanja γ -1-sintrofina z utišanjem je kolokalizacija aktina z membrano manjša, saj se zmanjša prenos gama-enolaze do membrane. Sintrofini se s C-končnim delom vežejo na distrofine, za katere je znano, da se vežejo na aktin, zato predvidevajo, da γ -1-sintrofin predstavlja povezavo med aktinom in gama-enolazo (16).



Slika 8: Kolokalizacija gama-enolaze in aktina v celični liniji SH-SY5Y. V prvi vrstici je prikazana kolokalizacija v kontrolnih celicah, v drugi vrstici pa kolokalizacija ob zmanjšanju izražanja γ -1-sintrofina z malo interferenčno RNA. Iz slik je razvidno, da je kolokalizacija gama-enolaze in aktina manjša ob utišanju ogrodnega proteina γ -1-sintrofina (povzeto po 16).

V istih nevroblastomskih celicah so pokazali, da gama-enolaza z necepljenim C-koncem indirektno vpliva na polimerizacijo in redistribucijo aktina na mesta rasti celic, in sicer preko kinaze RhoA (Rho GTP-aza). Kinaza RhoA, ko se nahaja na membrani celic, inhibira remodelacijo aktina in na ta način zmanjša razrast nevrinov. Gama-enolaza preko aktivacije PI3K signalne poti vpliva na prenos kinaze RhoA iz membrane v citosol in tako inhibira delovanje tega encima, kar vodi v polimerizacijo in redistribucijo aktina na mesta rasti celic (15).

2 NAMEN DELA

Gama-enolaza je citoplazemski encim glikolitične poti, ki se prekomerno izraža pri raku in s svojo glikolitično aktivnostjo prispeva k pospešeni glikolizi, ki je glavni vir energije tumorskih celic. Udeležena je tudi v številnih drugih procesih, ki pa v tumorskih celicah niso raziskani. V nevronskih celicah je gama-enolaza preko dodatnega aktivnega mesta na C-koncu udeležena pri povečanem preživetju celic in pri remodelaciji aktina, ki je ključen proces za razrast nevrinov in migracijo celic. Zaradi vpliva na remodeliranje aktinskega citoskeleta bi lahko bila vključena tudi v migracijo tumorskih celic in s tem imela, poleg udeležnosti v povečani glikolizi, še dodatno vlogo pri napredovanju raka.

Namen magistrske naloge je ugotoviti lokalizacijo in vlogo gama-enolaze v migraciji celic človeške epiteljske celične linije raka debelega črevesa Caco-2.

V prvem delu magistrske naloge bomo s konfokalno mikroskopijo preverili lokalizacijo gama-enolaze v celicah človeške epiteljske celične linije raka debelega črevesa Caco-2 ter preverili ali gama-enolaza kolokalizira z β -aktinom. Interakcijo med gama-enolazo in aktinom bomo poskušali dokazati tudi s ko-immunoprecipitacijo. Izražanje gama-enolaze bomo utišali s pomočjo male interferenčne RNA in s ko-immunoprecipitacijo preverili ali se interakcija med gama-enolazo in aktinom s tem zmanjša.

V drugem delu bomo s sistemom za spremljanje migracije celic v realnem času xCELLigence raziskali ali obstaja razlika v migraciji celic, če zmanjšamo izražanje gama-enolaze z uporabo male interferenčne RNA ali če celicam dodamo 30-aminokislinski dolgi peptid, ki predstavlja C-končni del gama-enolaze.

V zadnjem delu magistrske naloge bomo preverili ali gama-enolaza kolokalizira s katepsinom X v celicah Caco-2.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti in kemikalije

Preglednica 1: Uporabljeni reagenti in kemikalije ter njihovi proizvajalci.

Reagent	Proizvajalec
advanced DMEM	Gibco
akrilamid	Sigma
amonijev persulfat	Sigma
reagent za imobilizacijo krovnih stekelc	Molecular Probes™
bromfenol modro	Merck
BSA	Sigma
DMSO	Gibco
DTT	Fluka
EDTA	Sigma
etanol	Stella TECH
FBS	Gibco
formalin	Sigma
glicerol	Fluka
glicin	Sigma
HEPES	Sigma
Hoechst-ov reagent	ThermoFisher Scientific
L-glutamin	Sigma
lipofektamin	Invitrogen
KCl	Riedel-deHaën
KH ₂ PO ₄	Riedel-deHaën
kolagen tipa I	Sigma
komplet za določanje vsebnosti proteinov (DC™ Protein Assay)	Bio Rad
kontrolna mala interferenčna RNA	Santa Cruz Biotechnology

Nadaljevanje Preglednice 1: Uporabljeni reagenti in kemikalije ter njihovi proizvajalci.

Reagent	Prizvajalec
mala interferenčna RNA za utišanje izražanja gama-enolaze: ENO2 siRNA (Stealth™ RNA ENO2): HSS176535 HSS103246 HSS103247	Invitrogen
mala interferenčna RNA za utišanje izražanja katepsina X	Santa Cruz Biotechnology
membrana za prenos proteinov po westernu	Life Sciences
MgCl ₂	Fluka
mleko v prahu	Pomurske mlekarne
NaCl	Kemika
NaDS	Fluka
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Riedel-deHaën
nigrozin	Sigma
PBS	Sigma
Penicilin in streptomycin	Sigma
inhibitor proteaz	ThermoFisher Scientific
protein A sefaroza	Invitrogen
SuperSignal® West Dura	ThermoFisher Scientific
SuperSignal® West Femto	ThermoFisher Scientific
TEMED	Sigma
tripsin	Sigma
Tris baza	Sigma
Triton X	Serva
Tween 20®	Sigma

3.1.2 Standardi in protitelesa

Preglednica 2: Uporabljena primarna in sekundarna protitelesa ter standardi in njihovi proizvajalci.

Protitelesa in standardi	Proizvajalec
Kozja poliklonska protitelesa proti katepsinu X	R&D Systems
Kozja poliklonska protitelesa proti N-končnemu delu gama-enolaze	Santa Cruz Biotechnology
Kozja proti-mišja poliklonska protitelesa, označena s HRP	Millipore
Mišja monoklonska protitelesa proti β -aktinu	Santa Cruz Biotechnology
Kunčja poliklonska protitelesa proti β -aktinu	Sigma
Mišja monoklonska protitelesa proti C-končnemu delu gama-enolaze	Santa Cruz Biotechnology
Oslovska proti-kunčja poliklonska protitelesa, označena s fluoroforom Alexa-Fluor 555	Molecular Probes™
Oslovska proti-kozja poliklonska protitelesa, označena s fluoroforom Alexa-Fluor 555	Molecular Probes™
Oslovska proti-mišja protitelesa, označena s fluoroforom Alexa-Fluor 488	Molecular Probes™
Označevalec velikosti proteinov (SeeBlue® Plus2 Prestained Standard)	Novex by Life technologies

3.1.3 Laboratorijska oprema

Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema in proizvajalci.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
analitska tehtnica	EXACTA 610 EB, Tehnica
avtomatske pipete	Biohit
aparatura za elektroforezo	Bio Rad
avtoklav	A-63 CV, Kambič Laboratorijska oprema
avtomatska večkanalna pipeta	Biohit
celični inkubator	CB 219 BINDER
centrifuga	5415 R, Eppendorf Heraeus Megafuge 16R, Thermo scientific
CIM-ploščice	Roche
G:BOX	Syngene
GeneTools programska oprema	Syngene
gojiščne plastenke za celice	TPP
gojiščne ploščice za celice (6-well, 12-well)	Greiner
iBLOT	Invitrogen
inkubator	WTB Binder
invertni mikroskop	Nikon TMS-F
konfokalni mikroskop	Carl Zeiss Oberkochen DSM 710
komora z laminarnim pretokom zraka	PIO SMBC 183 AV, Iskra PIO LFVP 9, Iskra
pipete (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biohit in Eppendorf
plošče z 96 vdolbinicami za gojenje celic	TPP
pH meter	Rotamix, Tehnica
vibracijsko mešalo	Vibromix 10, Tehnica
sistem xCELLigence	Roche

3.1.4 Pufri in raztopine

Pufri za NaDS PAGE in prenos Western

10-kratni elektroforezni puffer:

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

Dopolnimo z dH₂O do 1 L in uravnamo pH na 8,3. Pred uporabo puffer 10-krat razredčimo z dH₂O.

Nanašalni puffer:

- 2,5 mL 0,5 M Tris HCl (pH 6,8)
- 2,0 mL glicerola
- 4,0 mL 10% NaDS
- 0,5 mL 0,1% bromfenol modro

Dopolnimo z dH₂O do 10 mL.

10-kratni TBS puffer:

- 30 g 250 mM Tris baze
- 80 g 1370 mM NaCl
- 2,2 g 30 mM KCl

Dopolnimo z dH₂O do 1L in uravnamo pH na 7,4.

Puffer za spiranje TTBS (0,1 % Tween 20[®] v pufri TBS):

- 100 mL 10-kratnega TBS
- 1 mL Tween

Dopolnimo z dH₂O do 1 L.

Puffer za spiranje protiteles z membrane:

- 100 mL 5% NaDS

- 10 g 62,5 mM Tris HCl (pH 6,8)
- 3,5 mL 100 mM β -merkaptoetanol

Dopolnimo z dH₂O do 500 mL.

Drugi pufri

PBS:

- 1,8 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
- 0,24 g KH₂PO₄
- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl

Dopolnimo z dH₂O do 1 L in uravnamo pH na 7,4.

0,02% EDTA v PBS:

1 L pripravljenega PBS smo dodali 537 μ L 0,5 M EDTA pH 8,0 ter sterilno prefiltrirali.

3% BSA v PBS:

- 1,5 g BSA
- 50 mL PBS

Lizirni pufer:

- 1,2 g HEPES
- 0,88 g NaCl
- 37,2 mg EDTA
- 1 mL Triton X-100

Dopolnimo z dH₂O do 100 mL in uravnamo pH na 6,5.

Vežalni pufer (0,14 M fosfatni pufer pH 8,2)

- raztopina A: 24,9 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O raztopimo v 1000 mL dH₂O
- raztopina B: 1,9 g KH₂PO₄ raztopimo v 100 mL dH₂O

Raztopini A dodamo raztopino B do vrednosti pH 8,2.

Pufer A:

- 1,6 g Na₂CO₃
- 2,94 g NaHCO₃
- 0,2 g NaN₃

Dopolnimo z dH₂O do 1 L in uravnamo pH na 9,6.

3.1.5 Celična linija

Poskuse smo izvajali na človeški epiteljski celični liniji Caco-2, ki je bila pridobljena iz adenokarcinoma debelega črevesa (ATCC® HTB-37™). Celično linijo Caco-2 smo gojili pri običajnih pogojih gojenja celičnih kultur - 95 % vlažnost, 5% CO₂ in 37°C. Celice Caco-2 so adherentne, kar pomeni da rastejo pritrjene na površino gojiščne plastenke. Ko dosežejo koncentracijo $4 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ celic/cm³ (približno 80 % konfluentnost), moramo celice subkultivirati oziroma precepiti tako, da jih ustrezno razredčimo. Priporočeno je, da pri subkultiviranju celice Caco-2 redčimo v razmerju 1:4 do 1:6 (35).

3.1.6 Gojišča

Kompletno gojišče za celice Caco-2:

- 78 mL Advanced DMEM
- 20 mL FBS
- 1 mL L-glu
- 1 mL P/S

Gojišče ca celice Caco-2 brez seruma:

- 98 mL Advanced DMEM
- 1 mL L-glu
- 1 mL P/S

Gojišče ca celice Caco-2 brez P/S:

- 89 mL Advanced DMEM
- 10 mL FBS
- 1 mL L-glu

Gojišče za transfekcijo celic Caco-2:

- 99 mL Advanced DMEM
- 1 mL L-glu

Gojišče za zamrzovanje celic Caco-2:

- 95 mL kompletnega gojišča
- 5 mL DMSO

3.2 Metode

3.2.1 Delo s celičnimi kulturami

Odmrzovanje celične linije

Delo s celičnimi kulturami poteka v sterilnem okolju – v komori z laminarnim pretokom zraka. Potrebno je uporabljati sterilni pribor in sterilne reagente. Za odmrzovanje celične linije Caco-2 smo pripravili kompletno gojišče za Caco-2 in ga segreli na 37 °C. V centrifugirko smo odpipetirali 10 mL na 37 °C segretega gojišča. Celice smo vzeli iz tekočega dušika jih in dali za 30 s v vodno kopel, segreto na 37 °C. V kriovialo s celicami smo dodali 1 mL gojišča, da smo odtajanje celic pospešili, vse skupaj prenesli v pripravljeno centrifugirko z gojiščem in 5 min centrifugirali 1200 obr/min. Supernatant smo odlili, celice pa resuspendirali v 1 mL gojišča ter jih prenesli v gojiščno platenko z gojiščem.

