

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Neža JUVAN

**RAZVOJ METOD ZA *IN VITRO* PROUČEVANJE
TKIVNOZAŠČITNIH UČINKOV ERITROPOETINA
V CELIČNEM MODELU**

Magistrsko delo
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Neža JUVAN

**RAZVOJ METOD ZA *IN VITRO* PROUČEVANJE
TKIVNOZAŠČITNIH UČINKOV ERITROPOETINA V CELIČNEM
MODELU**

Magistrsko delo
Magistrski študij – 2. stopnja

**DEVELOPING METHODS FOR *IN VITRO* STUDIES OF TISSUE
PROTECTIVE EFFECTS OF ERYTHROPOIETIN IN A CELL
MODEL**

M. Sc. Thesis
Master Study Programmes

Ljubljana, 2012

Magistrsko delo sem opravila na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Radovana Komela in somentorstvom asist. dr. Tadeje Režen.

Senat Oddelka za biologijo je dne 9. 3. 2012 na predlog Komisije za študij 1. in 2. stopnje potrdil prijavo magistrskega dela Neže Juvan in za mentorja imenoval prof. dr. Radovana Komela, za somentorico asist. dr. Tadejo Režen, za recenzenta prof. dr. Toma Turka in za predsednico komisije prof. dr. Kristino Sepčič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kristina Sepčič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član: prof. dr. Radovan Komel
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo
Član: asist. dr. Tadeja Režen
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo
Član: prof. dr. Tom Turk
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 13. 9. 2012

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Neža Juvan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	6:577(043.3)=163.6
KG	eritropoetin/receptor za eritropoetin/metabolični stres/tkivnozaščitni učinek/PC12/SH-SY5Y/razgradnja DNA/aktivacija kaspaz
AV	JUVAN, Neža
SA	KOMEL, Radovan (mentor)/REŽEN, Tadeja (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2012
IN	RAZVOJ METOD ZA <i>IN VITRO</i> PROUČEVANJE TKIVNOZAŠČITNIH UČINKOV ERITROPOETINA V CELIČNEM MODELU
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XII, 74 str., 6 pregl., 38 sl., 114 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Eritropoetin (EPO) je človeški rastni dejavnik, ki poleg vloge v hematopoezi zadnja leta vzbuja pozornost kot potencialni zaščitni dejavnik v različnih tkivih, med drugimi tudi v živčnem. Cilj magistrskega dela je bil testirati različne metode proučevanja zaščitnega učinka EPO <i>in vitro</i> v celičnih linijah SH-SY5Y in PC12. Za sprožitev apoptoze smo izbrali stradanje celic z odtegnitvijo seruma iz ravnega medija. Po določitvi primerne časovne točke smo učinek različnih režimov izpostavitve EPO proučevali z apoptotskimi testi. Kot najprimernejša sta se na obeh celičnih linijah izkazala specifična apoptotska testa za merjenje internukleosomske razgradnje DNA in aktiviranih kaspaz, s katerima smo potrdili statistično značilen zaščitni učinek 12-urne izpostavitve 25 E/ml EPO pred stradanjem SH-SY5Y in 72-urne hkratne izpostavitve 5, 25 in 50 E/ml EPO in stradanja celic PC12. Kot neprimerna metoda za določanje vpliva EPO na preživetje celic SH-SY5Y se je zaradi premajhne natančnosti izkazal test za merjenje metabolične aktivnosti. Za testiranje učinka EPO na apoptozo celic PC12 pa ni primerna metoda merjenja izražanja apoptotskih genov <i>Bax</i> in <i>Bcl-2</i> . Z metodo prenosa proteinov western smo potrdili, da EPO aktivira signalno pot AKT (proteinska kinaza B). Razvoj metod za proučevanje učinka EPO <i>in vitro</i> je bil uspešen: ob primernem režimu izpostavitve smo zabeležili zaščitni učinek EPO na celice nevrnega izvora.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	6:577(043.3)=163.6
CX	erythropoietin/erythropoietin receptor/metabolic stress/tissueprotective effect/PC12/SH-SY5Y/DNA fragmentation/caspase activation
AU	JUVAN, Neža
AA	KOMEL, Radovan (supervisor)/REŽEN, Tadeja (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY	2012
TI	DEVELOPING METHODS FOR <i>IN VITRO</i> STUDIES OF TISSUE PROTECTIVE EFFECTS OF ERYTHROPOIETIN IN A CELL MODEL
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	XII, 74 p., 6 tab., 38 fig., 114 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Besides playing an important role in hematopoiesis, human growth factor erythropoietin (EPO) is increasingly being recognised for its exerting tissueprotective effects on various tissues, nervous amongst them. The objective of this Master's Thesis was to test different methods for measuring the protective effect of EPO on SH-SY5Y and PC12 cell lines <i>in vitro</i> . As a trigger of apoptosis we adopted cell starvation induced by total serum deprivation. After determination of the appropriate time point for measuring the effect of EPO, we used various tests to measure different treatment designs. The most appropriate on both cell lines were specific apoptotic tests for measuring DNA fragmentation and activation of caspases, respectively. On the SH-SY5Y cell line the tests have confirmed protective effect of a 12-hour pre-treatment with 25 IU/ml EPO, whereas on the PC12 cell line protective effect was observed in a 72-hour co-treatment with 5, 25 and 50 IU/ml EPO. Measuring metabolic activity for evaluating the impact of EPO on survival of the SH-SY5Y cells was inefficient due to an inadequate precision and also measuring expression of <i>Bax</i> and <i>Bcl-2</i> genes on the PC12 cell line was shown to be inappropriate. Nonetheless, western blot analysis confirmed that the AKT (protein kinase B) signaling pathway is activated by EPO. We successfully developed methods for <i>in vitro</i> studies of EPO: when treated <i>via</i> appropriate design, EPO exerted tissueprotective effect on cells of neural origin.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo slik	VII
Kazalo preglednic	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 PREGLED OBJAV	2
1.1.1 Eritropoetin.....	2
1.1.2 Eritropoetinski receptor.....	4
1.1.3 Zaščitni učinek EPO	6
1.1.4 Mehanizem delovanja EPO	8
1.1.5 Apoptoza.....	11
1.1.6 Testi za merjenje apoptoze	13
1.2 NAMEN DELA	16
1.3 HIPOTEZA	17
2 MATERIAL IN METODE	18
2.1 MATERIAL	18
2.2 METODE	24
2.2.1 Metode sprožanja apoptoze in režimi izpostavitve EPO	24
2.2.2 Test merjenja metabolične aktivnosti.....	26
2.2.3 Obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR).....	28
2.2.4 Test za merjenje internukleosomske razgradnje DNA	30
2.2.5 Test za merjenje aktivacije kaspaz	31
2.2.6 Prenos western	32
2.2.7 Statistična obdelava rezultatov.....	34

3	REZULTATI	35
3.1	DOLOČANJE PRIMERNEGA SPROŽILCA APOPTOZE	35
3.2	UČINEK EPO NA PREŽIVETJE CELIC	38
3.2.1	Test za merjenje metabolične aktivnosti	38
3.2.2	Razmerje med izražanjem pro- in anti-apoptotskih genov (<i>BAX/BCL-2</i>)	40
3.2.3	Test za merjenje internukleosomske razgradnje DNA	42
3.2.4	Test za merjenje aktivacije kaspaz	44
3.3	IZRAŽANJE GENOV <i>EPO</i> IN <i>EPOR</i> V IZBRANIH CELIČNIH LINIJAH	45
3.3.1	Vpliv stradanja na izražanje gena <i>EPOR</i>	45
3.3.2	Vpliv EPO na izražanje gena <i>EPOR</i>	47
3.4	AKTIVACIJA SIGNALNIH POTI	49
4	RAZPRAVA	53
5	SKLEPI	59
5.1	SPROŽILCI APOPTOZE	59
5.2	METODE MERJENJA APOPTOZE	59
5.3	UČINEK EPO NA APOPTOZO	60
6	POVZETEK MAGISTRSKEGA DELA	61
6.1	POVZETEK	61
6.2	SUMMARY	63
7	VIRI	65

KAZALO SLIK

Sl. 1. Kristalna struktura kompleksa homodimernega EPOR z vezanim EPO.....	4
Sl. 2. Povečan izsek funkcionalnega epitopa na homodimeru EPOR z označenimi hidrofobnimi aminokislinami, ki sodelujejo pri vezavi EPO... ..	5
Sl. 3. Znotrajcelične signalne poti, vključene v mehanizem zaščitnega učinka EPO.	9
Sl. 4. Citomorfološke spremembe med apoptozo: A) mikrografija mišjega pankreasa; B) transmisijska elektronska mikrografija priželjca.....	14
Sl. 5. Slika celic SH-SY5Y.....	18
Sl. 6. Slika celic PC12: A) diferencirane celice; B) nediferencirane celice... ..	18
Sl. 7. Redukcija tetrazolijeve soli WST-1 v topen formazan.	27
Sl. 8. Shematski prikaz principa delovanja kompleta za merjenje razgradnje DNA.....	31
Sl. 9. Cepitev kaspaznega substrata, fuziranega z barvilom rodamin 110, v fluorescirajoč produkt.....	32
Sl. 10. Določanje režima sprožanja apoptoze s STR na celični liniji SH-SY5Y s testom razgradnje DNA.....	35
Sl. 11. Metabolična aktivnost celic SH-SY5Y po 1, 2 in 3 dneh stradanja.....	36
Sl. 12. Metabolična aktivnost celic PC12 po 3, 6, 9, 12 in 24 urah stradanja.	36
Sl. 13. Metabolična aktivnost celic PC12 po 3 in 5 dneh stradanja..	37
Sl. 14. Raven apoptoze, merjena s testom za merjenje razgradnje DNA, po 48 urah stradanja celic SH-SY5Y.....	37
Sl. 15. Raven apoptoze, merjena s testom aktivacije kaspaz, po 2 urah stradanja celic PC12.....	38
Sl. 16. Vpliv 12-urne predhodne izpostavitve EPO na metabolično aktivnost 24 ur stradanih celic SH-SY5Y.....	39
Sl. 17. Vpliv 24-urnega stradanja in sočasne izpostavitve EPO na metabolično aktivnost celic PC12.....	39
Sl. 18. Vpliv različnih režimov izpostavitve in koncentracij EPO na izražanje apoptotskih genov v celicah SH-SY5Y.....	40
Sl. 19. Vpliv 24-urnega stradanja in sočasne izpostavitve EPO na izražanje apoptotskih genov v celicah PC12....	41
Sl. 20. Znižanje izražanja gena <i>Bax</i> po 3 dneh stradanja celic PC12.....	41

Sl. 21. Učinek 24-urne izpostavitve celic SH-SY5Y 25 E/ml EPO pred 9-urnim sprožanjem apoptoze s 25 nM STR na obseg razgrajene DNA.....	42
Sl. 22. Vpliv 12-urne predhodne izpostavitve celic SH-SY5Y različnim koncentracijam EPO na obseg razgrajene DNA po 48 urah stradanja.....	43
Sl. 23. Vpliv 3-urnega stradanja in sočasne izpostavitve različnim koncentracijam EPO na obseg razgrajene DNA celic PC12.	43
Sl. 24. Aktivacija kaspaz po 12-urni predhodni izpostavitvi EPO in 2,5-urnem stradanju celic SH-SY5Y..	44
Sl. 25. Aktivacija kaspaz po 2-urnem stradanju in sočasni izpostavitvi celic linije PC12 EPO.....	45
Sl. 26. Izražanje <i>EPOR</i> po 24 urah stradanja celic SH-SY5Y v mediju DME....	46
Sl. 27. Izražanje <i>EPOR</i> po 24 urah stradanja celic SH-SY5Y v mediju DME/F12....	46
Sl. 28. Izražanje <i>EpoR</i> po 24 urah stradanja celic PC12.	46
Sl. 29. Vpliv 12-urne izpostavitve EPO in sledečega 24-urnega stradanja na izražanje <i>EPOR-Q2</i> v celicah SH-SY5Y.	47
Sl. 30. Vpliv 24-urnega stradanja in sočasne izpostavitve visoki koncentraciji EPO na izražanje <i>EpoR</i> v celicah PC12.....	48
Sl. 31. Vpliv 48-urnega stradanja in sočasne izpostavitve visoki koncentraciji EPO na izražanje <i>EpoR</i> v celicah PC12.....	48
Sl. 32. Vpliv 72-urnega stradanja in sočasne izpostavitve EPO na izražanje <i>EpoR</i> v celicah PC12..	49
Sl. 33. Aktivacija signalnih poti AKT in ERK po 1 uri stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah SH-SY5Y.....	49
Sl. 34. Aktivacija signalnih poti AKT in ERK po 3 urah stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah SH-SY5Y.....	50
Sl. 35. Grafični prikaz relativne stopnje aktivacije signalnih poti AKT in ERK po 1 uri stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah SH-SY5Y.....	50
Sl. 36. Grafični prikaz relativne stopnje aktivacije signalnih poti AKT in ERK po 3 urah stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah SH-SY5Y.....	51
Sl. 37. Aktivacija signalne poti AKT po 30 minutah stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah PC12.....	51
Sl. 38. Grafični prikaz relativne stopnje aktivacije signalnih poti Stat5, Akt in Erk po 30 minutah stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah PC12.....	52