Gojenje celic

Celice smo gojili v inkubatorju pri 37 °C v atmosferi, nasičeni z vlago in 5 % CO₂. Ko so celice prerastle 70 do 80 % površine platenke, smo celice precepili in ustrezno redčili. Iz platenke smo odstranili gojišče in celice previdno sprali s PBS z 0,02% EDTA. V platenke smo nato dodali PBS z 0,02 % EDTA in tripsin ter 5 do 10 min inkubirali na 37 °C. Pod invertnim mikroskopom smo preverili ali so se celice odlepili od površine. Nato smo jih prenesli v centrifugirko, v katero smo predhodno dali 3 mL kompletnega gojišča. Serum v kompletnem gojišču prekine delovanje tripsina, s čimer zaščitimo celice. Centrifugirali smo 5 min pri 1200 obr/min. Supernatant smo odlili, celice pa resuspendirali v kompletnem gojišču. Celice smo prešteli in uporabili za poskuse, del pa ustrezno razredčili in prenesli v gojiščno platenko za nadaljnje gojenje.

Štetje celic

S pomočjo citometra smo pod mikroskopom določili število celic. Celice smo homogeno resuspendirali. Odvzeli smo 100 µL suspenzije in ji dodali 100 µL nigrozina, ki obarva

mrtve celice. Prešteli smo žive celice v dveh ponovitvah in po enačbi izračunali število celic:

$$N = N' * 2 * 10\ 000 / \text{ml}$$

N ... število celic / ml gojišča

N' ... povprečno število pod mikroskopom prešteti celic

Zamrzovanje celične linije

Najprej smo pripravili gojišče za zamrzovanje celic, ki vsebuje DMSO, kateri prepreči nastajanje kristalov med zamrzovanjem in s tem poškodbo celic. Celice smo centrifugirali 5 min na 1200 obr/min. Supernatant smo odlili, celice pa resuspendirali v gojišču za zamrzovanje (2×10^6 celic/mL) in jih prenesli v krioviale. Te smo čez noč shranili na -70 °C, nato pa prenesli v tekoči dušik, na -196 °C, kar omogoča dolgotrajno shranjevanje celičnih linij.

3.2.2 Konfokalna mikroskopija

Za določanje lokalizacije molekul v celicah in tkivih se poslužujemo imunofluorescence, pri kateri primarna ali sekundarna protitelesa, označena s fluorofori, specifično prepoznavajo določeno molekulo (36). Na podlagi lokalizacije molekul lahko ugotovljamo njihovo biološko vlogo (37).

Med imunofluorescenčne metode sodi konfokalna mikroskopija, ki s skeniranjem fluorescenčno označenih struktur omogoča določitev lokalizacije ter kolokalizacije struktur in molekul. Glavna prednost konfokalne mikroskopije v primerjavi s klasično je možnost eliminacije svetlobe izven fokusa - ustvari ostrejšo sliko tako, da loči svetlobo, zbrano iz opazovane ravnine, od svetlobe ozadja nad in pod ravnino. Skeniranje poteka po točkah v določeni ravnini. Vzpodbujeno fluorescenčno svetlobo iz točk sprejme detektor, ki posamezne signale pretvori v sliko. Ključnega pomena pri skeniranju sta dve zaslonki z majhnimi odprtini. Ena je nameščena za izvorom svetlobe, druga pa pred detektorjem. Prva omogoča osvetljevanje preparata v izbrani točki, druga pa prehod svetlobe iz ene

točke do detektorja. Zaradi majhne odprtine je preprečen vstop svetlobi, ki izhaja iz območja preparata, ki je izven gorišča (37,38).

Izvedba:

Priprava preparatov za mikroskopijo

Za pripravo celic, ki jih bomo opazovali z mikroskopijo, je potrebno celice priraščati na krovna stekelca v gojiščnih ploščah. Uporabili smo ploščo s 24 vdolbinicami, v katere smo položili krovna stekelca. Za boljšo pritrnitev celic smo v vdolbinice s stekelci najprej dodali 400 μ L kolagena tipa I v pufri A in inkubirali 2 h na 37 °C. Medtem smo prešteli celice in pripravili suspenzije z določenim številom celic. Zmes kolagena in pufra A smo nato odstranili in v vdolbinice dodali po 500 μ L pripravljenih celic.

Ploščo s 24 vdolbinicami, v kateri smo priraščali celice, smo pregledali pod mikroskopom in ocenili katera gostota celic je najbolj primerna za izdelavo preparatov. Iz izbranih vdolbinic smo odstranili gojišče in celice previdno sprali z 1 mL PBS. Nato smo celice fiksirali z 10% fomalinom v mrzlem PBS in inkubirali na sobni temperaturi 30 min. Fiksacija omogoča ohranitev strukturne organizacije celice in izboljša pritrnitev na podlago. Po končani inkubaciji smo sprali enkrat z 1 mL PBS in dodali 500 μ L 0,5% raztopine Tween 20[®] v PBS. S tem postopkom smo permeabilizirali celično membrano in omogočili vstop primarnih in sekundarnih protiteles ter fluorokromov. Po 10-minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo dvakrat sprali s PBS. V vdolbinice smo dodali po 700 μ L 3% BSA v PBS in inkubirali 60 min na sobni temperaturi. Na ta način smo zasedeli in zaščitili prosta vezavna mesta in preprečili nespecifično vezavo protiteles. V naslednjem koraku smo pripravili primarna protitelesa v 3% BSA v PBS. Za gama-enolazo smo uporabljali mišja monoklonska protitelesa proti C-končnem delu ali kozja poliklonska protitelesa proti N-končnemu delu, v koncentraciji 7 μ g/mL. Za prepoznavanje β -aktina smo uporabili mišja monoklonska protitelesa, v koncentraciji 100 μ g/mL. Za detekcijo katepsina X smo uporabili kozja poliklonska protitelesa, ki prepoznavajo tako aktivno obliko kot pro-obliko katepsina X. Po odstranitvi blokirnega pufra iz vdolbinic smo dodali po 200 μ L pripravljenih primarnih protiteles in pustili na sobni temperaturi 2 h. Po končani inkubaciji smo celice trikrat sprali z 1 mL PBS. Nato smo dodali sekundarna protitelesa, označena s fluorofori, ki smo jih redčili 1:1000 v 3 % BSA v PBS. Uporabili smo oslovska proti-mišja protitelesa, označena z Alexa Fluor 488 in/ali oslovska proti-kozja označena z

Alexa Fluor 555. V isto raztopino smo dodali tudi reagent Hoechst, ki se veže na DNA v jedru celic in omogoča njegovo vizualizacijo (redčitev 1:200). V vdolbinice smo nanjali po 250 μ L pripravljene raztopine in inkubirali 1,5 h na sobni temperaturi. Na koncu smo stekelca trikrat sprali s PBS. V vdolbinice smo dodali po 500 μ L PBS in pobrali krovna stekelca. Postavili smo jih na papir in jih pustili 30 min, da se posušijo. Na objektna stekelca smo dodali kapljico Pro-long Antifade reagenta, ki zmanjša bledenje fluorescence in pritrdi preparat na stekelca. Posušena krovna stekelca smo položili na objektna in pustili 2 h na sobni temperaturi, da se je antifade posušil. Po inkubaciji smo z lakom oblepili krovna stekelca, da smo preprečili izhlapevanje antifade-a in s tem posušitev preparata in shranili na 4 °C.

Pregled preparatov s konfokalnim mikroskopom

Preparate smo pregledali s konfokalnim mikroskopom Carl Zeiss Oberkochen DSM 710 na Inštitutu Jožef Štefan. Za opazovanje celic smo uporabili 60-kratno povečavo. Ugotavljali smo kolokalizacijo C-končno necepljene gama-enolaze in β -aktina ter kolokalizacijo C-končno necepljene gama-enolaze s katepsinom X.

3.2.3 Zmanjšanje izražanja gama-enolaze z malo interferenčno RNA

Za utišanje gama-enolaze smo nacepili 300.000 celic v 3 mL gojišča brez antibiotika v 25 cm² gojiščne platenke in jih pustili v inkubatorju, da so se pritrdile. Po 24 h in 48 h smo zmanjšali izražanje gama-enolaze z malo interferenčno RNA.

Najprej smo pripravili reagente. Lipofektamin smo v gojišču za transfekcijo redčili v razmerju 1:50 in pustili 5 min pri sobni temperaturi. Z lipofektaminom je potrebno ravnati previdno, saj se ga ne sme stresati. Medtem smo pripravili siRNA, tako da smo jo v gojišču za transfekcijo redčili 1:40. Kot negativno kontrolo smo uporabili kontrolno siRNA, katera na izražanje enolaze ne vpliva. V gojišču za transfekcijo smo jo redčili 1:25. V obe pripravljene raztopini siRNA smo nato v enakem volumskem razmerju dodali pripravljeno raztopino lipofektamina in inkubirali 20 min pri sobni temperaturi.

Iz gojiščnih platenk smo odstranili gojišče in celice previdno sprali s 3 mL gojišča za transfekcijo. V platenke smo nato dodali po 2400 μ L gojišča za transfekcijo in 600 μ L

pripravljenih raztopin lipofektamina in siRNA, zelo previdno premešali ter celice prenesli v inkubator. Po 6 h smo gojišče za transfekcijo zamenjali s kompletnim gojiščem za celice Caco-2.

3.2.4 Priprava celičnih lizatov

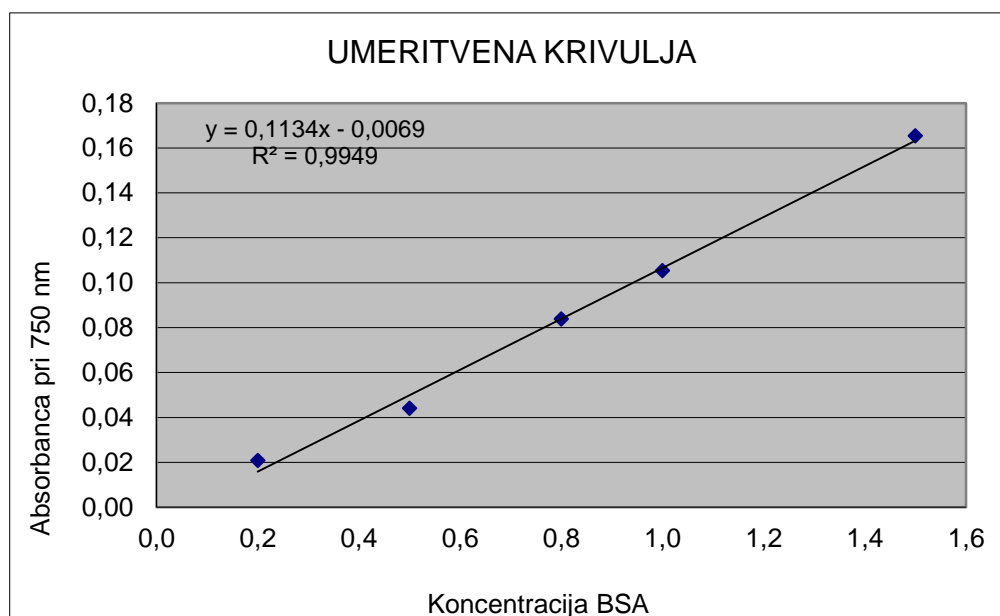
Celice smo najprej sprali s PBS z 0,02 % EDTA in nato dodali mešanico PBS z 0,02 % EDTA in tripsina. Inkubirali smo 5 min v celičnem inkubatorju. Celice smo nato prenesli v centrifugirke ali mikrocentrifugirke in jih centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Supernatant smo odlili, celice pa resuspendirali v sterilnem PBS in jih ponovno centrifugirali pri 2000 obr/min. Celice smo nato takoj prenesli na led in previdno odstranili supernatant. Celicam smo dodali 20-50 μ L lizirnega pufra z dodatkom proteaznega inhibitorja in resuspendirali. Dodatek proteaznega inhibitorja je pomemben za zmanjšanje proteolize v celičnem lizatu, potem razbitju celične strukture. Na ta način ohranimo stanje v celici pred lizo. Lizate smo takoj prenesli na -80 °C. Čez eno uro smo lizate odtajali na ledu in jih mehansko obdelali z ultrazvokom (sonikacija 2 x 4 s), da smo razbili preostale celične strukture. Sledilo je centrifugiranje 15 min pri 15000 g na 4 °C. Supernatante smo predstavili v epice.

3.2.5 Merjenje koncentracije proteinov po Lowry-ju

Koncentracijo proteinov v celičnih lizatih smo določali z DC metodo (Bio-Rad), ki temelji na metodi po Lowry-ju. Metoda temelji na dveh korakih, rezultat pa je pojav modre barve, ki ima absorpcijski vrh pri 750 nm, njegova intenziteta pa je sorazmerna koncentraciji proteinov v raztopini. Prvi korak je reakcija peptidnih vezi z bakrom v bazičnem mediju, drugi pa redukcija Folinskega reagenta. Prednost Bio-Rad-ove DC metode v primerjavi z originalno je, da se modra barva razvije hitreje in je bolj stabilna. Metoda je semikvantitativna, saj moramo za določitev točnih koncentracij v vzorcih najprej pripraviti umeritveno krivuljo s pomočjo standardnih raztopin proteinov. Metoda se uporablja za kvantifikacijo proteinov v območju od 0,2 do 1,5 mg/mL (39).

Izvedba:

Za umeritveno krivuljo smo pripravili standardne raztopine BSA (10 mg/mL) v lizirnem pufri s koncentracijami: 0,2; 0,5; 0,8; 1; 1,5 mg/mL. Vzorce lizatov smo ustrezno redčili, da so ustrezali območju koncentracij umeritvene krivulje. Za izvedbo metode smo potrebovali reagent A', ki smo ga pripravili s pomočjo reagentov A in S, v razmerju 1:50. Na mikrotitrsko ploščo smo nanесли po 5 μ L lizirnega pufra (slepa vrednost), standardov in vzorcev v treh ponovitvah. Nato smo dodali po 25 μ L reagenta A' in 200 μ L reagenta B. Mehurčke smo popokali in ploščo 15 min pustili na sobni temperaturi. Nato smo izmerili absorbanco pri 750 nm. Iz izmerjenih absorbanc standardnih raztopin BSA smo narisali umeritveno krivuljo s pomočjo katere smo preračunali koncentracijo proteinov v naših vzorcih.



Slika 9: Primer umeritvene krivulje za določanje koncentracije proteinov v celičnih lizatih. Graf je nastal tekom dela na magistrski nalogi in ni objavljen drugje.

3.2.6 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS PAGE)

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Sodi v skupino metod, ki omogočajo ločevanje in identifikacijo makromolekul, kot so DNA, RNA in proteini na podlagi celokupnega naboja, oblike in velikosti. Ločevanje molekul poteka v električnem polju po nanosu vzorca na gel (40).

Izvedba:

Pripravili smo aparaturo za elektroforezo. Za ločevanje molekul smo pripravili 12 % ločevalni gel, ki smo ga vlili med stekelci z debelino 1,5 mm. Na vrh gela smo nanесли izopropanol, da se je gel izravnal, odstranil zračne mehurčke na površini gela ter pospešil strjevanje gela. Po 30 min smo odstranili izopropanol in ostanke previdno popivnali s filter papirjem. Nato smo pripravili 5 % koncentracijski gel ter ga vlili nad ločevalni gel do vrha stekelca. Za oblikovanje žepkov smo vstavili glavniček. Gel smo pustili na sobni temperaturi približno 45 min, da se je strdil.

Sledila je priprava vzorcev. Z lizirnim pufrom smo uravnavali koncentracijo proteinov v vzorcih, da je ta bila v vseh enaka. 16 μL vzorca smo dodali 9 μL nanašalnega puфра in DTT, v razmerju 2:1. Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 8 min pri 100 °C, da so se proteini denaturirali.

V kadičko za elektroforezo smo prenesli stekelca s pripravljenim gelom. Prostor med geloma in zunanji prostor smo napolnili z elektroforeznim pufrom. Previdno smo odstranili glavničke. V prvi žepki nanесли 5 μL označevalca velikosti proteinov, s katerim lahko določimo približno molekulsko maso našega proteina in preverimo ustreznost naših protiteles. V ostale žepke smo nanесли po 20 μL vzorcev. Sledil je priklop na elektrode. Elektroforeza je potekala 2 h pri napetosti 100 V.

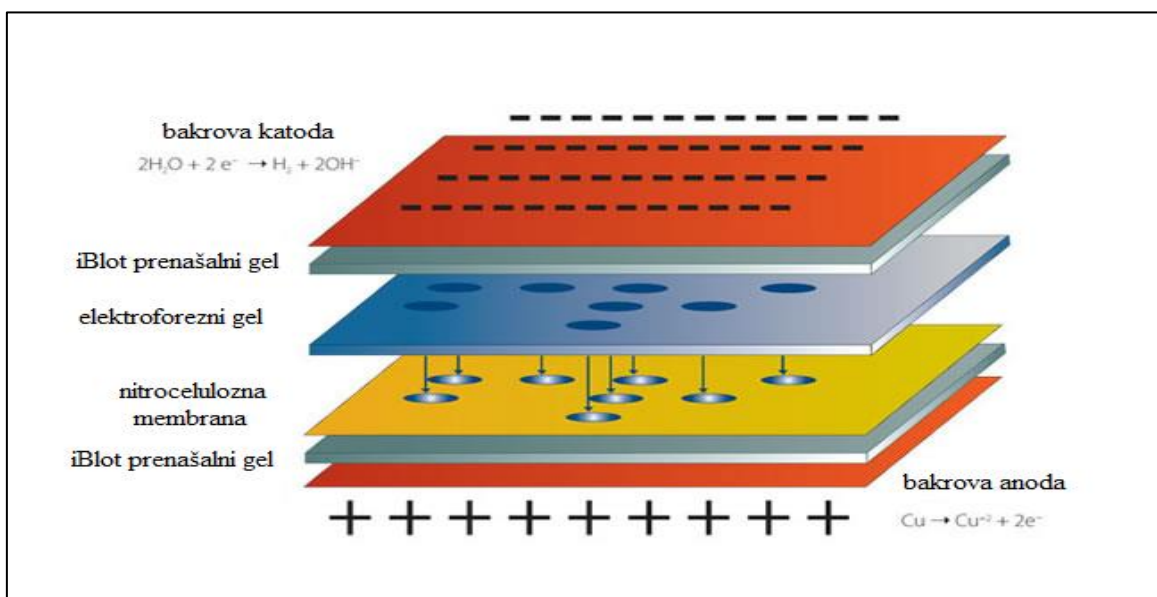
3.2.7 Prenos western in detekcija proteinov

Prenos western je pogosto uporabljena metoda za detekcijo proteinov v vzorcu. Proteine, ločene po velikosti, prenesemo z gela na nitrocelulozno ali najlonsko membrano in jih detektiramo s specifičnimi protitelesi. Po prenosu blokiramo preostala vezavna mesta na membrani in inkubiramo s primarnimi protitelesi, ki se specifično vežejo na iskani protein. Nato se dodajo sekundarna protitelesa, ki so označena z encimom. Z vmesnim spiranjem odstranimo nevezana protitelesa, tako da ostanejo le tista, ki so vezana na iskani protein. Eden od načinov detekcije proteinov pri prenosu western je kemiluminiscenčni (40). Kot rezultat dobimo lise, katerih debelina in intenziteta sta sorazmerni količini proteinov. Velikokrat zaradi neustreznega postopka dobimo nepričakovane rezultate: odsotonost lise, nepričakovan signal, zelo slab signal, pogosto pa je tudi visoko ozadje in pojav neenakomernih lis. Prenos western zahteva optimizirane pogoje pri izvajanju, saj veliko

spremenljivk vpliva na končni rezultat. Metoda sodi v visoko občutljive, a je semikvantitativna. Z uporabo standarda ocenimo relativno količino proteina v vzorcu, saj absolutna kvantifikacija ni mogoča. Možni vzroki so neenakomeren nanos vzorcev, neenakomeren prenos iz gela na membrano in nelinearnost signala v koncentracijskem območju (43).

Izvedba:

Proteine smo z gela prenesli na nitrocelulozno membrano s pomočjo sistema iBLOT. Na označen prostor na aparatu za iBLOT smo položili spodnji nastavek, ki zajema bakrovo anodo, plast prenašalnega gela in nitrocelulozno membrano. Elektroforezni gel smo sneli iz stekelc in ga namočili v dH₂O ter previdno položili na membrano, tako da nismo ustvarili mehurčkov, ki bi motili prenos proteinov. Na gel smo postavili namočen filter papir ter z valjčkom odstranili morebitne preostale mehurčke. Sledil je zgornji del, ki vsebuje prenašalni gel in bakrovo katodo. Na koncu smo na notranjo stran pokrova namestili spužvo, ki med prenosom zagotavlja boljši stik med plastmi. Zagnali smo aparat in počakali 7 min, da so se proteini prenesli na membrano.



Slika 11: Shematski prikaz iBLOT prenašalnega sistema (44).

Po končanem prenosu smo odstranili spužvo, katodni del in filter papir. Membrano smo obrezali ob robovih gela, jo prenesli v 5 % mleko v 0,1 % Tween-u v pufru TBS (TTBS) in stresali 1 h. Nato smo membrano spirali 3-krat po 10 min v TTBS. Dodali smo ustrezna

primarna protitelesa in stresali čez noč na 4 °C. Po inkubaciji smo ponovno spirali s TTBS. Dodali smo sekundarna protitelesa, konjugirana s HRP in stresali 1,5 h. Po zadnjem spiranju je sledila detekcija. Na parafilm smo nanесли mešanico raztopine substratnega pufra in kemiluminiscenčnega substrata v razmerju 1:1 (Super Signal West DURA/FEMTO) in nanjo položili membrano. Inkubirali smo jo 5 min v temi in nato zaščitili s prozorno mapo. Prenesli smo jo v G:BOX s katerim smo detektirali kemiluminiscenco. S pomočjo programske opreme GeneTools smo intenziteto dobljenih lis tudi kvantificirali.

3.2.8 Zaporedno označevanje s protitelesi («Stripping«)

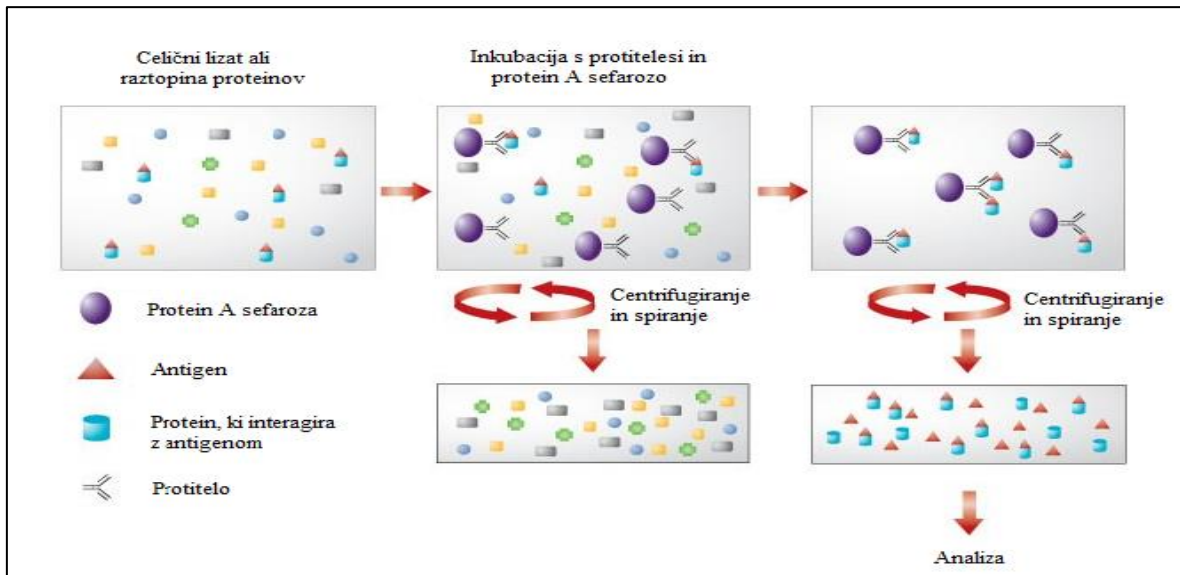
S to metodo smo odstranjevali protitelesa z membrane, z namenom detekcije proteinov na isti membrani z drugimi protitelesi.