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1. Morfološke razlike med apoptozo in nekrozo.....	12
Pregl. 2. Kemikalije, uporabljene pri magistrskem delu.	19
Pregl. 3. Uporabljena laboratorijska oprema.	21
Pregl. 4. V laboratoriju pripravljeni geli, pufri in druge zmesi kemikalij.	23
Pregl. 5. Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri metodi RT-PCR.....	23
Pregl. 6. Seznam vseh testiranih režimov izpostavitve EPO..	26

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

% (m/v)	odstotek neke snovi, določen kot razmerje mase te snovi in volumna celotne raztopine
% (v/v)	odstotek neke snovi, določen kot razmerje volumna te snovi in volumna celotne raztopine
AKT	proteinska kinaza B (angl. <i>protein kinase B</i>)
APAF-1	aktivacijski dejavnik 1 apoptozne proteaze (angl. <i>apoptotic protease activating factor 1</i>)
BAD	gen za pro-apoptotski protein (angl. <i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>)
BAX	gen za pro-apoptotski protein (angl. <i>Bcl-2-like protein 4</i>)
BCL-2	gen za anti-apoptotski protein (angl. <i>B-cell lymphoma 2</i>)
BSA	goveji serumski albumin
CFU-E	najzgodnejše matične celice za eritropoetično vrsto (angl. <i>colony forming unit-erythrocyte</i>)
C _T	prazna vrednost pri RT-PCR – cikel, v katerem zaznamo izražanje izbranega gena (angl. <i>threshold cycle</i>)
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DME	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i> medij za gojenje celic
DME/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle/Nutrient F-12 Ham</i> medij za gojenje celic
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
E	(mednarodna) enota (angl. <i>IU, international unit</i>)
EPO	eritropoetin
EPObp	vezavni protein za eritropoetin (angl. <i>EPO binding protein</i>), tudi EPOR
EPOR	eritropoetinski receptor
ERK2	z zunajceličnimi signali nadzorovana kinaza 2 (angl. <i>extracellular signal-regulated kinase 2</i>)
FBS	fetusni serum goveda (angl. <i>fetal bovine serum</i>)
g	relativna centrifugalna sila
GATA	globinski (ali eritroidni) transkripcijski dejavnik
GSK-3(β)	kinaza glikogen-sintaze 3(β) (angl. <i>glycogen synthase kinase 3(β)</i>)

HIF	transkripcijski dejavnik, ki sproži hipoksijo (angl. <i>hypoxia inducible factor</i>)
HRP	encim hrenova peroksidaza (angl. <i>horseradish peroxidase</i>)
HS	konjski serum (angl. <i>horse serum</i>)
IκB	inhibitor jedrnega dejavnika κB
JAK-2	Janusna kinaza 2
m18S	mišji gen za komponento 40S podenote evkariontskega ribosoma (vzdrževalni gen)
MAPK	MAP (z mitogenom aktivirani protein)-kinaza (angl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MPTP	1-metil-4-fenilpiridinijev ion; sprožilec apoptoze
Na-DS	natrijev dodecil sulfat, detergent
NF-κB	jedrni dejavnik κB
NGF	živčni rastni dejavnik (angl. <i>nerve growth factor</i>)
NMR	jedrska magnetna resonanca (angl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NO	dušikov oksid (angl. <i>nitric oxide</i>)
p53	protein p53, ki zavira rast tumorja
PBS	fosfatni pufer z NaCl (angl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS z dodatkom detergenta Tween
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
PMSF	inhibitor serinskih proteaz (angl. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PP1B	gen za peptidilprolil izomerazo B, protein endoplazemskega retikuluma
PVDF	polivinil difluorid
RFU	relativna fluorescentna enota (angl. <i>relative fluorescent unit</i>)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i>)
RPLP0	gen za protein P0 ribosomske podenote 60S (vzdrževalni gen)
RPM	obratov na minuto, enota za hitrost centrifugiranja (angl. <i>rounds per minute</i>)
RT-PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo oz. kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> oz. <i>real-time polymerase chain reaction</i>)

SH2	Src (proto-onkogenska tirozin-proteinska kinaza)-homologna domena 2
STAT5	signalni prenašalec in aktivator transkripcije 5 (angl. <i>signal transducer and activator of transcription 5</i>)
STR	stavrosporin; sprožilec apoptoze
TNF α	dejavnik tumorske nekroze α
TRIS	pufer, kemijsko 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
WST-1	vodotopna tetrazolijeva sol (angl. <i>water soluble tetrazolium salt</i>), proliferacijski reagent
β cR	skupni β -receptor (angl. <i>β-common receptor</i>), hipotetični potencialni partner EPOR, tudi CD131 (angl. <i>cluster of differentiation 131</i>)

1 UVOD

Hematopoeza je nastajanje krvnih celic iz krvotvornih matičnih celic. Te so v kostnem mozgu in so multipotentne ter samoobnavljajoče. Njihove hčerinske celice se diferencirajo v predniške celice mieloične in limfatične vrste, ki se ne morejo več samoobnavljati (Rožman in Jež, 2010). Eritropoetin (EPO) je znan hematopoetski dejavnik, ki preprečuje apoptozo ter pospešuje proliferacijo in diferenciacijo eritroidnih predniških celic (Carnot in Deflandre, 1906), ki se nato razvijejo v eritrocite (proces se imenuje eritropoeza), celice, specializirane za prenos kisika. Ključno vlogo pa EPO igra tudi v mnogih signalnih poteh, ki se aktivirajo pri številnih boleznih in so vključene v zaščito tkiv: zaviranje apoptoze, ponovna vzpostavitev žilne avtoregulacije in zmanjšanje imunskega odziva (Grasso in sod., 2004). Apoptoza oz. programirana celična smrt je normalen pojav pri razvoju in staranju in deluje kot homeostatski mehanizem za vzdrževanje celičnih populacij v tkivih. Je natančno uravnavan in od energije odvisen proces, za katerega so značilne specifične morfološke in biokemijske spremembe (Elmore, 2007). Apoptoza ima pomembno vlogo v razvoju živčevja, poleg tega pa so okvare v njenem delovanju tudi eden izmed vzrokov za številne nevrodegenerativne bolezni (Pregi in sod., 2009).

Že skoraj dvajset let je splošno sprejeto dejstvo, da receptorji za eritropoetin (EPOR) niso prisotni le na celicah hematopoetskih tkiv, temveč med drugimi tudi na kožnih, endotelnih, srčnih in živčnih celicah (Digicaylioglu in sod., 1995; Morishita in sod., 1997). Zaščitni učinek eksogeno dodanega EPO na živčevje so raziskovalci potrdili tako na različnih modelih *in vitro* kot na *in vivo* modelih odraslih in novorojenih miših (Sola in sod., 2005; Noguchi in sod., 2007). Več avtorjev poroča o zaščitnem učinku EPO na živčevje v smislu preprečevanja umetno sprožene apoptoze (Morishita in sod., 1997; Sakanaka in sod., 1998; Ehrenreich in sod., 2004; Ghezzi in Brines, 2004). Izkazalo se je, da je za aktivacijo tkivnozaščitnega učinka potrebna mnogo višja koncentracija EPO kot za hematopoetski učinek. To pomeni, da povišanje koncentracije EPO sproži tako tkivnozaščitne kot hematopoetske učinke, kar pa lahko vodi do nezaželenih stranskih učinkov (Wang in sod., 2011b; Brines in Cerami, 2012). Na tem področju sta s stališča farmacevtske industrije tako zanimiva vsaj dva vidika: razvoj molekule z izničeno hematopoetsko in ohranjeno tkivnozaščitno vlogo, ter razvoj metod za proučevanje učinka teh molekul *in vitro*.

1.1 PREGLED OBJAV

1.1.1 Eritropoetin

Človeški eritropoetin (EPO), prvotno imenovan hemopoetin (Chateaufieux in sod., 2011), je 30,4 kDa glikoprotein (Mocini in sod., 2007), ki deluje kot hormon, citokin in rastni dejavnik. Prvič so ga izolirali in očistili v zelo nizki koncentraciji iz urina bolnikov z aplastično anemijo (Miyake in sod., 1977). V plazmi se pojavlja v koncentraciji od 4 do 27 mE/ml (Chateaufieux in sod., 2011). Sestavlja ga 165 aminokislinskih ostankov, ki oblikujejo 4 α -vijačnice. Po krvnem obtoku kroži v različno glikoziliranih izooblikah, ki se med seboj razlikujejo po električnem naboju in biološki aktivnosti (Jelkmann, 2011). Izčrpajo in razgradijo ga celice, na katere učinkuje – tarčne celice (Gross in Lodish, 2006). Večina EPO se po rojstvu tvori v peritubularnih celicah v ledvicah (Fisher in sod., 1996), le 10 % v jetrih, ki so pred rojstvom glavni organ za njegovo sintezo (Štiblar Martinčič, 2005). Glede nastajanja EPO v neledvičnih tkivih pri odraslem človeku (koža, možgani) se krešejo različna mnenja, potrjeno pa najdemo zapis za EPO v obliki mRNA tudi v možganih, jetrih, vranici, pljučih in testisih (Jelkmann, 2011).

Glavna vloga EPO je uravnavanje eritropoeze preko pospeševanja preživetja, proliferacije in diferenciacije eritroidnih prekurzorjev (neposredna rekrutacija zarodnih celic) (Carnot in Deflandre, 1906) ter sprožanja sinteze hemoglobina (Krantz, 1991). Z vezavo na EPOR eritroidnih prekurzorjev prepreči apoptozo oz. vzdržuje viabilnost celic (Koury in Bondurant, 1988; 1990).

Nastajanje EPO je uravnavano na transkripcijski ravni. Povezanost koncentracije kisika v krvi in nastajanja novih rdečih krvničk je med potovanjem v perujsko gorovje leta 1890 opazil in prvič opisal francoski anatom Francois Gilbert Viault (Viault, 1890). Kot je nakazal že Viault, sta glavna sprožilca izražanja EPO hipoksija (padec parcialnega tlaka kisika) in anemija (stanje znižane oksiformne kapacitete krvi kot posledica zmanjšane števila eritrocitov ali/in zmanjšane količine hemoglobina). Hipoksija zniža inhibitorni učinek transkripcijskih dejavnikov GATA-1 in 2 ter poveča dostopnost heterodimernih (α/β) transkripcijskih dejavnikov HIF (angl. *hypoxia inducible factor*), ki spodbujajo ojačevalec gena *EPO*. Transkripcijski dejavniki HIF se inaktivirajo v razmerah normalnega

parcialnega tlaka kisika s hidroksilacijo α -podenot (Jelkmann, 2011). Ko pride do nastanka EPO, se ta sprosti v krvni obtok in potuje do celic, ki na površini izražajo funkcionalne EPOR homodimere, ter preko mreže kompleksnih signalov, ki uravnavajo celično proliferacijo, diferenciacijo in smrt, spodbuja eritropoezo oz. nastajanje novih rdečih krvničk, eritrocitov (Spivak, 2005). Signalizacija EPO se uravnava preko različnih dejavnikov, kot so: (i) koncentracija EPO, (ii) gostota EPOR na površini celic, (iii) spodbujevalna aktivnost kinaz, ki sprožijo fosforilacijo tirozinov različnih proteinov, vključenih v signalno pot EPO in (iv) inhibitorna aktivnost fosfataz, ki zavirajo signal EPO (Masuda in sod., 1993; Fibach, 2011).