Izvedba:

Membrano smo najprej spirali v pufru za spiranje TTBS 20 min, nato pa smo jo stresali v »stripping« pufru 60 min na temperaturi 60 °C. Postopek smo smo izvajali v digestoriju. Po končanem postopku smo membrano ponovno spirali v pufru TTBS in blokirali s 5 % mlekom v pufru TTBS 30 min. V nadaljevanju je bil postopek nanašanja in spiranja protiteles tak kot prej.

3.2.9 Ko-imunoprecipitacija

Pri imunoprecipitaciji uporabljamo specifična protitelesa za izolacijo tarčnega proteina iz raztopine (45). Za razliko od imunoprecipitacije, ko-imunoprecipitacijo uporabljamo za detekcijo interakcij med proteini z uporabo specifičnih protiteles, ki se preko svojega tarčnega proteina indirektno vežejo na protein, ki je v interakciji s tarčnim. Nastale imunske komplekse izoliramo s protein A sefarozo, na katero se vežejo protitelesa preko Fc regije, in jih analiziramo glede vezalnih partnerjev, vezavne kinetike in funkcije tarčnega proteina (46).



Slika 12: Shema poteka ko-immunoprecipitacije (46).

Izvedba:

Celične lizate za ko-immunoprecipitacijo smo pripravili v lizirnem pufru z dodanim proteaznim inhibitorjem. Lizatom smo izmerili koncentracijo proteinov in jo z lizirnim pufrom uravnavali, da je ta bila v vseh enaka (200 μg proteinov / 50 μl lizata). Vsakemu vzorcu smo nato dodali 5 μg protiteles proti β -aktinu in stresali čez noč na 4 $^{\circ}\text{C}$.

Naslednji dan smo pripravili protein A sefarozo. Odpipetirali smo ustrezno količino protein A sefaroze in jo centrifugirali 2 min pri 10000 g. Nato smo odpipetirali zgornjo fazo in protein A sefarozi dodali vezalni pufer (pH 8,2) ter ponovno centrifugirali. Protein A sefarozo smo resuspendirali v vezalnem pufru (pH 8,2).

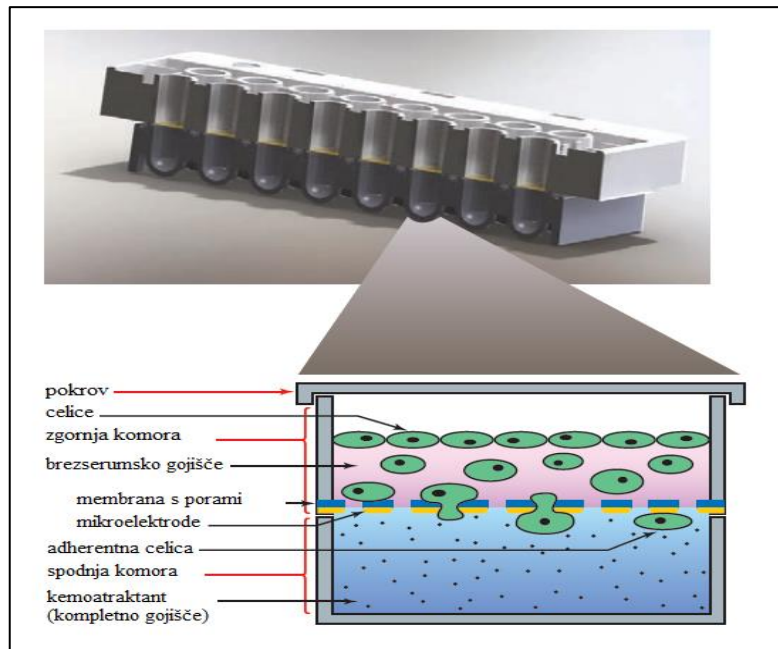
Pripravljeno sefarozo smo dodali vzorcem (po 50 μL sefaroze v vsak vzorec), in stresali 2 h na 4 $^{\circ}\text{C}$. Vzorce smo nato centrifugirali 1 min na 2000 g. Supernatant smo uporabili kot kontrolo, usedlino pa smo 2-krat sprali z vezalnim pufrom (centrifugirali smo 30 s na 2000 g). Vzorcem smo nato dodali nanašalni pufer in DTT, resuspendirali in dali na vodno kopel (100 $^{\circ}\text{C}$) 7 min. S tem so se imunski kompleksi ločili od protein A sefaroze in razpadli. Po centrifugiranju je bila zgornja tekoča faza, ki vsebuje protitelesa uporabljena za imunoprecipitacijo in iskane proteine, pripravljena za nanos na gel. Supernatante, ki smo jih uporabili kot kontrolo, smo tudi pripravili za nanos na gel tako, da smo jim dodali

nanašalni pufer in DTT ter jih dali na vodno kopel (100 °C) 7 min. Vzorce smo nanесли na gel in sledila je elektroforeza, prenos western in analiza rezultatov.

3.2.10 xCELLigence RTCA DC – analiza migracije celic v realnem času

Sistem xCELLigence RTCA (*Real-time cell analyzer* – analizator celic v realnem času) kontinuirano in neinvazivno zaznava odziv celic pri poskusu. Področje uporabe je široko – na primer, opazovanje celične migracije in invazije, citotoksičnost, celična adhezija, proliferacija in diferenciacija. Sistem je sestavljen iz RTCA kontrolne enote in RTCA analizatorja s tremi posameznimi enotami. Za opazovanje migracije celic v realnem času se uporablja plošča CIM (*cell invasion and migration* – celična invazija in migracija) s šestnajstimi vdolbinicami. Vsaka vdolbinica je sestavljena iz zgornje in spodnje komore, ki sta ločeni z membrano (47). Sistem xCELLigence meri indeks celične migracije oziroma spremembo upornosti v določenem časovnem obdobju, s pomočjo zlatih mikroelektrod, ki se nahajajo pod membrano. Celice migrirajo iz zgornje v spodnjo komoro skozi membranske pore zaradi vpliva kemoatraktanta. Pri prehodu pride do kontakta in adhezije celic na električne senzorje, kar povzroči porast električne upornosti, ki je proporcionalna porastu števila celic, ki so migrirale (48).

Pred začetkom poskusa je celice potrebno stradati v gojišču brez seruma vsaj 12 h in jih v istem gojišču nacepiti v zgornjo komoro. Kot kemoatraktant smo uporabili serum FBS, ki se nahaja v kompletnem celičnem gojišču (48).



Slika 13: CIM plošča in prikaz sestavnih delov pri analizi migracije celic (47).

Izvedba:

Za poskus celične migracije smo uporabili ploščo CIM. Na spodnjo stran zgornje plošče smo nanесли kolagen tipa I v koncentraciji 20 $\mu\text{g/mL}$. Na elektrode smo počasi nanесли 30 μL kolagena tako, da smo s kapljico prekrili celotno površino. Inkubirali smo 30 min v komori z laminarnim pretokom zraka (pri sobni temperaturi). Ploščo smo nato previdno obrnili in na zgornji del v vdolbinice nanесли po 50 μL kolagena tipa I v enaki koncentraciji. Pri tem koraku smo bili pri pipetiranju izredno pozorni, saj se ne smejo pojaviti zračni mehurčki, ki bi preprečili enakomerno prekritje s kolagenom. Inkubacija je potekala 2 h v celičnem inkubatorju (pri 37 $^{\circ}\text{C}$). Kolagen smo nato odstranili in sprali vdolbinice s 50 μL PBS.

V naslednjem koraku smo v vsako vdolbinico spodnje plošče CIM dodali 160 μL kompletnega gojišča za celice Caco-2. Zgornjo in spodnjo ploščo smo nato stisnili skupaj in v zgornje vdolbinice dali 100 μL gojišča brez seruma. Tako pripravljeno ploščo smo inkubirali v inkubatorju vsaj 15 min, nato pa z analizatorjem izmerili ozadje, ki mora biti manjše od 0,006.

Nato smo pripravili celice. 24 h pred poskusom smo jih stradali v gojišču brez seruma. Po tripsinizaciji smo celice resuspendirali v brezserumskem gojišču in jih prešteli. V vdolbinice na zgornjem delu plošče CIM smo nanegli po 20.000 celic v 100 μ L. Ploščo smo položili v aparaturo in po 15 minutah zagnali poskus. Sistem je meril spremembe vsakih 15 min naslednjih 96 h.

3.2.11 Statistična analiza

Rezultate smo statistično analizirali s Studentovim t-testom za dva neodvisna vzorca v programu Microsoft Office Excel. Studentov t-test za dva neodvisna vzorca je najpogosteje uporabljena statistična metoda za ugotavljanje statistično značilnih razlik med dvema neodvisno zbranimi skupinama kvantitativnih podatkov. Metoda je primerna za analizo majhnih vzorcev, pri čemer so velikosti vzorcev lahko različne (49). Statistično značilno razliko med vzorcema smo določili, ko je bila vrednost p manjša od 0,05.

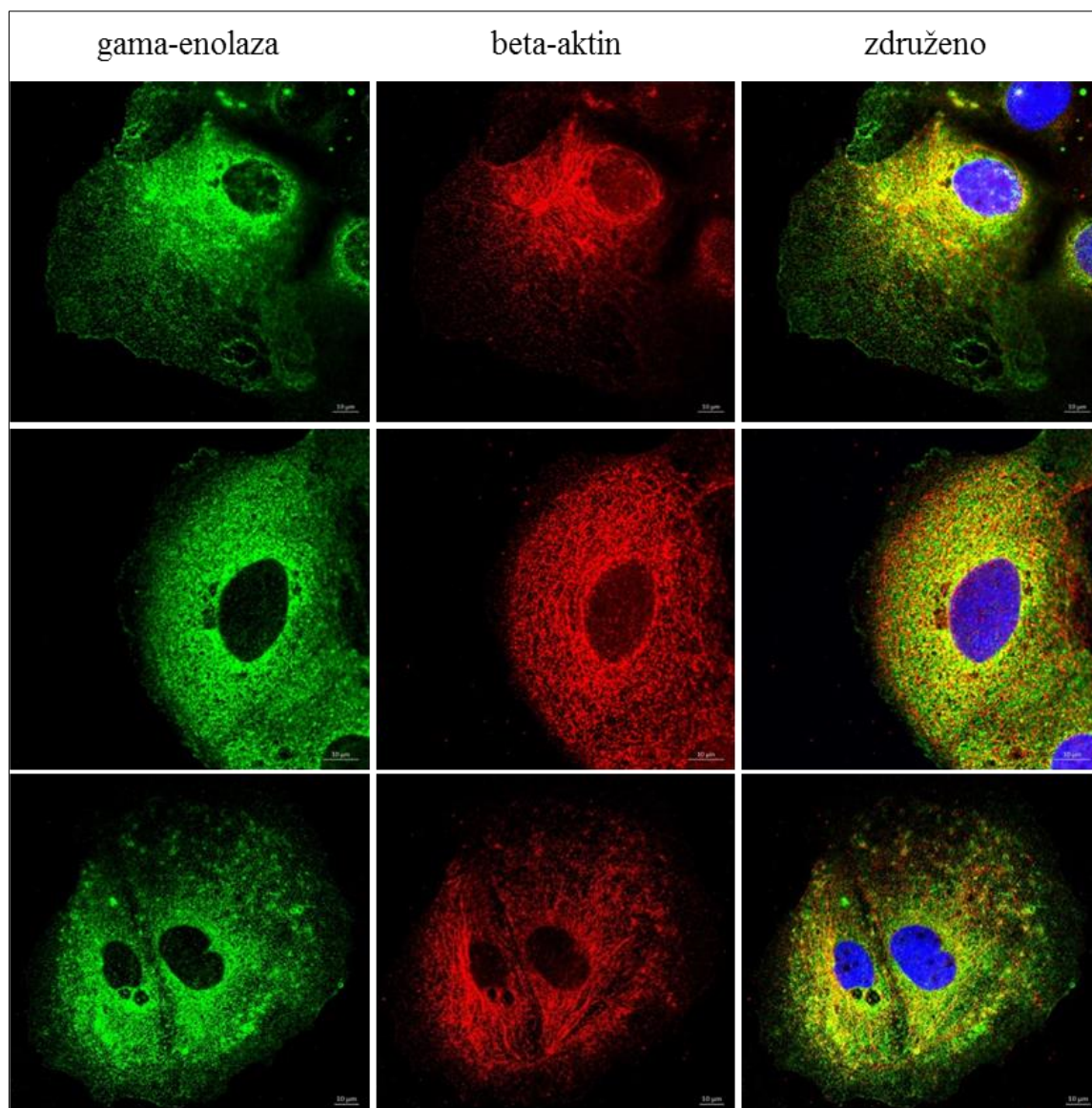
4 REZULTATI

4.1 Gama-enolaza se nahaja v citoplazmi celic in kolokalizira z β -aktinom

V nevroblastomskih celicah se gama-enolaza nahaja v citosolu in na membrani, kjer kolokalizira z aktinskimi filamentami in ima učinek nevtrotrofičnega dejavnika. Zanimalo nas je, kje se gama-enolaza nahaja v celicah Caco-2 ter če kolokalizira z aktinskimi filamentami. Zato smo s fluorescenčno konfokalno mikroskopijo določili lokalizacijo C-končno necepljene gama-enolaze in β -aktina v celični liniji Caco-2.

Za vizualizacijo proteinov v celicah smo uporabili najprej primarna protitelesa, ki prepoznavajo C-končno necepljeno gama-enolazo ali β -aktin in sekundarna protitelesa, označena s fluoroformo Alexa Fluor 488 (prepoznavajo primarna protitelesa proti necepljeni gama-enolazi) in Alexa Fluor 555 (prepoznavajo primarna protitelesa proti β -aktinu). Fluorofori na označenih sekundarnih protitelesih emitirajo po ekscitaciji zeleno oziroma rdečo barvo, s čimer omogočajo vizualizacijo določenih proteinov. Za vizualizacijo jedra smo uporabili Hoechst-ov reagent, ki se veže na jedrne strukture in emitira modro svetlobo. Kolokalizacija gama-enolaze in β -aktina je predstavljena z rumeno barvo (Slika 14).

Ugotovili smo, da se gama-enolaza v celicah Caco-2 nahaja predvsem v citosolu, pri čemer je njeno izražanje večje v okolici jedra. Na membrani je prisotna v manjši meri. Aktin je celično ogrodje in je razporejen po celotni površini celic. Poskus je pokazal, da je prisotna delna kolokalizacija gama-enolaze in β -aktina, in sicer v citoplazmi celic Caco-2, predvsem v okolici jedra.



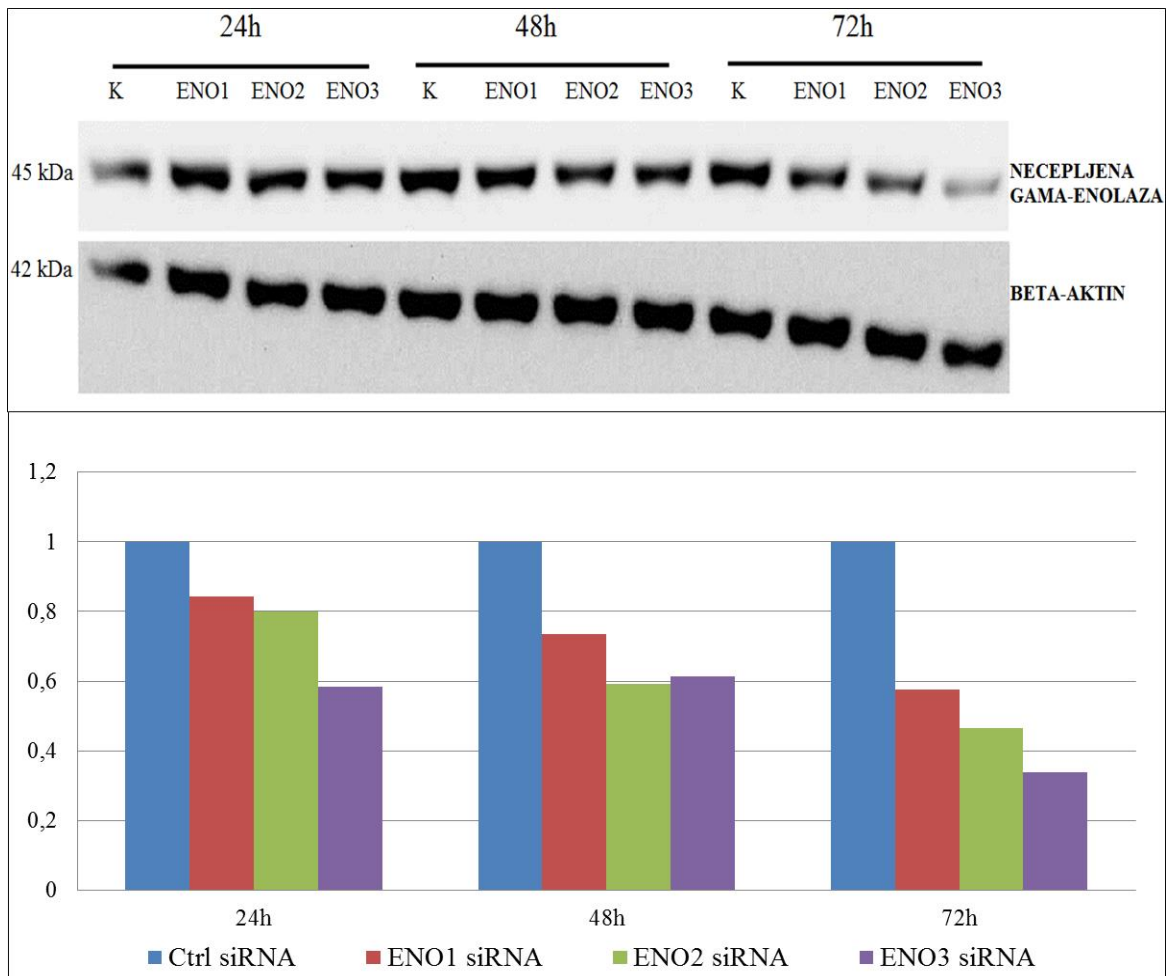
Slika 14: Kolokalizacija gama-enolaze in β -aktina v celicah Caco-2. C-končno necepljeno gama-enolazo smo označili s mišjimi protitelesi proti C-končnemu delu in nato z oslovskimi proti-mišjimi protitelesi, označenimi z Alexa Fluor 488 (zelena barva). β -aktin smo označili s kunčjimi protitelesi proti β -aktinu in nato še z oslovskimi protikunčjimi protitelesi, z vezanim fluoroforom Alexa Fluor 555 (rdeča barva). Iz slik je razvidno, da je prisotna kolokalizacija gama-enolaze in β -aktina (rumena barva).

4.2 Zmanjšanje izražanja gama-enolaze z uporabo male interferenčne RNA

V nadaljevanju nas je zanimalo ali ima zmanjšanje izražanja gama-enolaze vpliv na interakcijo z β -aktinom. Najprej nas je zanimalo, s katero malo interferenčno RNA, ki jo imamo na voljo, dosežemo največje zmanjšanje izražanja gama-enolaze v celicah Caco-2.

V celični liniji Caco-2 smo utišali gama-enolazo s tremi različnimi malimi interferenčnimi RNA - siRNA (ENO1 siRNA, ENO2 siRNA in ENO3 siRNA), ki so usmerjene proti različnim delom RNA za gama-enolazo. Kot kontrolo smo uporabili kontrolno siRNA (K). 24, 48 in 72 h po utišanju smo pripravili celične lizate ter izmerili koncentracijo proteinov. Vzorcem smo uravnali koncentracijo z lizirnim pufrom in jih nanegli na gel za SDS PAGE. Sledila je elektroforeza in prenos Western. Po blokiranju in nanosu primarnih mišjih monoklonskih protiteles proti C-končnemu delu gama-enolaze ter sekundarnih kozjih poliklonskih proti-mišjih protiteles označenih s HRP smo dodali substrat SuperSignal[®] West Dura in s pomočjo G:BOX-a in programa GeneTools analizirali nastale lise. Za primerjavo intenzitete lis med seboj smo določili intenziteto lis β -aktina v celičnih lizatih, katerega koncentracija v celicah ni odvisna od različnih fizioloških in patoloških procesov in se ne spreminja. Na ta način smo izključili morebiten vpliv neenakomernega nanosa vzorca ali razlik v koncentraciji celokupnih proteinov v vzorcih. V ta namen smo z membrane odstranili protitelesa proti gama-enolazi ter dodali druga primarna protitelesa - mišja monoklonska proti β -aktinu in nato še sekundarna protitelesa.

Intenzitete lis, ki predstavljajo izražanje gama-enolaze v celicah smo normalizirali z intenziteto lis β -aktina. Po normalizaciji rezultatov smo ugotovili, da se izražanje gama-enolaze v celicah Caco-2 najbolj zmanjša z uporabo ENO3 siRNA in sicer v vseh treh opazovanih časovnih točkah. Po 24 h in 48 h je bilo izražanje gama-enolaze za 40% nižje, po 72 h pa skoraj 70% nižje v primerjavi s kontrolo (Slika 15). Zato smo v nadaljevanju za izvajanje poskusov, v katerih smo zmanjšali izražanje gama-enolaze z malo interferenčno RNA, uporabili ENO3 siRNA.



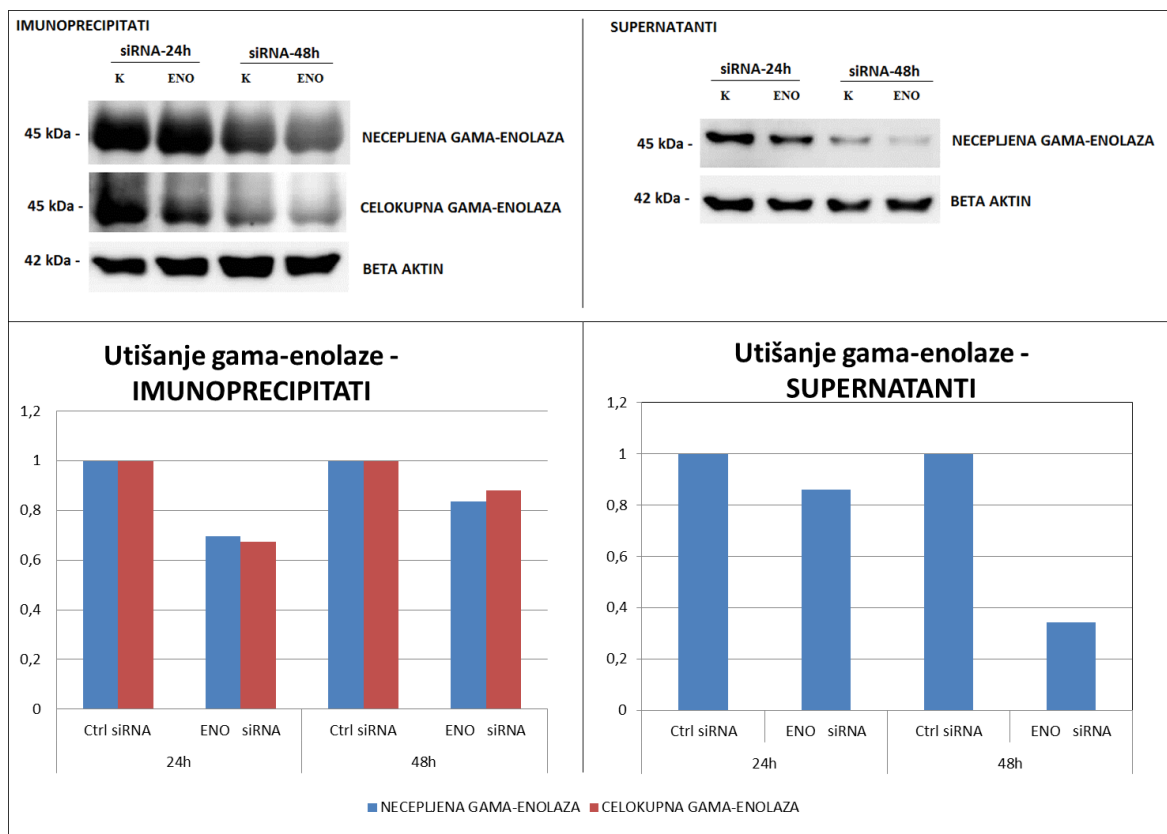
Slika 15: Rezultati detekcije necepljene gama-enolaze in β -aktina s prenosom western ter prikaz grafa z normaliziranimi rezultati.

4.3 Izolacija kompleksa gama-enolaze in β -aktina in detekcija s prenosom po Westernu

Interakcijo med gama-enolazo in β -aktinom smo želeli dodatno preveriti s koimunoprecipitacijo. Z dodatkom protiteles, ki prepoznajo β -aktin, v celični lizat, bi tako morali posredno zaznati tudi gama-enolazo. V celicah Caco-2 smo zmanjšali izražanje gama-enolaze z utišanjem z malo interferenčno RNA, da bi dodatno dokazali ali nižje izražanje gama-enolaze vodi tudi v nižjo interakcijo z β -aktinom. Kot kontrolo smo uporabili kontrolno siRNA. Po 24 h in 48 h smo pripravili celične lizate, jim določili koncentracijo proteinov in jim uravnali koncentracijo z lizirnim pufrom na 100 μ g/40 μ L lizata.