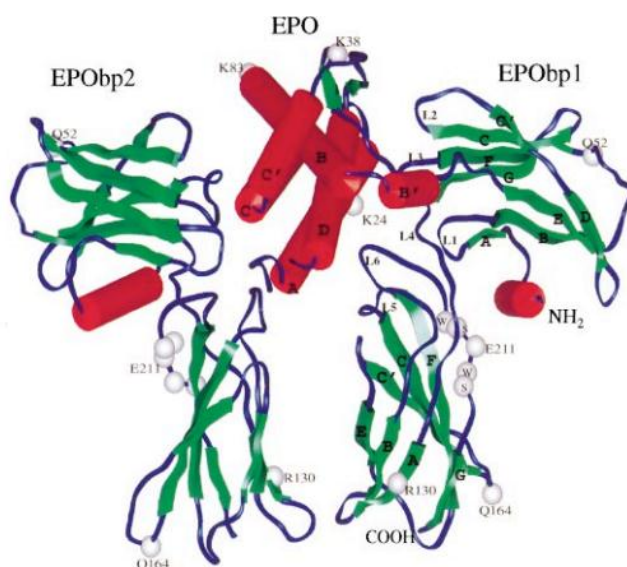
Prekomerno nastajanje EPO vodi v eritrocitozo (povečanje števila eritrocitov v krvi), pomanjkanje EPO pa je glavni razlog za nastanek anemij (Jelkmann, 2011), povezanih z različnimi kroničnimi okvarami, npr. boleznijo jeter in ledvic, revmatoidnim artritisom in mnogimi drugimi (Wallner in sod., 1977; Murphy in sod., 1994). V sredini 80. let so prvič uspešno klonirali gen *EPO* in takrat se je razmahnila tehnologija rekombinantne DNA za visoko zmogljivostno produkcijo modificiranih EPO molekul za spodbujanje eritropoeze. Različne oblike EPO z generičnimi imeni epoetin alfa, beta in omega so že kar nekaj časa v ustaljeni rabi za zdravljenje anemij (Henry in Abels, 1994; Murphy in sod., 1994; Storrington in sod., 1998; Bren in sod., 2002).

Afiniteta vezave EPO na EPOR nehematopoetskih celic je nizka, zato lahko tkivnozaščitni učinek EPO dosežemo le s precej višjimi odmerki EPO, kot so potrebni za hematopoetski učinek. Visoki odmerki EPO pa so povezani s stranskimi učinki, predvsem z nenormalno povišano eritropoezo in proliferacijo tumorskih celic (Chateauvieux in sod., 2011). Omenjenemu v izogib so razvili več različic molekule EPO z ohranjeno tkivnozaščitno in izničeno eritropoetsko funkcijo. S kemijsko modifikacijo oz. mutiranjem EPO so tako razvili CEPO, molekulo EPO s karbamiliranimi lizini (Leist in sod., 2004), površinski peptid vijačnica B, ki posnema trodimenzionalno zgradbo EPO (Brines in sod., 2008), asialoEPO, pri katerem je encimsko odstranjena sialična kislina (Chateauvieux in sod., 2011), S100E, pripravljen z mestno specifično mutagenezo (Leist in sod., 2004) in še mnogo drugih različic.

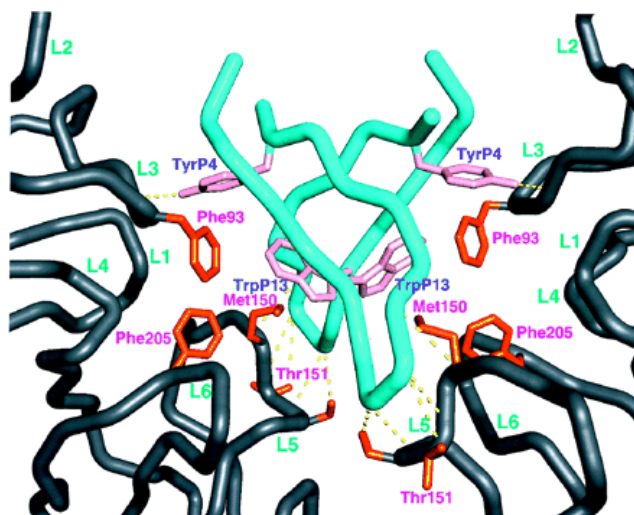
Količino oz. koncentracijo EPO običajno izražamo v mednarodnih enotah na volumsko enoto (E/ml, angl. *IU/ml*), pri čemer ima ena enota na eritropoezo enak učinek kot 5 μ mol kobaltovega klorida pri glodalcih (Jelkmann, 2007).

1.1.2 Eritropoetinski receptor

Eritropoetinski receptor (EPOR) spada v družino citokinskih receptorjev. Sestavljajo ga približno 230 aminokislinskih ostankov velika zunajcelična domena D1 (N-terminalni konec), transmembranski segment in približno 230 aminokislinskih ostankov velika citosolna domena D2 (C-terminalni konec), ki nima encimske aktivnosti (D'Andrea in sod., 1989). EPOR se aktivira z vezavo liganda, ki povzroči homodimerizacijo receptorja (slika 1) (Watowich in sod., 1994) in začetek postopnega transdukcijskega procesa (Watowich in sod., 1999). Večina peptidnih interakcij se zgodi na t. i. funkcionalnem epitopu, majhni hidrofobni ploščati regiji zunajcelične domene (Phe 93, Met 150, Phe 205) (slika 2) (De Vos in sod., 1992), ki dokazano sproži za EPO specifične učinke tako v živalskih modelih kakor v celičnih kulturah (Wrighton in sod., 1996).



Slika 1. Kristalna struktura kompleksa homodimernega EPOR z vezanim EPO [EPObp: EPO vezavni protein oz. EPOR] (Syed in sod., 1998: 512).



Slika 2. Povečan izsek funkcionalnega epitopa na homodimeru EPOR z označenimi hidrofobnimi aminokislinami, ki sodelujejo pri vezavi EPO (Middleton in sod., 1999: 14165).

V eritroidnem sistemu se *EPOR* pretežno izraža v predniških proeritroblastnih celicah CFU-E (angl. *colony forming unit-erythrocyte*) do stopnje bazofilnega eritroblasta (Spivak, 2005), sicer pa se *EPOR* nahajajo tudi na številnih nehematopoetskih celičnih tipih, npr. na endotelijskih celicah, hepatocitih ter na živčnih in neživčnih celicah živčnega sistema (Juul in sod., 1999; Renzi in sod., 2002).

Izražanje *EPOR* v hematopoetskih tkivih je med eritropoezo natančno uravnavano, medtem ko podrobni molekularni mehanizmi v drugih tkivih še niso popolnoma razjasnjeni, čeprav je verjetno, da ima EPO tudi na druga tkiva podobne učinke kot na hematopoetska (Renzi in sod., 2002). Brines in Cerami (Brines in Cerami, 2005; 2012; Brines in sod., 2004; 2008) sta glavna zagovornika ideje, da je mehanizem tkivnozaščitnega delovanja eritropoetina posredovan preko heterokompleksa receptorja, kjer naj bi poleg homodimera *EPOR* sodeloval tudi skupni β -receptor (β cR, angl. *β -common receptor*), vendar je Um s svojo skupino (2007) z dokajšnjo gotovostjo dokazal, da za celični liniji SH-SY5Y in PC12 to ne velja. Z NMR tehnologijo ter s kristalografijo so dokazali, da na teh celicah ne pride do sočasnega izražanja *EPOR* in hipotetičnega partnerja β cR, ter da je funkcionalen *EPOR* prisoten na celični površini tudi v odsotnosti EPO. β cR je sicer skupna podenota interleukinov 3 in 5 ter receptorja za granulocitno makrofagni kolonije spodbujevalni dejavnik (GM-CSF) (Brines in sod., 2004).

1.1.3 Zaščitni učinek EPO

Zadnjih dvajset let se je s proučevanjem zaščitnega učinka EPO ukvarjalo veliko raziskovalnih skupin. Posledično je v obtoku kopica člankov, v katerih so z različnimi režimi, koncentracijami in modelnimi sistemi dokazovali vpliv EPO na obseg umetno sprožene apoptoze. Nekatere raziskovalne skupine so potrdile zaščitni učinek EPO, vendar obstaja tudi precej nasprotujočih si dokazov.

Gen *EPOR* se izraža v različnih tipih možganskih celic: v živčnih progenitorskih celicah, mikroglialnih celicah, astrocitih, nevronih in oligodendrocitih. V hipoksičnih razmerah možganske celice izražajo tudi *EPO*, in sicer večinoma astrociti, medtem ko se *EPOR* izraža pretežno v nevronih (Juul in sod., 1999). Tkivnozaščitno vlogo EPO najpogosteje proučujejo na srčnem in na živčnem tkivu.

Raziskave zaščitnega učinka EPO na živčevje so največkrat opravili na mišjih in podganjih modelih (Bernaudin in sod., 1999; Noshita in sod., 2001; Shein in sod., 2008; Fu in sod., 2011; Köllensperger in sod., 2011; Zhao in Rempe, 2011), od celičnih linij pa sta bili med najpogosteje testiranimi liniji človeškega nevroblastoma (SH-SY5Y) in podganjega feokromocitoma (PC12), ki smo ju uporabili tudi mi.

Zaščitni učinek EPO na celice linije SH-SY5Y je raziskovalna skupina iz Argentine potrdila z 12-urno izpostavitvijo 1, 5, 10 in 25 E/ml EPO pred sproženjem apoptoze, pri čemer je zaščitni učinek EPO s koncentracijo naraščal, medtem ko naj bi zgolj 6-urna izpostavitvev pred sproženjem apoptoze in sočasna izpostavitvev EPO ter sproženje apoptoze ne imela učinka (Pregi in sod., 2006). Nasprotno pa skupina iz ZDA poroča, da so največji zaščitni učinek dosegli z EPO v koncentraciji le 0,01 E/ml, in sicer z izpostavitvijo pred sproženjem apoptoze in sočasno izpostavitvijo EPO ter sproženjem apoptoze (Um in sod., 2007).

Zaščitni učinek na celice linije PC12 so zaznali pri 1-urni izpostavitvi EPO in nadaljnjemu sočasnemu sproženju apoptoze in izpostavljanju EPO (koncentracije 0,5 do 20 E/ml) (Tanaka in sod., 2001; Ma in sod., 2009; Zhi-Kun in sod., 2012) ter tudi pri 3 do 7-dnevnom sočasnem diferenciranju in izpostavljanju celic PC12 EPO koncentracij 0,7-70

E/ml, čemur je sledilo proženje apoptoze ob neprekinjeni izpostavitvi EPO (Tanaka in sod., 2001).

Rezultati večine raziskav kažejo, da naj bi ustrezna koncentracija in režim izpostavitve EPO popolnoma preprečila umetno sproženo apoptozo oz. naj bi EPO po začetnem povečanju apoptoze obnovil celično viabilnost do ravni, primerljive s kontrolnimi celicami, gojenimi v polnem rastnem mediju – brez apoptoze (Pregi in sod., 2009; Zhi-Kun in sod., 2012). Kljub temu pa nekatere druge raziskave kažejo le 50-odstotno povišanje celične viabilnosti po uspešnem režimu izpostavitve EPO (Um in sod., 2007).

Kot primerne sprožiteljce apoptoze na izbranih celičnih linijah različni avtorji največkrat navajajo obdelavo s stavrosporinom (Pregi in sod., 2006; Um in sod., 2007; Wenker in sod., 2010), H_2O_2 (Shi in sod., 2010; Sinclair in sod., 2010), amiloidom β (Li in sod., 2008; Zhi-Kun in sod., 2012), MPTP (Wu in sod., 2007) in $TNF-\alpha$ (dejavnik tumorske nekroze α) (Pregi in sod., 2009; Wenker in sod., 2010) ter *in vitro* sprožanje hipoksije (Meloni in sod., 2006; Wenker in sod., 2010). Za merjenje vpliva na obseg apoptoze pa najpogosteje uporabljajo metode obarvanje z barvilom Hoechst (Pregi in sod., 2009) ali tripansko modrilo (Maroto in Perez-Polo, 1997), proučevanje razgradnje DNA (Pregi in sod., 2009; Shi in sod., 2010), merjenje kaspazne aktivnosti (Pregi in sod., 2009; Shi in sod., 2010), merjenje apoptoze preko aneksina V (Um in sod., 2007) in MTT test, ki sicer meri viabilnost celic, vendar ga raziskovalci zaradi priročnosti zelo pogosto uporabljajo tudi za posredno merjenje relativnega obsega apoptoze (Tanaka in sod., 2001; Ma in sod., 2009).

Doslej je za proučevanje učinka EPO na raven apoptoze celic PC12 le ena raziskovalna skupina uporabila odstranitev seruma iz polnega ravnega medija oz. t. i. stradanje (Koshimura in sod., 1999), medtem ko na celični liniji SH-SY5Y podobnega eksperimenta ni bilo. Sicer pa so kot prožilec apoptoze v drugačne namene različne raziskovalne skupine uporabile tako stradanje celic linije SH-SY5Y, kjer so apoptozo sprožali 1–3 dni (Macleod in sod., 2001; Aubry in sod., 2009), kakor tudi celične linije PC12, kjer naj bi bilo za sprožitev apoptoze po nekaterih nevedbah potrebnih 12 ur (Ji in Liu, 2001) oz. po drugih navedbah 3–5 dni (Koshimura in sod., 1999; Tanaka in sod., 1997).

1.1.4 Mehanizem delovanja EPO

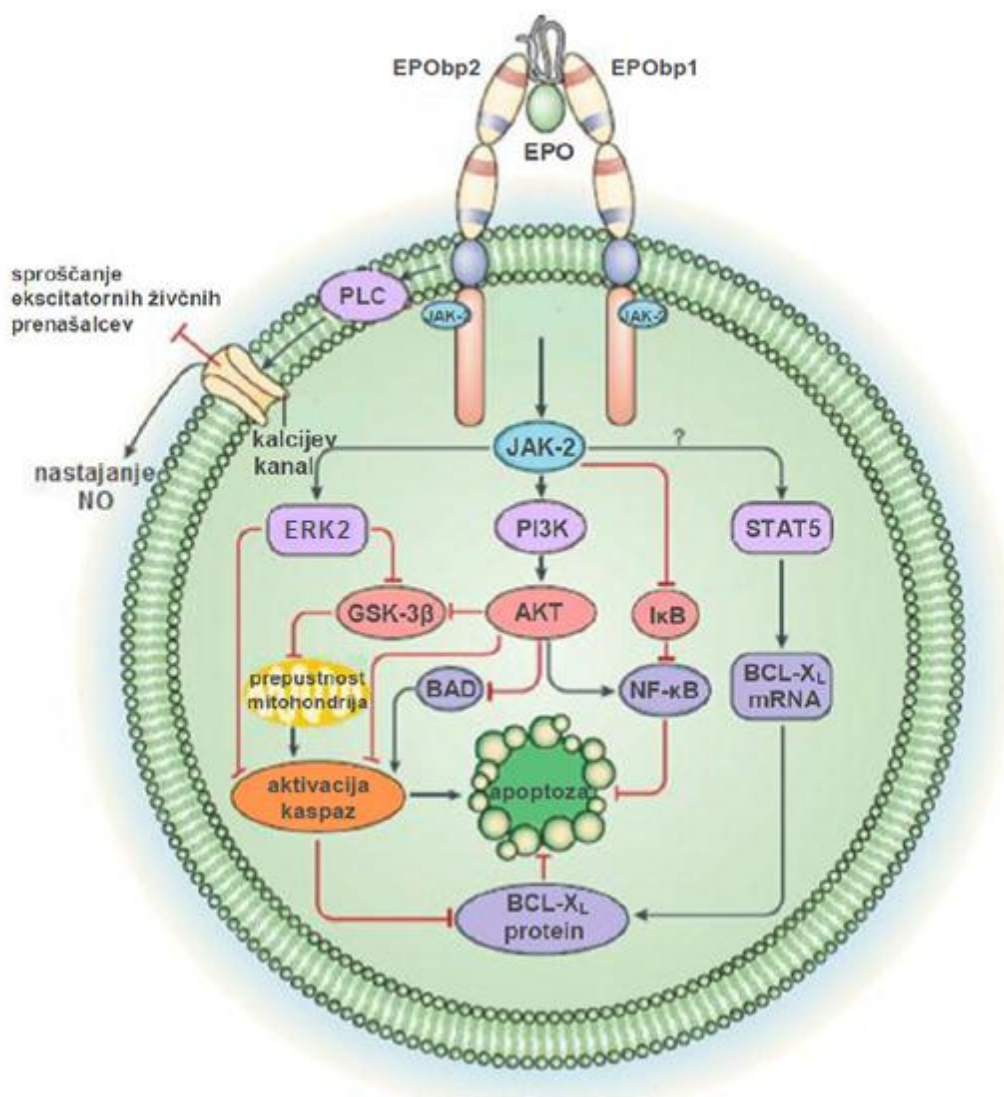
Različni dokazi kažejo, da je tkivnozaščitni učinek EPO na živčevje povezan z anti-apoptotskim, živčno-regenerativnim in protivnetnim delovanjem (Sola in sod., 2005). Mehanizem, kako celica izbere specifično pot, ki vodi v zaščitno delovanje, ni natančno znan, zagotovo pa drži, da pri tem igrajo pomembno vlogo tip celice, njen presnovni status in razpoložljivost receptorjev na njeni površini (van der Kooij in sod., 2008).

Hipoteza o povratni zanki pravi, da pride do zaščitnega učinka EPO zaradi povečanega števila EPOR na celični membrani. Povečanje izražanja gena *EPOR* so dokazali Pregi in sodelavci (2006), ki so v celicah linije SH-SY5Y zaznali od koncentracije EPO (1, 5, 10 in 25 E/mL) odvisno povišanje izražanja *EPOR*.

Pregi in njegova skupina so leta 2006 dokazali, ob izpostavljanju celic SH-SY5Y EPO ne pride do dviga izražanja gena *BCL-2* (Pregi in sod., 2006), medtem ko so 4 kasneje Wenkerjeva in njena skupina dobili rezultat, da se izpostavitve EPO sproži povečanje izražanja anti-apoptotskih genov *BCL-XL* in *BCL-2* (Wenker in sod., 2010).

Večina raziskovalnih skupin je soglasnih, da EPO spodbuja funkcionalnost in viabilnost živčnih celic preko aktivacije kalcijevih kanalčkov. Nevralni odzivi na aktivacijo Ca^{2+} kanalčkov so npr. eksocitoza, aktivacija encimov in fosforilacija proteinov. Po 5-dnevnem stradanju oz. predhodnem izpostavljanju zelo nizkim koncentracijam EPO, le-ta sproži depolarizacijo membrane ter poveča privzem Ca^{2+} in celokupno koncentracijo Ca^{2+} v celicah (Masuda in sod., 1993; Koshimura in sod., 1999). Poročajo tudi o povečani produkciji NO (dušikovega oksida) v celicah, izpostavljenih EPO, pri čemer pa naj EPO ne bi vplival na nastajanje NO oz. na NOS (sintazo dušikovega oksida) (Koshimura in sod., 1999).

Slika 3 prikazuje najpogostejše obravnavane signalne poti, vključene v mehanizem zaščitnega delovanja EPO.



Slika 3. Znotrajcelične signalne poti, vključene v mehanizem zaščitnega učinka EPO [EPObp: EPO vezavni protein; PLC: fosfolipaza C; JAK-2: Janusna kinaza 2; NO: dušikov oksid; ERK2: z zunajceličnimi signali nadzorovana kinaza 2; PI3K: fosfatidilinozitol 3-kinaza; STAT5: signalni prenašalec in aktivator transkripcije; GSK-3β: kinaza glikogen-sintaze 3β; AKT: proteinska kinaza B; IκB: inhibitor κB; NF-κB: jedrni dejavnik κB; BCL-XL: anti-apoptotski protein; BAD: pro-apoptotski protein] (prirejeno po Brines in Cerami, 2005: 489).

EPO z vezavo na receptorski homodimer (EPObp1 in EPObp2) povzroči fosforilacijo Janusne kinaze 2 (JAK-2) (transfosforilacija). Citoplazemska domena EPOR vsebuje 8 tirozinskih ostankov, ki se ob spodbujanju z EPO prehodno fosforilirajo in se po 30 minutah vrnejo nazaj v začetno stanje. Fosforilirani tirozini predstavljajo sidrišča za rekrutacijo proteinov, ki vsebujejo SH2 domeno, med njimi PI3K (fosfatidilinozitol 3-kinaza) in STAT5 (signalni prenašalec in aktivator transkripcije) (Constantinescu in sod., 1999; Frank, 2002; Witthuhn in sod., 1993). STAT5 se premesti v jedro, kjer uravnava

transkripcijo (Wojchowski in sod., 1999). Njegova aktivacija povzroči povišano izražanje anti-apoptotskih genov *BCL-X_L* in *BCL-2* (Wei in sod., 2006) in znižano izražanje pro-apoptotskih genov, npr. *BAX* (Kumral in sod., 2006), aktivacija PI3K pa povzroči aktivacijo AKT (proteinska kinaza B) in ERK2 (z zunajceličnimi signali nadzorovana kinaza 2 (Burgering in Coffey, 1995; Campana in sod., 1998; Bao in sod., 1999; Koshimura in sod., 1999), kar privede do inhibicije apoptoze oz. preživetja celice (Brines in Cerami, 2012).

Glavni dejavnik, ki vodi do inhibicije apoptoze, je verjetno AKT, serinsko-treoninska proteinska kinaza, ki deluje kot celični analog virusnega onkogenega v-Akt in igra ključno vlogo pri uravnavanju preživetja in apoptoze (Burgering in Coffey, 1995; Franke in sod., 1997). Fosforilirana oblika AKT preko inaktivacije različnih tarč, med drugim pro-apoptotskega proteina BAD, preprečuje apoptozo oz. povzroči preživetje celic (Datta in sod., 1997; del Peso in sod., 1997). Ostale tarčne molekule AKT so še GSK-3, p53, citokrom c in NF- κ B (Datta in sod., 1999; Culmsee in Mattson, 2005). ERK2 je proteinsko kinazna signalna molekula, ki sodeluje pri uravnavanju mejoze, mitoze in postmitotičnega dogajanja v diferencirani celici. Signalne poti ERK2 lahko sprožijo različni dražljaji, kot so rastni dejavniki, citokini, transformirajoči dejavniki in karcinogeni, okužba z virusi itd. Včasih se kot sinonim za kinazo, ki jo nadzorujejo zunajcelični signali (ERK2), uporablja izraz MAPK (z mitogenom aktivirani protein-kinaza) (Rožman in Jež, 2010). Aktivacijo signalnih poti v celični liniji PC12 ob izpostavitvi EPO je proučeval tudi Meloni s sodelavci (2006), ki poleg signalne poti ERK in drugih omenjenih navaja tudi spremembe v signalnih poteh oz. molekulah serinske proteaze p38 in s stresom aktivirane proteinske kinaze JNK. Nasprotno pa Wu in sodelavci (2007) navajajo, da pri zaščiti pred apoptozo v celicah PC12 ni vključena signalna pot ERK, temveč da gre zgolj za signalno pot Akt/GSK-3 β /kaspaza-3.

Signalne poti v hematopoetskih tkivih, ki usmerjajo diferenciacijo oz. zorenje eritroidnih celic, so presežne v smislu da kljub večim različnim mutacijam še vedno lahko pride do normalnega nastajanja rdečih krvničk, iz česar sledi logičen sklep, da najverjetneje vse poti delujejo v smeri aktivacije anti-apoptotskih proteinov (Constantinescu in sod., 1999).

1.1.5 Apoptoza

Pri procesu apoptoze gre za kompleksne in prefinjene kaskade molekulskih dogodkov, odvisnih od energije, ki vodijo v programirano in natančno uravnavano celično smrt. Glavni poti proženja apoptoze sta ekstrinzična in intrinzična pot, ki sta med seboj povezani in vplivata ena na drugo. Obstaja še tretja pot proženja apoptoze, perforinska/grancimska pot, ki vključuje citotoksične limfocite T.

Ekstrinzična pot proženja apoptoze se aktivira kot odziv na številne zunanje dražljaje, ki jih celica zazna s t. i. smrtnimi receptorji. Domena smrtnega receptorja se preko kaskade molekulskih dogodkov poveže z iniciatorsko kaspazo 8, ki nato aktivira kaspazo 3 ali cepi BID, protein družine BCL-2, kar vodi v nastanek apoptosoma in v aktivacijo kaspaze 9 (Elmore, 2007).

Kaspaze sestavljajo veliko družino zelo ohranjenih proteinov. Delimo jih na dve večji poddružini: kaspaze, ki sodelujejo pri vnetju (kaspaze, homologne kaspazi 1), in kaspaze, povezane z genom *CED-3* (angl. *cell death abnormal 3*), ki so primarno vpletene v apoptozo (Richardson in Kumar, 2002). So ubikvitarni encimi, ki jih v normalni celici najdemo v neaktivni obliki – kot cimogene. Aktivacija vključuje cepitev cimogena ob aspartatu med podenotami in s tem odstranitev prodomene encima. Aktivno mesto je heteromer iz male in velike podenote, končna aktivna oblika kaspaze pa je proteinski tetramer, sestavljen iz dveh takšnih heterodimerov (Pižem in Cör, 2001).