V vsakega izmed pripravljenih lizatov smo dodali enako količino kunčjih poliklonskih protiteles, ki prepoznajo β -aktin. Prisotnost lis na membrani na višini, ki ustreza gama-enolazi pomeni, da smo z izolacijo β -aktina izolirali tudi gama-enolazo. To dodatno dokazuje, da v celicah Caco-2 gama-enolaza in β -aktin interagirata. Po detekciji smo odstranili protitelesa z membrane in ponovili postopek, le da smo tokrat uporabili protitelesa, ki prepoznajo N-konec gama-enolaze, torej tako necepljeno gama-enolazo, kot za dve aminokislini krajšo gama-enolazo, ki predstavlja s strani katepsina X cepljeno molekulo – celokupno gama-enolazo. Pri supernatantih je bil postopek enak kot pri imunoprecipitatih. Za normalizacijo smo na membrani detektirali še β -aktin, s čimer smo tudi preverili ali je imunoprecipitacija uspela.

Z dodatkom drugih protiteles (proti N-koncu gama-enolaze) smo želeli izključiti morebitno nespecifično prepoznavanje opazovanih proteinov s strani uporabljenih protiteles. Poskus smo izvedli v dveh časovnih točkah in v obeh primerih je bila interakcija med gama-enolazo (necepljeno in celokupno) in β -aktinom zmanjšana tam, kjer je bilo izražanje gama-enolaze nižano z malo interferenčno RNA (Slika 16, desno). Tudi v supernatantih smo zaznali lise pri ustreznih velikostih, čeprav teh pri β -aktinu nismo pričakovali. Zelo verjetno je, da v celični lizat nismo dodali dovolj protiteles, da bi zajeli celotno frakcijo β -aktina. Lisa za gama-enolazo je bila pričakovana, saj je glede na slike, pridobljene s konfokalno mikroskopijo razvidno, da je delež gama-enolaza v celicah Caco-2 nevezan na β -aktin (Slika 16, desno). Na podlagi rezultatov smo lahko zaključili, da gama-enolaza in β -aktin v celicah Caco-2 interagirata.



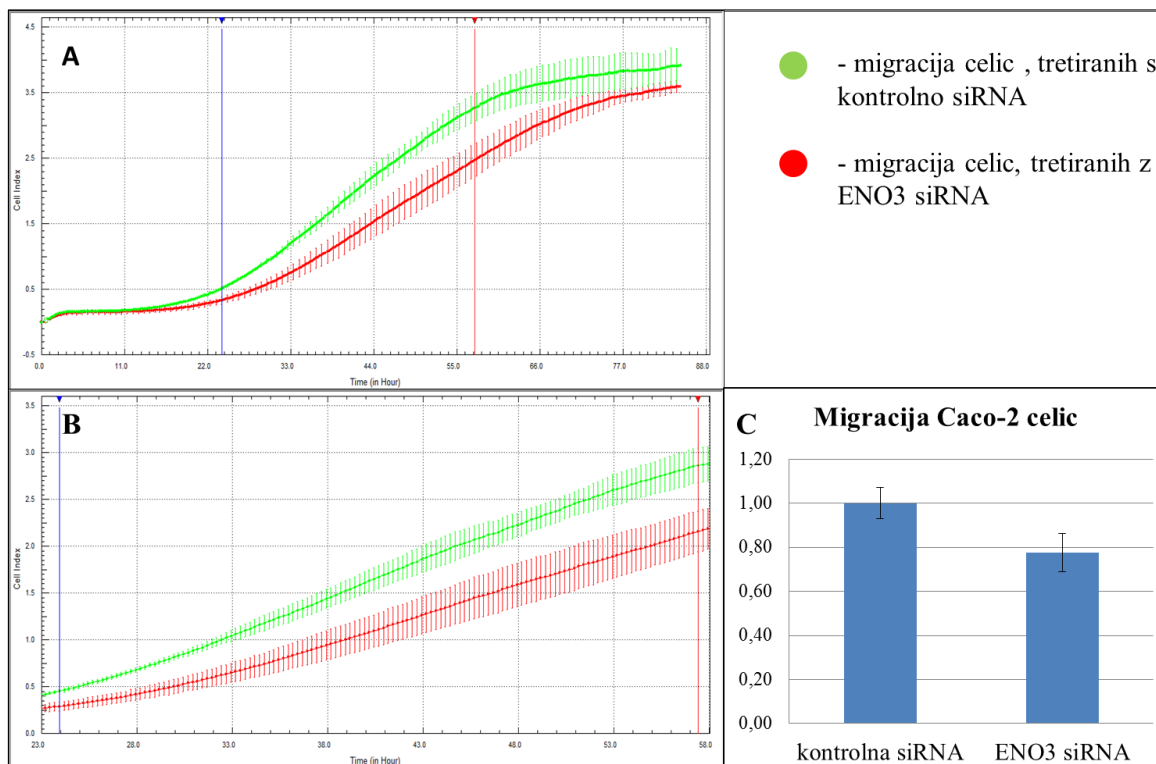
Slika 16: Ko-immunoprecipitacija gama-enolaze (necepljene in celokupne) in β -aktina v imunoprecipitatih in supernatantih ter prikaz grafov z normaliziranimi rezultati. Normalizirali smo glede na intenziteto lis β -aktina. Prisotnost lis, ki ustrezajo molekulske masi gama-enolaze v imunoprecipitatih pomeni, da gama-enolaza in β -aktin interagirata. Iz desnega grafa je razvidno, da je interakcija manjša po utišanju gama-enolaze. Kot kontrolo smo uporabili supernatante, v katerih smo detektirali preostalo gama-enolazo in preverili ali se je res utišala. Iz obeh grafov je razvidno, da se je izražanje gama-enolaze zmanjšalo v obeh časovnih točkah.

4.4 Migracija celic Caco-2 ob zmanjšanem izražanju gama-enolaze z utišanjem

V glioblastomskih celicah so dokazali, da zmanjšanje izražanja gama-enolaze vodi v zmanjšano migracijo celic (17). V nadaljevanju nas je zanimalo ali izražanje gama-enolaze vpliva tudi na migracijo celic Caco-2. S sistemom xCELLigence smo merili migracijo celic Caco-2, katerim smo zmanjšali izražanje gama-enolaze z uporabo male interferenčne RNA. Migracijo celic smo primerjali z migracijo celic, ki so bile tretirane s kontrolno siRNA.

S poskusom smo začeli 24 h po zmanjšanju izražanja z utišanjem. V polovico vdolbinic plošče CIM smo nanjali celice, ki smo jih tretirali s kontrolno siRNA, v drugo polovico

vdolbinic pa celice, tretirane z ENO3 siRNA. Razliko v obsegu in hitrosti migracije smo določili s primerjavo naklonov dobljenih krivulj.

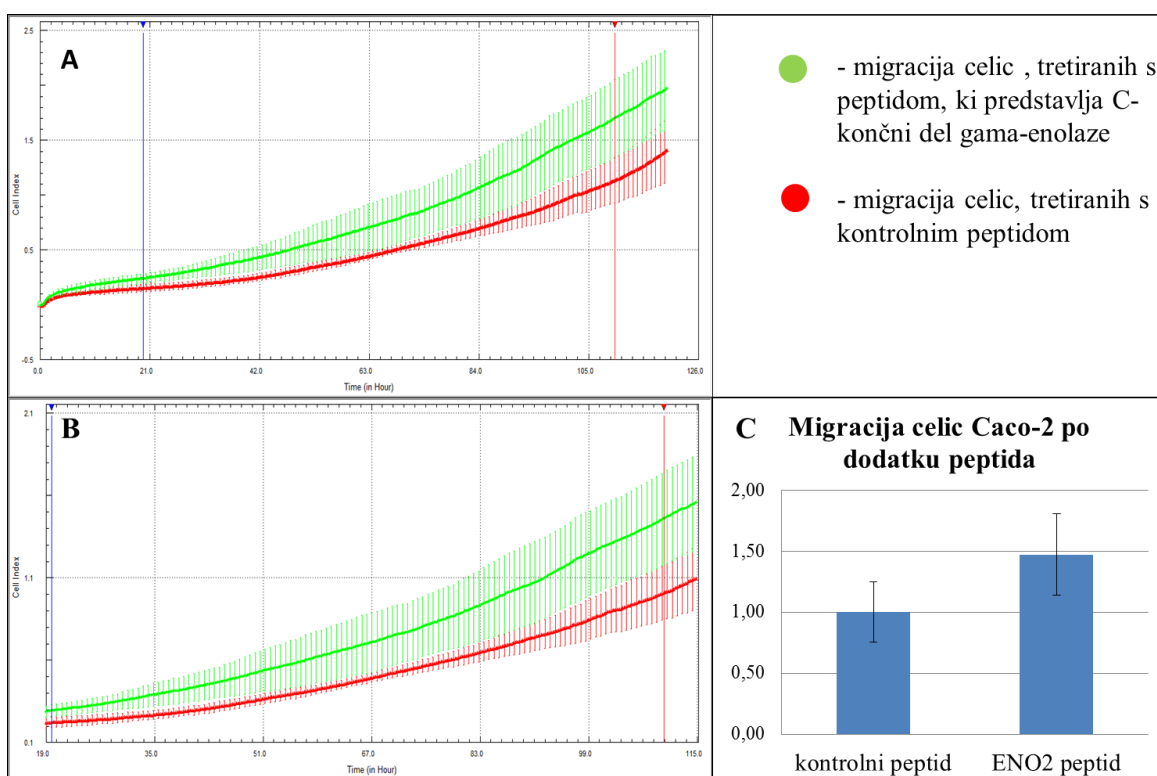


Slika 17: Prikaz migracije celic Caco-2. Grafa A in B prikazujeta migracijo celic v odvisnosti od časa. Z zeleno barvo je prikazana migracija celic, tretiranih s kontrolno siRNA. Rdeča barva predstavlja celice z zmanjšanim izražanjem gama-enolaze. Graf A prikazuje povprečje posameznih meritev kontrolnih celic in celic z utišano gama-enolazo. Na grafu B je prikazano linearno območje meritev (med 24. in 57. h od začetka meritve), ki smo ga izbrali za kvantifikacijo rezultatov saj je za določitev stopnje migracije potrebno primerjati naklone med meritvami. Graf C prikazuje združene normalizirane rezultate meritev migracije celic Caco-2 tretiranih s kontrolno siRNA in ENO3 siRNA. Prikazane so povprečne vrednosti dveh meritev.

Po obdelavi, normalizaciji in statistični analizi smo zaključili, da je bila migracija celic z znižanim izražanjem gama-enolaze v linearnem območju meritve manjša za več kot 20 %, (vrednost p je bila manjša od 0,05). Rezultati kažejo, da je gama-enolaza pomembna pri migraciji celic Caco-2, saj celice z zmanjšanim izražanjem gama-enolaze migrirajo počasneje in v manjši meri kot kontrolne celice.

4.5 Migracija celic ob dodatku peptida, ki predstavlja C-končni del gama-enolaze

Ker je gama-enolaza predvsem glikolitični encim, bi bila zmanjšana migracija celic po njenem utišanju lahko tudi posledica zmanjšane celokupne glikolize znotraj celic in s tem manjše proliferacije. Zmanjšana proliferacija in s tem zmanjšano število celic v primerjavi s kontrolo pa bi se lahko kazala kot manjša migracija celic. Zato smo v naslednjem poskusu želeli preveriti, kako se migracija celic Caco-2 spremeni ob dodatku 30-aminokislin dolgega peptida, ki predstavlja necepljeni C-končni del gama-enolaze. Postopek je bil enak kot v podpoglavju 4.4, le da smo celicam dodali ustrezen peptid v koncentraciji 100 nM. Kot kontrolo smo uporabili za dve aminokislini krajši peptid, ki predstavlja s strani katepsina X cepljeno gama-enolazo.