Intrinzično pot proženja apoptoze lahko aktivirajo različni signali iz okolja, kot so pomanjkanje rastnih dejavnikov, sevanje, toksini, hipoksija, virusna infekcija itd. Vključuje mrežo različnih dražljajev, ki ne delujejo preko receptorjev, temveč neposredno na tarčne proteine in tako vodijo do sprememb notranje membrane mitohondrija, kar povzroči nastanek por in s tem izgubo transmembranskega potenciala mitohondrija in sprostitvev pro-apoptotskih proteinov iz medmembranskega prostora v citosol. Ti proteini aktivirajo različne kaspaze, povzročijo nastanek apoptosoma ter v kasnejšem stadiju apoptoze tudi razgradnjo DNA in zgostitev kromatina. V uravnavanje omenjenih mitohondrijskih dogodkov je vpletena družina proteinov BCL-2, te pa nadzoruje protein p53, ki zavira rast tumorja. Proteine družine BCL-2 razdelimo v 3 skupine. Skupina 1

vključuje anti-apoptotske proteine (BCL-2, Bcl-X_L, BCL-X_S ...), proteini skupin 2 in 3 pa so proapoptotski (BAX, BAD, BID ...) – vključeni v permeabilizacijo zunanje mitohondrijske membrane (Elmore, 2007). BAX se v stresnih razmerah premesti na mitohondrijsko membrano ter povzroči nastanek por in izhajanje citokroma c, ki nato sproži apoptozo. Drugi način pro-apoptotskega delovanja BAX je preko aktivacije kaspaze 3, tretji pa preko vezave na anti-apoptotske proteine, ki jih s svojo vezavo blokira, kar je prav tako glavni mehanizem delovanja proteina BAD. BCL-2 deluje anti-apoptotsko preko nadzora prepustnosti mitohondrijske membrane in preko vezave na aktivacijski dejavnik 1 apoptozne proteaze (APAF-1), kar oboje vodi do preprečitve aktivacije kaspaz (Tsujimoto in Croce, 1986; Oltvai in sod., 1993).

Vse poti sproženja apoptoze se na koncu združijo v izvršilno pot, ki se prične z aktivacijo izvršilne kaspaze 3 in se odrazi v razgradnji DNA, zgostitvi kromatina, razgradnji citoskeleta in jedrnih proteinov, prečnem povezovanju proteinov, nastanku apoptotskih telesc, izražanju ligandov za receptorje fagocitotskih celic in nazadnje v fagocitozi. Značilni sprožilec za fagocitozo je premik fosfatidilserina na zunanjo membrano (Elmore, 2007).

Ker v celični kulturi lahko pride sočasno z apoptozo tudi do nekroze, je pomembno, da ju znamo ločiti. Nekroza je namreč toksični proces, pri katerem je celica pasivna žrtev, ki sledi od energije neodvisnemu procesu celične smrti. Nekateri procesi so skupni obema procesoma, najpomembnejše morfološke razlike, ki razlikujejo apoptozo od nekroze, pa so prikazane v preglednici 1 (Elmore, 2007).

Preglednica 1. Morfološke razlike med apoptozo in nekrozo (prirejeno po Elmore, 2007: 496).

Apoptoza	Nekroza
posamezne celice ali manjši skupki	večji skupki, konfluentne celice
skrčenje celice	nabrekanje celice
internukleosomska razgradnja DNA	naključna in difuzna razgradnja DNA
nepoškodovana celična membrana	poškodovana celična membrana
citoplazma zadržana v apoptotskih telescih	citoplazma sproščena v okoliško tkivo ali medij
ni vnetja, fagocitoza apoptotskih telesc	vnetje običajno prisotno

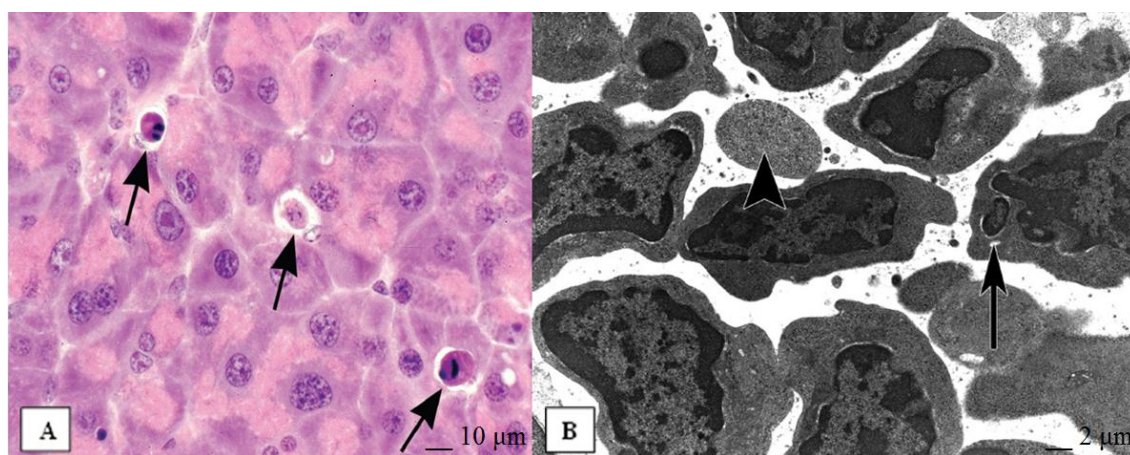
1.1.6 Testi za merjenje apoptoze

V proces apoptoze je vključenih mnogo različnih dejavnikov in kompleksnih zaporednih dogodkov, ki so natančno uravnavani v več točkah. Te regulacijske točke nam lahko služijo kot orodje za proučevanje vpletenih proteinov – aktivatorjev, efektorjev in regulatorjev apoptoze, preko katerih lahko z različnimi apoptotskimi testi zaznavamo ali štejemo apoptotske celice. Ker so si dogodki v apoptozi in nekrozi lahko precej podobni, je ključnega pomena, da za natančno določanje apoptotskih celic uporabimo vsaj dva testa, ki temeljita na različnih principih (Elmore, 2007). V uporabi je širok nabor apoptotskih testov, od katerih ima vsak svoje prednosti in slabosti, ki se jih moramo pri izbiri najprimernejšega za posamezen primer dobro zavedati (Watanabe in sod., 2002; Otsuki in sod., 2003). Zato je zelo pomembno poznavanje kinetike apoptoze v izbranem modelu. Nekateri proteini, npr. kaspaze, se v procesu apoptoze namreč izrazijo le prehodno. Prav tako se moramo zavedati, da celice, gojene v kulturi, sčasoma zapadejo v sekundarno nekrozo. To je stanje, ko celice po določenem času inkubacije prenehajo s presnovnimi procesi, izgubijo membransko integriteto in sprostijo citoplazemsko vsebino v okolje. Zaradi tega lahko dobimo lažen pozitiven rezultat, po drugi strani pa apoptotske celice hitro izginejo, kar lahko vodi do lažnega negativnega rezultata, če testa ne opravimo ob primerni časovni točki. Izbira primerne sprožilca apoptoze, časovne točke in tipa testa ima zato velik pomen. Teste za merjenje apoptoze v celičnih kulturah lahko glede na to, katero apoptotsko značilnost zaznavajo, razdelimo v 5 skupin, opisanih v nadaljevanju (Elmore, 2007).

i. Citomorfološke spremembe

Pod svetlobnim mikroskopom lahko vidimo značilnosti kasnejše faze apoptoze: krčenje celice in piknozo. Velikost celic se manjša, citoplazma postaja gostejša in organeli bolj tesno pakirani. Piknoza je najbolj značilen pojav apoptoze in je posledica zgostitve kromatina. Po barvanju s hematoksilinom in eozinom predstavljajo apoptotske celice okrogle ali ovalne mase z intenzivno eozinofilno citoplazmo in gostimi drobcami kromatina. Odmaknjene so od svoje okolice, kar je vidno kot svetel pas, ki jih obdaja (slika 4A) (Štiblar Martinčič, 1998). Metoda zazna poznejše dogodke v apoptozi, zato celic v zgodnji fazi apoptoze ne zaznamo in je priporočljiva potrditev s katerim od

drugih apoptotskih testov. Nasprotno pa je transmisijška elektronska mikroskopija (TEM) uveljavljena kot zlati standard za potrditev apoptoze. Nedvoumno lahko namreč potrdimo glavne značilnosti apoptoze: elektronsko gosto jedro – v zgodnji fazi ostro ločeno od citoplazme, saj se kromatin oblikuje v ostro ločeno drobno zrnato maso, ki se zbira ob robu jedrne ovojnice, jedro je fragmentirano, membrana celice ostaja nepoškodovana tudi v poznem stadiju apoptoze, v celici se pojavijo neorganizirani organeli ter velike in bistre vakuole, celice se gubajo in na površini nastajajo brstiči, celice razpadajo v apoptotska telesca, ki so obdana z dobro ohranjeno notranjo in zunanjo membrano, in prihaja do fagocitoze apoptotskih telesc (slika 4B). Slabosti TEM so visoka cena, časovna potratnost in zmožnost testiranja le majhnega odseka naenkrat (Verhaegen, 1998; Štiblar Martinčič, 1998).



Slika 4. Citomorfološke spremembe med apoptozo: A) mikrografija mišjega pankreasa, barvanega s HE, posneta s svetlobnim mikroskopom (puščice prikazujejo apoptotične celice, ki so skrčene in imajo zgoščeno citoplazmo in fragmentirano jedro); B) transmisijška elektronska mikrografija priželjca – limfociti v zgodnji fazi apoptoze z zgoščenim kromatinom in citoplazmo ter nepravilno obliko celice (leva puščica prikazuje apoptotsko telesce, desna pa fragment jedra) (Elmore, 2007: 497 in 499).

ii. Internukleosomska razgradnja DNA

Zgostitev kromatina je povezana s cepljenjem jedrne DNA z endonukleazami v območju vrzeli med nukleosomi. Pri tem nastanejo številni fragmenti, dolgi od 180 do 200 baznih parov. Razgradnjo DNA lahko prikažemo z elektroforezo, pretočno citometrijo ali označevanjem z različnimi barvnimi ali fluorescentnimi označevalci. Pri elektroforezi dobimo značilno sliko lestve DNA v agaroznem gelu, pretočna citometrija pa nam odkrije z biotiniliranimi nukleotidi označene fragmente DNA.

Metodi sta primerni zaradi enostavnosti in uporabni za tkiva in celične kulture z velikim številom apoptotičnih celic. Pri proučevanju apoptoze celic je večkrat pomembna prepoznavna in lokalizacija teh celic v tkivnem vzorcu, česar pa zgoraj omenjeni metodi ne omogočata. Testi za zaznavanje razgradnje DNA v posamezni celici običajno temeljijo na označevanju koncev nukleosomskih fragmentov, ki jih zaznamo kolorimetrično ali kot fluorescenco (Elmore, 2007).

iii. Zaznavanje kaspaz oz. cepljenih kaspaznih substratov, regulatorjev in inhibitorjev

Zelo dobri tarči za merjenje obsega apoptoze sta iniciatorska in efektorska kaspaza. Z luminiscentnimi in fluorescentnimi substrati zaznamo cepitev različnih cimo-genov kot značilnost apoptoze. Za določanje aktivne oblike kaspaz lahko uporabljamo tudi protitelesa in fluorescentno označene inhibitorje kaspaz. Iniciatorski kaspazi pri človeku sta 8 in 9. Ti dve lahko s proteolizo aktivirata efektorske kaspaze, med drugimi tudi kaspazo 3, ki nato cepi tarčne proteine in povzroči apoptozo. Kaspaze so močno uravnavane na transkripcijski ravni in z endogenimi anti-apoptotskimi polipeptidi. Testi, s katerimi neposredno merimo kaspazno aktivnost, omogočajo tudi razumevanje mehanizma celične smrti (Elmore, 2007).

iv. Spremembe na celični membrani

Zdrave evkariontske celice vzdržujejo značilno asimetrijo v fosfolipidnem dvosloju, med celično smrtjo pa se močno poveča vsebnost fosfatidilserina na zunanji membrani (in zmanjša na notranji). Celično smrt tako lahko zaznamo preko proteina, ki se z visoko afiniteto veže na fosfatidilserin. To je npr. aneksin V, ki ga konjugiramo z barvilom ali fluorescentno molekulo in tako na specifičen način označimo umirajoče celice. Na podoben način lahko apoptozo zaznavamo tudi s kalretikulinom in trombospondinom-1. Glavna prednost je visoka občutljivost testa (z uporabo pretočne citometrije lahko zaznamo posamezne apoptotske celice). S kombinacijo posebnih barvil lahko razlikujemo med apoptotičnimi in nekrotičnimi celicami (Elmore, 2007).

v. Mitohondrijske spremembe

Spremembe v metabolični aktivnosti mitohondrija so značilne za kasnejšo fazo apoptoze. Gre za porušitev elektrokemijskega gradienta skozi zunanjo mitohondrijsko

membrano, do česar pride zaradi delovanja proteinov družine BCL-2, ki povzročijo nastanek por v mitohondrijski membrani. Z laserskim presevnim konfokalnim mikroskopom lahko opazujemo številne spremembe na mitohondrijih: nastanek por v mitohondrijih, depolarizacijo notranje membrane mitohondrija, tok Ca^{2+} , redoks status mitohondrija in reaktivne kisikove spojine. Z laserskim ali fluorescentnim mikroskopom pa lahko opazujemo tudi izhajanje citokroma c iz mitohondrijev ter različne pro- in anti-apoptotske regulatorne proteine. Pogosto uporabljena metoda za opazovanje sprememb na zunanji mitohondrijski membrani je barvanje s fluorescentnim kationskim barvilom, npr. JC-1. V zdravih neapoptotičnih celicah se liofilizirano barvilo akumulira v mitohondriju in ko doseže kritično koncentracijo, tvori skupke, ki oddajajo specifično svetlo rdečo fluorescentno svetlobo, v apoptotičnih celicah pa barvilo difundira v citoplazmo, kjer njegove molekule v monomerni obliki oddajajo fluorescenco drugačne barve, v tem primeru zeleno (Elmore, 2007).