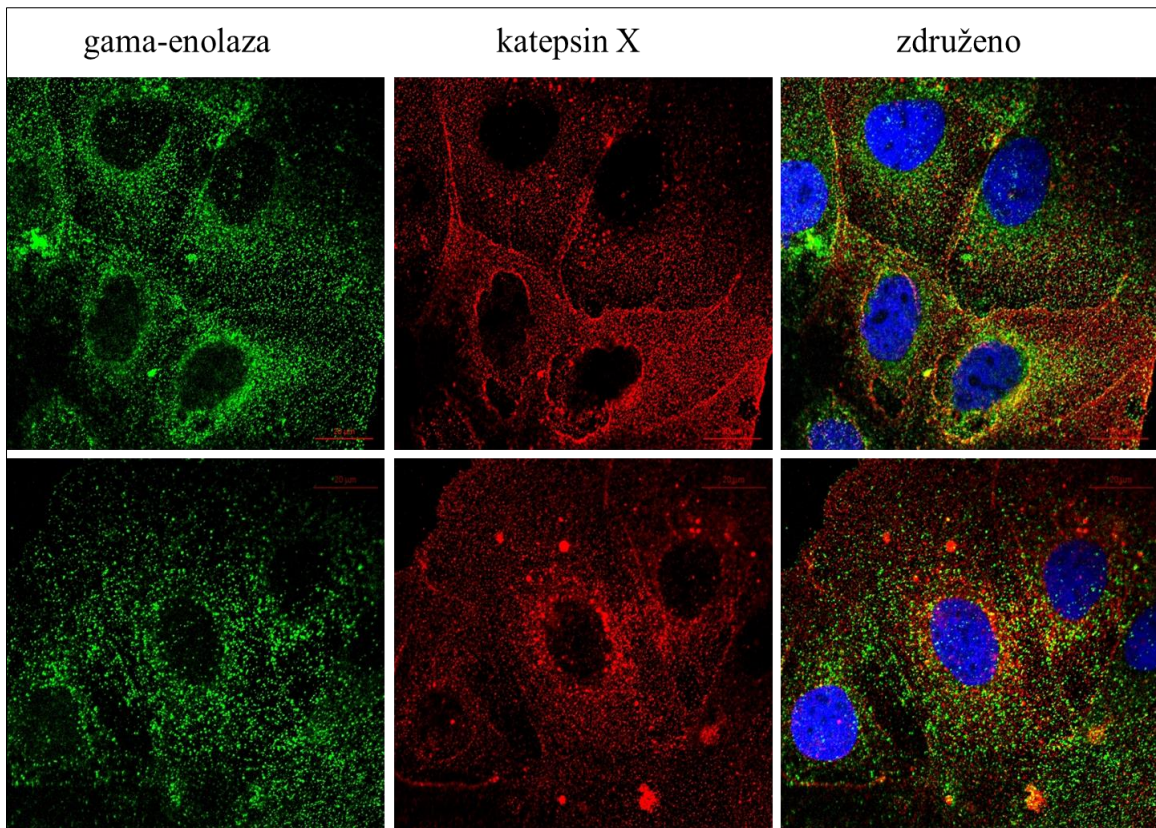
Slika 18: Prikaz migracije celic Caco-2. Z zeleno barvo je prikazana migracija celic, tretiranih s peptidom, ki predstavlja necepljen C-končni del gama-enolaze. Z rdečo barvo je prikazana migracija celic, katerim smo dodali za dve aminokislini krajši kontrolni peptid. Graf A prikazuje povprečje posameznih meritev kontrolnih celic in celic z dodanim peptidom. Graf B prikazuje izbrano linearno območje meritve med 21. in 110. uro, s katerim smo kvantificirali rezultate. Graf C prikazuje združene rezultate meritve. Rezultati so normalizirani glede na kontrolno meritve. Prikazane so povprečne vrednosti dveh meritve.

Rezultati so pokazali, da migracija celic poteka hitreje in v večji meri po dodatku peptida, ki predstavlja necepljen C-končni del gama-enolaze. Migracija celic se poveča za približno 40 % glede na migracijo kontrolnih celic (vrednost p je bila manjša od 0,05). Iz tega smo lahko zaključili, da je gama-enolaza, poleg pomembne vloge v glikolizi in normalnem metabolizmu celic, udeležena v migracijo celic Caco-2 preko njenega necepljenega C-končnega dela.

4.6 Kolokalizacija gama-enolaze in katepsina X

V nevroblastomskih celicah katepsin X cepi zadnji dve aminokislini s C-konca gama-enolaze in tako prepreči prenos do membrane, od koder gama-enolaza deluje kot nevrotrofični dejavnik. Zato nas je zanimalo ali ima katepsin X podobno vlogo pri regulaciji aktivnosti gama-enolaze v celicah Caco-2. S fluorescenčno konfokalno mikroskopijo smo preverili ali gama-enolaza in katepsin X kolokalizirata in tako poskušali ugotoviti ali katepsin X tudi pri celicah Caco-2 uravnava njeno preživetveno vlogo.

Gama-enolazo smo označili s sekundarnimi protitelesi, z vezanim fluroforom Alexa Fluor 488, za katepsin X pa smo uporabili sekundarna protitelesa, označena z Alexa Fluor 555. Po ekscitaciji prvo barvilo emitira zeleno svetlobo, drugo pa rdečo. Za prikaz jedra smo uporabili Hoechst-ov reagent, ki emitira modro svetlobo. Kolokalizacija gama-enolaze in katepsina X je predstavljena z rumeno barvo.



Slika 19: Kolokalizacija necepljene gama-enolaze in katepsina X v celicah Caco-2. Za C-končno necepljeno gama-enolazo smo uporabili mišja monoklonska protitelesa proti C-končnemu delu in nato sekundarna proti-mišja, označena z Alexa Fluor 488 (zelena barva). Katepsin X smo označili s primarnimi kozjimi protitelesi proti katepsinu X in potem s sekundarnimi, označenimi s fluoroforom Alexa Fluor 555 (rdeča barva).

Katepsin X se nahaja tako v citoplazmi kot v bližini celične membrane. Iz rezultatov je razvidno, da gama-enolaza in katepsin X ne kolokalizirata. Katepsin X verjetno ne cepi gama-enolaze v celicah Caco-2 celicah in posledično ne uravnava njene funkcije.

5 RAZPRAVA

Med proliferacijo tumorskih celic pride do povečanja metaboličnih potreb, zato se poveča obseg glikolize, ki predstavlja glavni vir energije tumorskih celic. α -enolaza, ki je najbolj raziskan izoenzim enolaze, se prekomerno izraža pri številnih vrstah tumorjev, kar je velikokrat povezano s slabšo prognozo bolnikov. Dokazali so, da ima α -enolaza pomembno vlogo pri povečani glikolizi tumorskih celicah, spodbuja pa tudi njihovo proliferacijo, migracijo, invazijo in tumorogenost in je zato obravnavana kot onkogen (8,50,51).

Gama-enolaza se prav tako prekomerno izraža v tumorjih, vendar pa je njena vloga pri raku manj raziskana. Podobno kot α -enolaza, bi tudi gama-enolaza lahko imela pri raku funkcije, ki niso odvisne le od njene glikolitične aktivnosti. Dokazali so, da gama-enolaza deluje kot dejavnik preživetja v celicah nevronskega izvora, pri čemer njeno aktivnost uravnava katepsin X, ki odcepi zadnji dve aminokislini gama-enolaze in tako prepreči njen prenos do mesta delovanja ob membrani celice (16). Gama-enolaza je preko necepljenega C-končnega dela udeležena tudi v remodelaciji aktina v nevronskih celicah (15). Podobno funkcijo bi lahko imela tudi v tumorskih celicah, kjer bi se preko njenega C-končnega dela vezala na aktin, vplivala na njegovo remodelacijo in vplivala na celično migracijo in invazijo.

Povišane serumske koncentracije gama-enolaze so prisotne pri različnih vrstah raka, v klinični praksi pa se gama-enolaza uporablja kot tumorski označevalec za diferencialno diagnozo, spremljanje poteka bolezni in učinkovitosti kemoterapije pri nedrobnoceličnem pljučnem raku in nevroblastomu (4). Pri raku debelega črevesa in danke je povišanje izražanja gama-enolaze manj značilno, so pa v novejši raziskavi opazili, da se pri pacientih z rakom na debelem črevesu gama-enolaza bolj izraža v primerjavi z zdravimi kontrolami in bi zaradi tega lahko bila novi potencialni označevalec pri diagnostiki in spremljanju te vrste raka (52).

V okviru magistrske naloge smo želeli ugotoviti vlogo gama-enolaze v celični liniji adenokarcinoma debelega črevesa Caco-2. Želeli smo dokazati ali obstaja interakcija med gama-enolazo in aktinom ter ugotoviti ali je gama-enolaza udeležena pri migraciji celic Caco-2. Preverili smo tudi ali katepsin X kolokalizira z gama-enolazo in s tem morebiti uravnava njeno funkcijo v celicah Caco-2.

V prvem delu magistrske naloge smo s fluorescenčno konfokalno mikroskopijo določili lokalizacijo necepljene gama-enolaze in β -aktina. Ugotovili smo, da se gama-enolaza nahaja predvsem v citosolu celic, kjer najverjetneje opravlja glikolitično funkcijo. Opazili smo, da je njena koncentracija največja v okolici celičnega jedra. Zelo malo oziroma skoraj nič gama-enolaze pa je prisotne na membrani celic Caco-2, kar je v nevronskih celicah pogoj za aktivacijo signalnih poti, odgovornih za spodbujanje preživetja (15). Slednje bi lahko pomenilo, da gama-enolaza te funkcije v celicah Caco-2 nima. β -aktin je razporejen po celotni površini celic, z gama-enolazo pa delno kolokalizira v citoplazmi celic Caco-2, najbolj pa v okolici celičnega jedra. V nevronskih celicah aktin in gama-enolaza kolokalizirata na membrani in vzdolž nevrinov (15). Gama-enolaza in β -aktin v celicah Caco-2 sicer kolokalizirata, a je mehanizem njune interakcije in funkcije najverjetneje drugačen kot v nevronskih celicah.

Povezava med gama-enolazo in β -aktinom v celicah Caco-2 je lahko drugačna kot je bilo dokazano v nevronskih celicah, kjer poteka preko ogrodnega proteina γ -1-sintrofina. Slednji je značilen predvsem za nevronske celice in ne za tumorske celice (16, 53). Poleg γ 1 izooblike so znane še druge izooblike sintrofina, in sicer α 1, β 1, β 2 in γ 2. α 1 sintrofin je prisoten v skeletnih in srčnih mišicah, nahaja pa se predvsem na plazemski membrani celic. β 1 je prisoten v več tkivih, v mišičnih vlaknih pa je prisoten na membrani, medtem ko je β 2 bolj koncentriran v živčno-mišičnih stikih in ga je zelo malo na plazemski membrani. Tako kot γ 1 je tudi γ 2 prisoten v možganih, poleg tega pa je izražen tudi v testisih. (54). Prisotnosti katere izmed izooblik sintrofina v celicah Caco-2 v literaturi nismo zasledili. V celicah Caco-2 bi zato bilo smiselno preveriti, ali je prisoten γ -1-sintrofin ali katera druga izooblika sintrofina, saj sta gama-enolaza in β -aktin lahko povezana preko katere druge izmed naštetih izooblik, ki vsebuje PDZ vezočo domeno. Nenazadnje bi lahko za povezavo med molekula bil odgovoren tudi kateri drugi ogrodni protein.

V mišičnih celicah so pokazali, da sta ob regeneraciji izoobliki α -enolaza in β -enolaza lokalizirani tudi perinuklearno, kar bi lahko nakazovalo, da ima gama-enolaza še dodatne vloge, ki niso povezane z glikolizo (53). V nevronskih in glioblastomskih celicah se gama-enolaza nahaja tudi v nuklearnem področju. Predvidevajo, da ima gama-enolaza v tem primeru predvsem glikolitično vlogo – sodeluje pri generiranju visokoenergijskih fosfatnih molekul v jedru, kar spodbuja preživetje in proliferacijo nevronskih celic (17, 53).

S ko-immunoprecipitacijo smo dokazali, da gama-enolaza in β -aktin interagirata. Tudi za α -enolazo so dokazali, da se veže na aktin in tubulin (50) in uravnava migracijo in invazijo tumorskih celic (51). Podobno funkcijo bi lahko imela tudi gama-enolaza. Za α -enolazo je znano, da se nahaja v nuklearnem področju mioblastov, predvidevajo pa da so za translokacijo iz citoplazme do jedra odgovorni mikrotubuli, s katerimi α -enolaza kolokalizira (5). V nevronskih celicah poteka prenos gama-enolaze preko aktinskih filamentov v obratni smeri – proti membrani (16), kjer gama-enolaza aktivira signalne poti PI3K in MAPK in tako uravnava preživetje, regeneracijo in diferenciacijo nevronov (15). Na podlagi naših rezultatov bi lahko rekli, da aktin prenaša gama-enolazo do okolice jedra, kjer bi lahko z drugim mehanizmom delovanja vplivala na migracijo in invazijo celic. Vse kaže na to, da je gama-enolaza multifunkcionalen encim, natančne vloge in mehanizme pri raku pa še niso pojasnjene.

Zmanjšanje izražanja gama-enolaze z utišanjem v celicah Caco-2 je vodilo v znižano migracijo celic. Gama-enolaza ima funkcijo glikolitičnega encima, zato bi bila zmanjšana migracija celic lahko posledica zmanjšane celokupne glikolize znotraj celic in s tem manjše proliferacije. (4). Da bi preverili vpliv glikolitične aktivnosti, smo celicam dodali 30 aminokislinski dolgi peptid, ki predstavlja C-končni del gama-enolaze in ne vsebuje aktivnega mesta, odgovornega za glikolizo. Po dodatku peptida je bila migracija celic Caco-2 večja. To nakazuje, da gama-enolaza v migraciji celic Caco-2 ni pomembna le s sodelovanjem v celični glikolizi, ampak tudi preko dodatnega aktivnega mesta na C-koncu molekule, ki se zelo verjetno posredno veže na aktin in uravnava njegovo polimerizacijo. Pri za dve aminokislini krajšem peptidu tega učinka nismo opazili, kar pomeni, da je za migracijo celic nujen intakten C-konec molekule. Gama-enolaza in katepsin X v celicah Caco-2 ne kolokalizirata in zato katepsin X najverjetneje ne cepi C-končnega dela gama-enolaze in ne vpliva na vezavo na aktin.

V sklopu magistrske naloge smo ugotovili, da je gama-enolaza udeležena v povečani migraciji celic Caco-2. Ta funkcija se odraža preko povezave gama-enolaze z β -aktinom, ki zelo verjetno poteka preko C-konca molekule. Naši rezultati kažejo na to, da bi bilo za uravnavanje njene funkcije pri napredovanju raka potrebno zavirati tako njene glikolitično aktivnost, kot tudi dodatno vezavno mesto, ki se nahaja na C koncu.

6 SKLEPI

- S fluorescenčno konfokalno mikroskopijo smo dokazali, da se gama-enolaza nahaja predvsem v citoplazmi celic Caco-2.
- S fluorescenčno konfokalno mikroskopijo smo dokazali, da gama-enolaza in β -aktin delno kolokalizirata v citoplazmi celic Caco-2 in to predvsem v okolici jedra.
- S ko-immunoprecipitacijo smo dokazali da gama-enolaza in β -aktin tvorita stabilen kompleks.
- Gama-enolaza je udeležena v povečani migraciji celic Caco-2. Zmanjšanje njenega izražanja z utišanjem vodi v manjšo celično migracijo.
- Ta funkcija se odraža preko povezave gama-enolaze z beta-aktinom, ki zelo verjetno poteka preko C-konca molekule. za povečano migracijo celic Caco-2 je odgovoren necepljen C-konec gama-enolaze.
- S fluorescenčno konfokalno mikroskopijo smo pokazali, da katepsin X in gama-enolaza ne kolokalizirata. Katepsin X verjetno ne cepi gama-enolaze in ne uravnava njene funkcije v celicah Caco-2.
- Za uravnavanje njene funkcije bi bilo smiselno tako uravnavanje njene glikolitične aktivnosti, kot vezalnega mesta na C-koncu.
- V nadaljevanju bi bilo smiselno preveriti mehanizem interakcije med gama-enolazo in β -aktinom ter način prenosa gama-enolaze do celičnega jedra.

7 LITERATURA

1. Qin J, Chai G, Brewer JM, Lovelace LL, Lebioda L: Fluoride Inhibition of Enolase: Crystal Structure and Thermodynamics. *Biochemistry* 2006; 45(3): 793–800.
2. Hoorn RKJ, Flikweert JP, Staal GEJ: Purification and properties of enolase of human erythrocytes. *International Journal of Biochemistry* 1974; 5(11-12): 845-852.
3. <http://oregonstate.edu/instruct/bb350/ahernmaterials/a17/17p28.jpg>, povzeto decembra 2015.
4. Vižin T, Kos J: Gamma-enolase: a well-known tumour marker, with a less-known role in cancer. *Radiol Oncol* 2015; 49(3): 217-226.
5. Keller A, Peltzer J, Carpentier G, Horváth I, Oláh J, Duchesnay A, Orosz F, Ovádi J: Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770(6): 919-26.
6. Diaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, Garcia-Melero A, Lopez-Aleman R: Alpha-enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 156795.
7. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008; 13: 472-82.
8. Fu QF, Liu Y, Fan Y, Hua SN, Qu HY, Dong SW, Li RL in sodelavci: Alpha-enolase promotes cell glycolysis, growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer through FAK-mediated PI3K/AKT pathway. *J Hematol Oncol*. 2015; 8: 22
9. https://en.wikipedia.org/wiki/Enolase_2, povzeto decembra 2015.
10. Patrick M: Serum Neuron-specific Enolase as a Prognostic Marker for Irreversible Brain Damage in Comatose Cardiac Arrest Survivors. *Academic Emergency Medicine* 1996; 3(2): 126-131.
11. Lima JE, Takayanagui OM, Garcia LV, Leite JP: Use of neuron-specific enolase for assessing the severity and outcome in patients with neurological disorders. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004; 37(1): 19-26.

12. Kravos M, Kralj G, Malešič I: Encimi v likvorju. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 593–599.
13. Novaković S: Tumorski označevalci v klinični onkologiji, Onkološki inštitut, Ljubljana, 2000: 8-14.
14. Auer J, Berent R, Weber T, Porodko M, Lamm G, Lassnig E, Maurer E, Mayr H, Punzengruber C, Eber B: Ability of neuron-specific enolase to predict survival to hospital discharge after successful cardiopulmonary resuscitation. *Can J Emerg Med* 2006; 8(1): 13-8.
15. Hafner A, Obermajer N, Kos J: Gamma-enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. *Biochem J* 2012; 443: 439-50.
16. Hafner A, Obermajer N, Kos J: Gamma-1-syntrophin mediates trafficking of gamma-enolase towards the plasma membrane and enhances its neurotrophic activity. *Neurosignals* 2010; 18: 246-58.
17. Yan T, Skaftnesmo KO, Leiss L, Sleire L, Wang J, Li X in sodelavci: Neuronal markers are expressed in human gliomas and NSE knockdown sensitizes glioblastoma cells to radiotherapy and temozolomide. *BMC Cancer* 2011; 11: 524.
18. Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N: The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adh Migr* 2009; 3(2): 164–166.
19. Guncar G, Klemencic I, Turk B, Turk V, Karaoglanovic-Carmona A, Juliano L, Turk D: Crystal structure of cathepsin X: a flip–flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure* 2000; 8(3): 305-313.
20. Sivaraman J, Nägler DK, Zhang R, Ménard R, Cygler M: Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol* 2000; 295(4): 939-51.
21. Staudt ND, Aicher WK, Kalbacher H, Stevanovic S, Carmona AK, Bogyo M, Klein G: Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts. *Haematologica* 2010; 95: 1452–1460.

22. Obermajer N, Premzl A, Zavasnik Bergant T, Turk B, Kos J: Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Exp Cell Res* 2006; 312: 2515–2527.
23. Pecar Fonovic U, Jevnikar Z, Rojnik M, Doljak B, Fonovic M, Jamnik P, Kos J: Profilin 1 as a target for cathepsin X activity in tumor cells. *PLoS One* 2013; 8: e53918.
24. Skvortsova I: Profilin 1: do we have a novel proteome-found biomarker predicting response to anticancer therapy? *Proteomics* 2013; 13: 2069–2071.
25. 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 Biol* 2009; 41: 1685-1696.
26. Nascimento FD, Rizzi CCA, Nantes IL, Stefe L, Turk B, Carmona AK, Nader HB, Juliano L, Tersariol ILS: Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch Biochem Biophys* 2005; 436: 323–332.
27. Obermajer N, Repnik U, Jevnikar Z, Turk B, Kreft M, Kos J: Cysteine protease cathepsin X modulates immune response via activation of beta2 integrins. *Immunology* 2008; 124: 76–88.
28. Lechner AM, Assfalg-Machleidt I, Zahler S, Stoeckelhuber M, Machleidt W, Jochum M, Nagler DK: RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin alphavbeta3 mediates cell-adhesive properties. *J Biol Chem* 2006; 281: 39588–39597.
29. Vižin T, Christensen IJ, Wilhelmsen M, Nielsen HJ, Kos J: Prognostic and predictive value of cathepsin X in serum from colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 2014; 14: 259.
30. Perrin BJ, Ervasti JM: The Actin Gene Family: Function Follows Isoform. *Cytoskeleton* 2010; 67(10): 630–634.
31. Cooper GM: *The Cell: A Molecular Approach*. 2. izdaja, ASM Press, Washington D.C., 2000. Structure and Organization of Actin Filaments.
32. Yamaguchi H, Condeelis J: Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(5): 642-52.
33. Nowak D, Skwarek-Maruszewska A, Zemanek-Zboch M, Malicka-Błaszkiwicz M: Beta-actin in human colon adenocarcinoma cell lines with different metastatic potential. *Acta Biochimica Polonica* 2005; 52(2): 461-468.

34. Pollard TD, Cooper JA: Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 2009; 326(5957): 1208–1212.
35. ATCC, The American Type Culture Collection, http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-37.aspx?geo_country=si#generalinformation, povzeto decembra 2015.
36. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. Izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 168.
37. Zavašnik-Bergant T: Mikroskopske tehnike: od gojenja celic za produkcijo protiteles do določanja fine strukture celičnih organelov. *Novice IJS* 2006; 123: 11-14.
38. <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>, povzeto septembra 2015.
39. DC Protein Assay Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories SIG 120197, LIT488 RevD.
40. Garcia-Descalzo L, Garcia-Lopez E, Alcazar A, Baquero F, Cid C: Gel Electrophoresis – Principles and Basics: Gel Electrophoresis of Proteins. 1. Izdaja, InTech, Rijeka, 2012: 57-68.
41. Kavooosi G, Ardestani S: Gel Electrophoresis – Principles and Basics: Gel Electrophoresis of Protein – From Basic Science to Practical Approach. 1. Izdaja, InTech, Rijeka, 2012: 69-88.
42. <http://biolympiads.blogspot.si/2014/09/sds-page-tutorial.html>, povzeto septembra 2015.
43. Mahmood T, Yang P. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci* 2012; 4 (9): 429-34.
44. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/western-blot-protocol/western-blotting-using-dry-blotting-system.html>, povzeto septembra 2015.
45. Kaboord B, Perr M: Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 2008; 424: 349-64.
46. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/co-immunoprecipitation-co-ip.html>, povzeto septembra 2015.
47. xCELLigence RTCA DP Instrument, Brochure, ACEA Biosciences, 2014: 1-8.

48. Jurmeister S, Baumann M, Balwierz A, Keklikoglou I, Ward A, Uhlmann S, Zhang JD, Wiemann S, Sahin Ö: MicroRNA-200c Represses Migration and Invasion of Breast Cancer Cells by Targeting Actin-Regulatory Proteins FHOD1 and PPM1F. *Mol Cell Biol* 2012; 32(3): 633–651.
49. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/tools/stats/ttest.html>, povzeto aprila 2016.
50. Walsh JL, Keith TJ, Knull HR. Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochim Biophys Acta* 1989; 999: 64-70.
51. Trojanowicz B, Winkler A, Hammje K, Chen Z, Sekulla C, Glanz D in sodelavci: Retinoic acid-mediated down-regulation of ENO1/MBP-1 gene products caused decreased invasiveness of the follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Mol Endocrinol* 2009; 42: 249-60.
52. Dowling P, Hughes DJ, Larkin AM, Meiller J, Henry M, Meleady P, Lynch V, Pardini B, Naccarati A, Levy M, Vodicka P, Neary P, Clynes M: Elevated levels of 14-3-3 proteins, serotonin, gamma enolase and pyruvate kinase identified in clinical samples from patients diagnosed with colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2015; 441: 133-141.
53. Merkulova T, Dehaupas M, Nevers MC, Creminon C, Alameddine H, Keller A: Differential modulation of α , β and γ enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle. *Eur. J. Biochem* 2000; 267: 3735-3743.
54. Piluso G, Mirabella M, Ricci E, Belsito A, Abbondanza C, Servidei S, Puca AA, Tonali P, Puca GA, Nigro V: Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 15851–15860.