1.2 NAMEN DELA

V zadnjih letih so večino raziskav delovanja eritropoetina opravili na mišjih modelih (Bernaudin in sod., 1999; Noshita in sod., 2001; Shein in sod., 2008; Fu in sod., 2011; Köllensperger in sod., 2011; Zhao in Rempe, 2011). Razvoj *in vitro* metod na celičnih linijah bi v primerjavi z mišjimi modeli (*in vivo*) prinesel znatne prednosti: možnost izvajanja visoko zmogljivostnih analiz, zagotavljanje nespremenljivih razmer, etično nesporno raziskovanje učinka na žive sisteme ter skladnost s priporočili za zmanjšanje uporabe poskusnih živali.

Cilji magistrskega dela so bili:

- i. najti primeren sprožilec apoptoze za proučevanje učinka eksogeno dodanega EPO,
- ii. razviti metodo, ki omogoča merjenje tkivnozaščitnega učinka eritropoetina *in vitro* v celičnem modelu (potencialni tkivnozaščitni učinek EPO merjen kot učinek na raven apoptoze) ter
- iii. proučiti tkivnozaščitni učinek EPO *in vitro* na izbranih celičnih linijah nevralnega izvora.

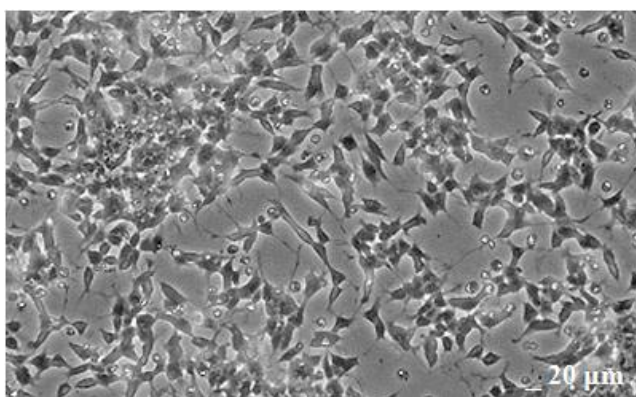
1.3 HIPOTEZA

Rastni dejavnik eritropoetin poleg svoje osnovne funkcije kot hematopoetski dejavnik nakazuje tudi zaščitni učinek na živčevje. Pričakujemo, da bomo ob ustreznem režimu izpostavitve celic eritropoetinu zaznali zmanjšano raven apoptoze v primerjavi s kontrolnimi celicami.

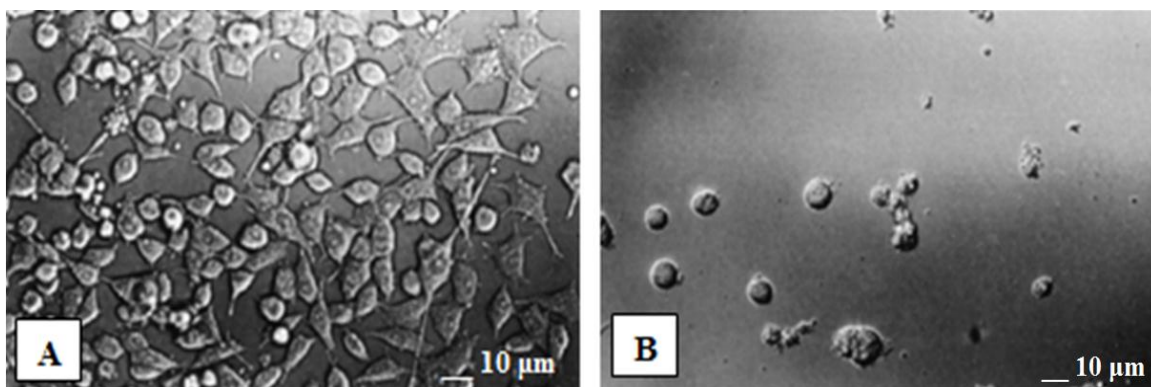
2 MATERIAL IN METODE

2.1 MATERIAL

Izbrana modela za proučevanje učinka EPO sta bili trajni celični liniji človeškega nevroblastoma SH-SY5Y (slika 5) in podganjega feokromocitoma PC12 (slika 6). Poreklo celične cinije SH-SY5Y je laboratorij doc. dr. Nataše Debeljak, od koder je tudi celična linija PC12, na kateri so bili narejeni poskusi prenosa proteinov western. Vse ostale poskuse na celični liniji PC12 smo opravili na celicah iz laboratorija prof. dr. Janka Kosa. Obe liniji sta nevralnega izvora in izražata *EPOR* (Masuda in sod., 1993).



Slika 5. Slika celic SH-SY5Y (LGC/ATTC, 2012).



Slika 6. Slika celic PC12: A) diferencirane celice (gojene 3 dni v mediju DME s 100 ng/ml NGF); B) nediferencirane celice (gojene v mediju DME z dodatkom 10 % HS in 5 % FBS) (Tanaka in sod., 1997: 4).

Celični liniji smo gojili v medijih, ki vsebujejo osnovna hranila, ki se vgradijo v deleče se celice (aminokisline, maščobne kisline, sladkorje, ione, elemente v sledih, vitamine, kofaktorje in snovi za ohranjanje ustreznega okolja), dopolnjenih s serumom. Za gojenje

SH-SY5Y smo uporabili medija DME z 10 % FBS in DME/F12 z 10 % FBS (LGC/ATTC, 2012), za PC12 pa medij DME z dodanim 10 % HS in 5 % FBS (Masuda in sod., 1993; Morishita in sod., 1997; Wu in sod., 2007). Ti mediji so v nadaljevanju magistrskega dela navedeni kot »polni rastni mediji«. Celice smo za vzdrževanje linije gojili v gojitvenih posodah s površinami 25, 75 in 150 cm² (posode T25, T75, T150) v nadzorovani vlažni atmosferi s 5 % CO₂, poskuse pa smo izvajali na gojitvenih ploščah s 6, 12 in 96 vdolbinicami z manjšimi površinami. Celice SH-SY5Y rastejo pritrjene na podlago, zato smo jih pri dosegu 75% konfluentnosti precepljali s tripsinom (0,25%) v raztopini EDTA (1,1 ml/T75), celice linije PC12 pa so suspenzijske, zato smo jih precepljali s centrifugiranjem (1300x g, 5 minut). Celice smo za poskuse uporabljali od dosežene 3. do 17. pasaže. Za naše namene je bilo potrebno celice linije PC12 pred izpostavitvijo EPO diferencirati 5 dni na ploščah (diferenciacija se je izkazala za najuspešnejšo na ploščah s 6 vdolbinicami), prevlečenih z 10 µg/ml kolagena tipa 4 (koncentracijo smo določili eksperimentalno), s 100 ng/ml NGF (živčni rastni dejavnik) (Greene in Tischler, 1976) v mediju DME brez dodanega seruma, diferenciacijski medij pa je bilo potrebno menjavati vsakih 48 ur, da so celice začele izražati lastnosti živčnih celic (obsežne fenotipske spremembe, prenehanje delitev, izražanje nevritov, pridobitev električne vzdražnosti) (cit. po Harrill in Mundy, 2011). Kot diferencirane smo smatrali pritrjene celice z vsaj enim izrastkom (nevritom), daljšim od premera same celice (Gunning in sod., 1981; Das in sod., 2004).

V preglednicah 2-4 so navedene vse uporabljene kemikalije in laboratorijski material.

Preglednica 2. Kemikalije, uporabljene pri magistrskem delu.

Kemikalija	Proizvajalec	Namen uporabe
2-merkaptotetanol	Sigma-Aldrich, ZDA	prenos western
2-propanol	J.T.Baker, Nizozemska	izolacija RNA
akrilamid/bis-akrilamid	BioRad, ZDA	prenos western
amonijev persulfat (APS)	Serva, Nemčija	prenos western
<i>Cell Death Detection ELISA^{PLUS}</i>	Roche, ZDA	komplet za merjenje internukleosomske razgradnje DNA
dGTP, dCTP, dTTP, dATP (100 mM)	Promega, ZDA	sinteza cDNA

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2. Kemikalije, uporabljene pri magistrskem delu.

Kemikalija	Proizvajalec	Namen uporabe
<i>DNase I</i> (DNaza in 10x pufer)	Roche, Nemčija	RT-PCR reakcija
<i>Dulbecco's Modified Eagle</i> (DME) – <i>high glucose</i> medij	Sigma-Aldrich, ZDA	medij za gojenje celic (PC12 in SH-SY5Y)
<i>Dulbecco's Modified Eagle /Ham's F-12 Nutrient Mixture</i> (DME/F12) medij	Sigma-Aldrich, ZDA	medij za gojenje celic (SH-SY5Y)
eritropoetin (HX575), 2,5 mg/ml	Lek, Slovenija	izpostavitve celic
etanol	Kefo, Slovenija	izolacija RNA in dezinfekcija delovne površine
FBS (fetusni serum goveda)	Sigma Chemical, Nemčija	dodatek rastnemu mediju
glikogen, 5 mg/ml	Ambion, ZDA	izolacija RNA
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, ZDA	prenos western
<i>Homogeneous Caspases Assay, fluorimetric</i>	Roche, ZDA	komplet za merjenje apoptoze preko aktivacije kaspaz
kloroform	Carlo Erba, Španija	izolacija RNA
kolagen iz človeške placentе Bornstein in Traub tip IV	Sigma-Aldrich, ZDA	diferenciacija celic PC12
konjski serum (HS)	Gibco, Kanada	dodatek rastnemu mediju
metanol	Carlo Erba, Španija	prenos western
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, ZDA	prenos western
NaDS	Carl Roth, Nemčija	prenos western
NaF	Merck, Nemčija	prenos western
naključni začetni oligonukleotidi (heksameri, 500 µg/ml)	Promega, ZDA	sinteza cDNA
natrijev bikarbonat	Sigma-Aldrich, ZDA	dodatek rastnemu mediju
NGF-β, podganji, 0,5 mg/ml	Sigma-Aldrich, ZDA	diferenciacija celic PC12
NP-40	Sigma-Aldrich, ZDA	prenos western
<i>NuPAGE® LDS Sample Buffer</i>	Sigma-Aldrich, ZDA	prenos western
PBS (fosfatni pufer z NaCl)	Sigma-Aldrich, ZDA	raztapljanje glikogena in kolagena, spiranje celic, prenos western
<i>Pierce® ECL Western Blotting Substrate</i>	Thermo Scientific, ZDA	prenos western

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2. Kemikalije, uporabljene pri magistrskem delu.

Kemikalija	Proizvajalec	Namen uporabe
placebo EPO (59 mM Na-fosfat, 150 mM NaCl, pH 7)	Kemijski inštitut, Slovenija	izpostavitve celic
PMSF	Sigma-Aldrich, ZDA	prenos western
<i>Pierce[®] BCA Protein Assay kit</i>	Thermo Scientific, ZDA	merjenje koncentracije proteinov
primarna protitelesa Akt, P-Akt, Stat, P-Stat, 44/42 MAPK, P-44/42 MAPK	Cell Signaling Technology, ZDA	prenos western
<i>RNAse-free</i> voda	Molecular Bioproducts, Mehika	izolacija RNA
sekundarna protitelesa anti-rabbit-HRP	Sigma-Aldrich, ZDA	prenos western
<i>Spectra[™] Multicolor Broad Range Protein Ladder</i>	Fermentas, Kanada	prenos western (elektroforeza)
stavosporin, 2 mg/ml	Sigma-Aldrich, ZDA	sprožanje apoptoze
<i>SuperScript RT III</i> (komplet vsebuje DTT, SSIII RT, 5x <i>First Strand</i> pufer, 10x inkubacijski pufer)	Invitrogen, Kanada	sinteza cDNA
<i>SYBR Green I Master</i> (mešanica <i>FastStart Taq</i> polimeraze, pufra, mešanice dNTP, barvila SYBR Green I in MgCl ₂)	Roche, Nemčija	RT-PCR reakcija
TEMED	Sigma-Aldrich, ZDA	prenos western
TNF- α , 2,3 mg/ml	Lek, Slovenija	sprožanje apoptoze
TRI reagent	Sigma-Aldrich, ZDA	izolacija RNA
trypsin (0,25%) v raztopini EDTA	Sigma Chemical, Nemčija	precepljanje celic SH-SY5Y
Tris	Merck, Nemčija	prenos western
Tween 20	Sigma-Aldrich, ZDA	prenos western
WST-1 (proliferacijski reagent)	Roche, ZDA	merjenje metabolične aktivnosti

Preglednica 3. Uporabljena laboratorijska oprema.

Oprema	Proizvajalec
AccuChip Kit – DigitalBio (čipi za štetje celic)	NanoEnTek, Republika Koreja
ADAM aparat za štetje celic	NanoEnTek, Republika Koreja
centrifuga	Tehtnica, Slovenija

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3. Uporabljena laboratorijska oprema.

Oprema	Proizvajalec
centrifugi 5415R in 5810R	Eppendorf, Nemčija
CO ₂ inkubator	Sanyo, Japonska
elektroforeza – NaDS poliakrilamidna (banjice, stekelca, glavnički, sendvič za mokri prenos proteinov ...)	BioRad, ZDA
Epoch, čitalnik ELISA	BioTek Instruments, ZDA
filter papir Whatman	Sigma-Aldrich, ZDA
filter za filtracijo gojišča	TPP, Švica
ImageJ 1.42q (računalniški program za analizo slik)	National Institutes of Health, ZDA
LAS-4000 (naprava za slikanje PVDF membran)	Fujifilm, Japonska
LightCycler [®] 480 (ciklični termostat za RT-PCR)	Roche, ZDA
LightCycler [®] 480 Software (program za kvantifikacijo grafov pri metodi RT-PCR)	Roche, ZDA
magnetno mešalo MMS 3000	Biosan, ZDA
Multi Gauge (program za analizo slik)	Fujifilm
nastavki za multikanalno pipeto	Biohit, Finska
PASW v.18 (program za statistično analizo)	IBM Corporation, ZDA
pH-meter	InoLab, Španija
pipete (5 ml, 10 ml in 25 ml)	TPP, Švica
pipetor Accu-Jet	Brand, Nemčija
plošče in posode za gojenje celic	TPP, Švica
plošče za gojenje celic s 96 vdolbinicami z ravnim dnom in črnimi stenami, Kaminform	Greiner Bio-One, Nemčija
PVDF membrana	Sigma-Aldrich, ZDA
spektrofotometer ND-1000 – NanoDrop	Thermo Scientific, ZDA
stresalnik	Thermo Scientific, ZDA
stresalnik	Kambič laboratorijska oprema, Slovenija
stresalnik OS-10	Biosan, ZDA
Synergy H4 (naprava za merjenje fluorescence)	Biotek Instruments, ZDA
vorteks	Biosan, ZDA
0,2 ml PCR mikrocentrifugirke v traku po 8	Star Lab, Francija
2720 Thermal Cycler (ciklični termostat za PCR)	Applied Biosystems, ZDA

Preglednica 4. V laboratoriju pripravljeni geli, pufri in druge zmesi kemikalij za prenos western.

Pripravek	Sestava
10% akrilamidni nanašalni (<i>resolving</i>) gel (za en gel)	2 ml akrilamid/bis-akrilamid (40%, 37,5:1); 2 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 3,84 ml ddH ₂ O; 0,08 ml 10% (m/v) NaDS; 0,08 ml 10% (m/v) amonijev persulfat (APS); 3,2 ml TEMED
5% akrilamidni ločitveni (<i>stacking</i>) gel (za štiri gele)	1,275 ml 40%, 37,5:1 akrilamid/bis-akrilamid; 1,25 ml 1 M Tris-HCl, pH 6; 7,275 ml ddH ₂ O; 0,1 ml 10% (m/v) NaDS; 0,1 ml 10% (m/v) amonijev persulfat (APS); 10 µl TEMED
5% BSA	BSA, razredčen z ddH ₂ O V razmerju 1:20
5x pufer za NaDS-PAGE (<i>Running buffer</i>)	15,15 g Tris, 72,05 g glicin, 5 g NaDS, 1 l ddH ₂ O
BSA v PBST	2,5 g BSA + 50 ml PBST
fosfatazni inhibitorji (PHI); za 10 ml	20 µl 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 30,6 g 10 mM glicerol; 21 mg 50 mM NaF
proteazni inhibitorji (PI); za 10 ml	50 µl 1 mM PMSF; 1 tableta PI/10 ml
PBS z dodatkom 0,1 % Tween 20 (PBST)	1 ml Twen 20 + 5 tablet PBS + 1 l ddH ₂ O
pufer za lizo celic (LLB, <i>liver lysis buffer</i>) (za 50 ml)	1 ml 20 mM TRIS, pH 7,5; 1,5 ml 150 mM NaCl; 2,5 ml 20% NP-40; 5 ml 10% glicerol; 500 µl 5 mM EDTA
pufer za mokri prenos proteinov na PVDF membrano	15,14 g TRIS; 72,05 g glicin; 1 l metanol; dopolnimo do 5 l z ddH ₂ O

Preglednica 5. Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri metodi RT-PCR [m: mišji; h: človeški; r: podganji].

Gen	Zaporedje nukleotidov
m18S-Q1	F1: 5' ACCGCAGCTAGGAATAATGGA 3' R1: 5' GCCTCAGTTCCGAAAACCA 3'
hRPLP0-Q1	F1: 5' TGCATCAGTACCCCATTCTATCA 3' R1: 5' AAGGTGTAATCCGTCTCCACAGA 3'
rRplp0-Q1	F1: 5' GATGCCCAGGGAAGACAG 3' R1: 5' GATGGGTTTACGAAGTAACAC 3'
hPPIB-Q1	F1: 5' GGAGATGGCACAGGAGGAAA 3' R1: 5' CCGTAGTGCTTCAGTTTGAAGTTCT 3'
rPpib-Q1	F1: 5' ACGTGGTTTTTCGGCAAAGT 3' R1: 5' CTTGGTGTCTCCACCTTCC 3'
hEPO-Q1	F1: 5' TCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTA 3' R1: 5' CCCTGCCAGACTTCTACGG 3'
rEpo-Q1	F1: 5' AGTCGCGTTTCTGGAGAGGTA 3' R1: 5' CCTTCTGCACAGCCCAT 3'

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 5. Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri metodi RT-PCR.

Gen	Zaporedje nukleotidov
hEPOR-Q1	F1: 5' TTGGAGGACTTGGTGTGTTTC 3' R1: 5' AGCTTCCATGGCTCATCCT 3'
hEPOR-Q2	F2: 5' TATGGCTGAGCCGAGCTT 3' R2: 5' GATGAGGGGGTCCAGGTC 3'
rEpoR-Q1	F1: 5' CCACATCCGCTACGAGGT 3' R1: 5' GCCTTCCAGGACCTCCAC 3'
hBAX-Q1	F1: 5' ATGTTTTCTGACGGCAACTTC 3' R1: 5' ATCATGTCCGGCACCTTG 3'
rBax-Q1	F1: 5' GTGAGCGGCTGCTTGTCT 3' R1: 5' GTGGGGGTCCCGAAGTAG 3'
hBAD-Q2	F2: 5' GAGTGACGAGTTTGTGGACTCCTT 3' R2: 5' TGTGCCCCGCGCTCTTC 3'
rBad-Q1	F1: 5' CAGGCAGCCAATAACAGTCA 3' R1: 5' TACGAACTGTGGCGACTCC 3'
hBCL-2-Q2	F2: 5' TCCCTCGCTGCACAAATACTC 3' R2: 5' ACGACCCGATGGCCATAGA 3'
rBcl-2-Q1	F1: 5' GTACCTGAACCGGCATCTG 3' R1: 5' GGGGCCATATAGTTCCACAA 3'

2.2 METODE

Raven apoptoze, umetno sprožene z obdelavo s stavrosporinom ali z odtegnitvijo seruma, smo merili z različnimi metodami: merjenje metabolične aktivnosti z uporabo proliferacijskega reagenta WST-1, izražanja pro- in anti-apoptotskih genov, internukleosomske razgradnje DNA ter aktiviranih kaspaz. Vse poskuse smo naredili v vsaj treh ponovitvah.

2.2.1 Metode sprožanja apoptoze in režimi izpostavitve EPO

Za umetno sproženje apoptoze smo testirali 3 različne sprožilce. Stavrosporin (STR) je znan kot eden najboljših sprožilcev apoptoze v različnih nevralnih celičnih linijah (López in Ferrer, 2000; Yuste in sod., 2002; Pregi in sod., 2006). Deluje kot nespecifični inhibitor različnih proteinskih kinaz, med drugim proteinske kinaze C (PKC), ki igra pomembno

vlogo pri celični proliferaciji, diferenciaciji in preživetju (Spitaler in Cantrell, 2004; Pregi in sod., 2006). Ustreznost sprožanja apoptoze s STR smo testirali na celični liniji SH-SY5Y po enem dnevu gojenja na ploščah s 96 vdolbinicami (nasajene s koncentracijo 10^5 celic/ml, 100 μ l/vdolbinico) z različnimi koncentracijami STR (12,5, 25 in 50 nM) in časi sprožanja apoptoze (3, 6, 9, 12 in 24 ur). Za merjenje učinka STR na celično viabilnost smo uporabili testa za merjenje metabolične aktivnosti in internukleosomske razgradnje DNA.

Kot potencialni sprožilec apoptoze smo testirali tudi TNF- α , ki ima na celice lahko zelo variabilen vpliv, odvisno od tega, na katero signalno pot deluje, saj lahko sproži tako pro- kot anti-apoptotski učinek (Aggarwal, 2003; Hehlhans in Pfeffer, 2005). Celice SH-SY5Y smo s koncentracijo 10^5 celic/ml nasadili na plošče z 12 (1 ml/vdolbinico) ali 96 vdolbinicami (100 μ l/vdolbinico) in jim po enem dnevu gojenja dodali 10 in 100 ng/ml TNF- α za 48 ur. Vpliv TNF- α na apoptozo smo merili s testom merjenja metabolične aktivnosti in z merjenjem izražanja apoptotskih genov *BAX* in *BCL-2*.

Kot tretji način smo uporabili fiziološki sprožilec apoptoze, metabolični stres, ki smo ga izzvali s popolno odtegnitvijo seruma iz medija (Koshimura in sod., 1999) oziroma s t. i. stradanjem celic, kot je sprožilec poimenovan v nadaljevanju. Celice obeh linij smo do določene konfluentnosti gojili v polnem rastnem mediju (SH-SY5Y: DME + 10 % FBS ali DME/F12 + 10 % FBS; PC12: DME + 10 % HS + 5 % FBS) oz. diferenciacijskem mediju (PC12: DME + 100 ng/ml NGF- β). Stradanje smo sprožili z dvakratnim spiranjem vdolbinic gojitvenih plošč z ogretim (37 °C) medijem (DME ali DME/F12) in nadaljnjo inkubacijo v mediju brez dodatkov za določen čas (30 minut do 3 dni, odvisno od poskusa), pri čemer smo medij menjavali na 48 ur (Tanaka in sod., 1997; Ji in Liu, 2001; Macleod in sod., 2001; Aubry in sod., 2009). Stradanje smo kot sprožilec apoptoze uporabili pri večini poskusov; vpliv smo merili z vsemi apoptotskimi testi, opisanimi v nadaljevanju tega poglavja.

Zaradi potenciala, ki ga ima EPO kot tkivnozaščitni dejavnik v farmacevtski industriji, je bilo zanimanje za njegovo učinkovanje v zadnjih letih zelo veliko. Posledica je množica različnih testiranih režimov izpostavitve EPO, zato smo sklenili z različnimi metodami preizkusiti tiste, ki so v literaturi najpogostejše navajani kot zaščitni. Za ugotavljanje

učinkov različnih koncentracij EPO, dodanega v različnih trenutkih gojenja celic in za različno dolgo časa, smo za presejalni test uporabili merjenje celične metabolične aktivnosti. Pregled vseh testiranih režimov izpostavitve EPO je predstavljen v preglednici 6.

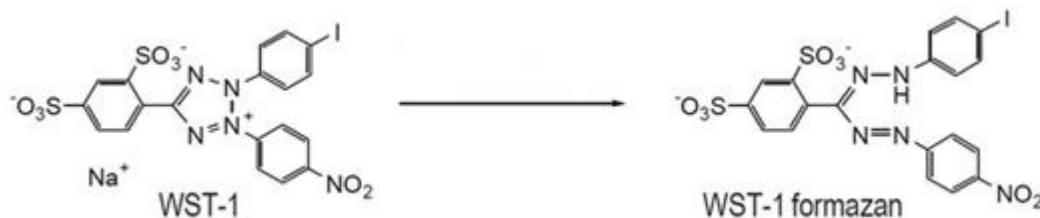
Preglednica 6. Seznam vseh testiranih režimov izpostavitve EPO.

Celična linija	Režim izpostavitve EPO	Čas stradanja	Koncentracija EPO [E/ml]
SH-SY5Y	3h pred stradanjem	24 h	1, 5, 10, 25, 50, 100
		48 h	
	6 h pred stradanjem	24 h	1, 5, 10, 25, 50, 100
		48 h	
	12 h pred stradanjem	24 h	0`01, 0`1, 1, 5, 10, 25, 50, 100
		48 h	
	24 h pred stradanjem	24 h	4, 5, 25, 50, 100
		48 h	
PC12	12 h pred stradanjem in sočasno s stradanjem	48 h	1, 5, 25, 50, 100
		48 h	
	sočasno s stradanjem	24 h	1, 5, 10, 25, 50, 100
		48 h	
	1 h pred stradanjem	24 h	1, 5, 25, 50
		24 h	
	12 h pred stradanjem	24 h	1, 5, 25, 50
		24 h	
	5 dni pred stradanjem in sočasno s stradanjem	72 h	50
		72 h	
	sočasno s stradanjem	24 h	1, 5, 25, 50, 100
		48 h	
		48 h	1, 5, 25, 50, 100
		72 h	

2.2.2 Test merjenja metabolične aktivnosti

Na tržišču obstaja več različic kolorimetričnih proliferacijskih testov, ki temeljijo na določanju viabilnosti celičnih populacij glede na sposobnost razgradnje barvila, ki ga dodamo v rastni medij. Proliferacijski reagent WST-1 (vodotopna tetrazolijeva sol; kemijsko 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazol-mono-natrijeva sol) je uporaben za določanje proliferacije in viabilnosti celičnih populacij, predvsem za določanje vpliva različnih dejavnikov (rastnih dejavnikov, citokinov, citotoksičnih in

citostatičnih spojin itd.) na celične kulture. Uporabljamo ga lahko za merjenje viabilnosti pritrjenih ali suspenzijskih celičnih kultur. Prednosti uporabe reagenta WST-1 pred bolj široko uporabljanim reagentom MTT so predvsem izvencelična redukcija dodanega reagenta, zaradi česar je zmanjšan toksičen vpliv na celice, neposredno merjenje signala (brez dodatnega raztapljanja soli, kot je to potrebno pri MTT testu) in posledično tudi boljša kvaliteta signala (Mosmann, 1983). Razgradnja stabilne tetrazolijeve soli WST-1 (slika 7) poteka s kompleksnim celičnim mehanizmom in je močno odvisna od glikolitične produkcije NAD(P)H, ki poteka le v živih celicah (Ishiyama in sod., 1997). Količina nastalega formazanskega barvila, ki jo kvantificiramo s spektrofotometrom (čitalnik ELISA, Epoch), zato neposredno odraža število oz. delež metabolično aktivnih celic (Mosmann, 1983). Specifično merjenje apoptoze s tem testom ni mogoče, saj merimo le »splošno zdravje« celic oz. njihovo metabolično aktivnost. Ta je odvisna od različnih dejavnikov, ki jih včasih težko nadzorujemo.



Slika 7. Redukcija tetrazolijeve soli WST-1 v topen formazan (prirejeno po Dojindo, 2012).

Celice SH-SY5Y smo testirali nasajene na ploščah s 96 vdolbinicami (10^5 celic/ml, 100 μ l/vdolbinico). Po 24 urah gojenja, ko so dosegle 40-60-odstotno konfluentnost, smo začeli z izpostavitvijo EPO (različni režimi, preglednica 6) in nadaljevali s stradanjem (gojenjem celic v DME brez dodatkov). Celice linije PC12 smo nasadili v plošče s 96 vdolbinicami, prevlečene s kolagenom, v malo višji koncentraciji ($5 \cdot 10^5$ celic/ml, 100 μ l/vdolbinico) in po 5-dnevnem diferenciranju začeli z različnimi režimi izpostavitve EPO (preglednica 6) oz. s stradanjem. Kot negativno kontrolo (brez apoptoze) smo uporabili celice, gojene v polnem rastnem (SH-SY5Y) oz. diferenciacijskem (PC12) mediju, kot pozitivno kontrolo pa celice, stradane (brez seruma) določeno število dni in izpostavljene placebo (59 mM Na-fosfat, 150 mM NaCl, pH 7). Metabolično aktivnost smo pomerili 24, 48 ali 72 ur po začetku stradanja s testom za merjenje metabolične aktivnosti. 10 % (v/v) reagenta smo po navodilih proizvajalca dodali v rastni medij (torej 11 μ l reagenta v 100 μ l rastnega medija),

inkubirali pri 37 °C in pomerili absorbanco s čitalnikom ELISA po 2 in 4 urah. Absorbanco vzorca smo dobili tako, da smo pomerili absorbanco vzorca s svetlobo valovne dolžine 450 nm in od nje odšteli absorbanco, izmerjeno pri 690 nm. Dobljeno vrednost smo delili z optično potjo žarka skozi medij. Rezultat je izražen v odstotkih metabolične aktivnosti, preračunanih glede na negativno kontrolo (1).

$$\text{Delež metabolične aktivnosti} = \frac{\text{absorbanca vzorca}}{\text{absorbanca negativne kontrole}} \quad \dots (1)$$

2.2.3 Obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR)

Izražanje gena *EPOR* smo proučevali z metodo RT-PCR (obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo). Kot natančno in kvantitativno metodo merjenja izražanja izbranih genov smo jo uporabili tudi za merjenje spremembe obsega apoptoze preko računanja razmerja genov, ki imajo pomembno vlogo v apoptozi (Del Poeta in sod., 2003). Metodologija RT-PCR namreč omogoča zaznavanje obsega izražanja preko 100 genov, značilnih za apoptozo. Gre za gene, ki kodirajo ključne ligande, receptorje, znotrajcelične modulatorje in transkripcijske regulatorje, vpletene pri uravnavanju programirane celične smrti.

Postopek obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo, ki je včasih imenovana tudi verižna reakcija s polimerazo v realnem času, se začne z izolacijo celokupne mRNA iz vzorca. S cikličnim termostatom za PCR nato pretvorimo RNA v komplementarno molekulo DNA (cDNA) in pomnožimo. Metoda je kvantitativna, ker je količina pomožene cDNA v neposrednem razmerju z začetno koncentracijo mRNA (Alberts in sod., 2008). Pomnoževanju genov lahko sledimo v realnem času, kar pomeni, da lahko točno vidimo, pri katerem ciklu pomnoževanja je določen gen presegel prazno vrednost in iz tega nadalje izračunamo, kolikšna je stopnja izražanja tega gena v primerjavi z endogeno kontrolo, za katero uporabimo dva ali več t. i. vzdrževalnih genov.

Celice smo gojili v ploščah s 6 ali 12 vdolbinicami. Celice SH-SY5Y so bile nasajene s koncentracijo $0,7 \cdot 10^5$ celic/ml, PC12 pa $1,4 \cdot 10^5$, 2 ml/vdolbinico na ploščah s 6

vdolbinicami oz. 1 ml/vdolbinico na ploščah z 12 vdolbinicami. Na SH-SY5Y smo nadaljevali s poskusom en dan po nasajanju, PC12 celice pa smo najprej 5 dni diferencirali z NGF- β . Pred nadaljevanjem poskusa je bila konfluentnost pri obeh celičnih linijah približno 40 %. Celice smo izpostavili EPO po različnih protokolih (preglednica 6) in po končani izpostavitvi odstranili medij ter vzorce pobrali v mikrocentrifugirke z mešanico TRI-reagenta in glikogena v razmerju 20:1 (200 μ l/vdolbinico). Do nadaljnje obdelave smo jih shranili pri -80 °C. Za izolacijo RNA smo vzorcem dodali 100 μ l kloroforma, močno vorteksirali in inkubirali 2-10 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je 15-minutno centrifugiranje pri 12000x g in 4 °C, nato pa prenos vodne faze v drugo mikrocentrifugirko z ohlajenim 2-propanolom (250 μ l) za obarjanje RNA. Po vorteksiranju in 5-minutni inkubaciji na ledu smo vzorce ponovno centrifugirali (25 minut, 12000x g, 4 °C). Sledilo je odstranjevanje supernatanta in trikratno spiranje peleta s 75-odstotnim etanolom in nazadnje raztapljanje peleta (RNA) v 10-15 μ l vode. Koncentracijo izolirane RNA smo pomerili spektrofotometrično (ND-1000 – Nanodrop). RNA smo do nadaljnje obdelave shranili pri -80 °C. Naslednji korak je bila obdelava vzorcev z DNA-zo, nato pa pretvorba RNA v cDNA (prvo z Rochevim in drugo z Invitrogenovim kompletom ter cikličnim termostatom za PCR, po navodilih proizvajalca). Reakcijo RT-PCR smo izvedli s kompletom *SybrGreenER*[®] (Roche) na ploščah s 384 vdolbinicami z aparatom *LightCycler*[®] 480 (Roche). Grafe smo kvantificirali s priloženim programom *LightCycler*[®] 480 *Software* (Roche), nato pa dobljene vrednosti normalizirali na endogene kontrole (mišji gen *18S*, človeški in podganju *RPLP0* ter človeški in podganji *PP1B*).

Geni, katerih izražanje nas je zanimalo, so bili *EPO* (za preverjanje, če in koliko se ga izraža endogeno v celicah), *EPOR* (pri poskusu merjenja vpliva EPO na izražanje *EPOR* v celični liniji SH-SY5Y (slika 29), je uporabljen oligonukleotidni začetnik *EPOR*-Q2, sicer pa so povsod drugje v rabi *EPOR*-Q1 različice), pro-apoptotska gena *BAX* in *BAD* ter anti-apoptotski gen *BCL-2*.

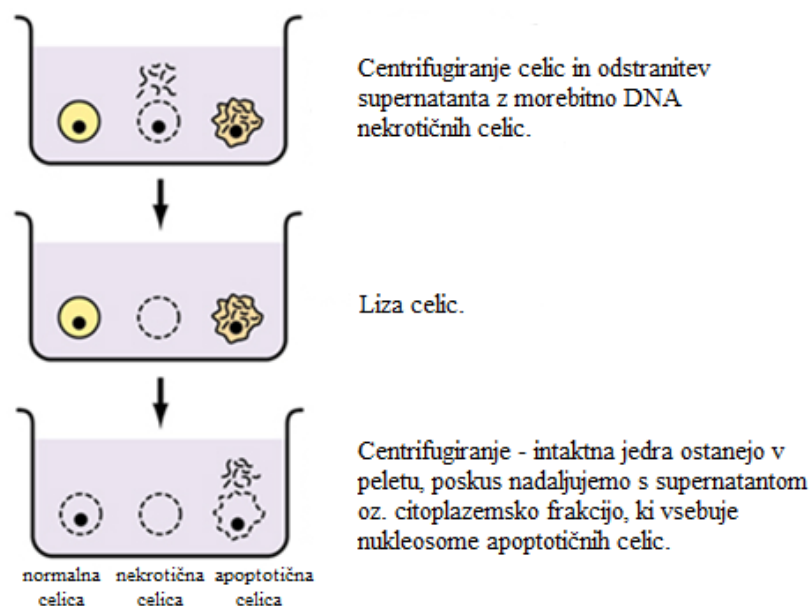
Rezultati so podani v obliki relativnega izražanja posameznih genov. Obseg apoptoze je izračunan kot razmerje med relativnim izražanjem pro-apoptotskega gena *BAX* in anti-apoptotskega gena *BCL-2*.

2.2.4 Test za merjenje internukleosomske razgradnje DNA

V procesu apoptoze pride do aktivacije endonukleaz, ki cepijo genomsko DNA med nukleosomi. Posledica je ireverzibilna – nastanejo mono in oligonukleosomski fragmenti, ki jih lahko merimo kot značilnost apoptoze. Test za merjenje internukleosomske razgradnje DNA (*Cell Death Detection ELISA^{PLUS}*, Roche) smo uporabili za potrditev apoptoze pri predhodno pridobljenih rezultatih s testom za merjenje metabolične aktivnosti, saj z dokazom, da je prišlo do internukleosomske razgradnje DNA, lahko specifično potrdimo prisotnost apoptoze oziroma ovržemo možnost lažno pozitivnih rezultatov zaradi vpliva nekroze.

Princip testa temelji na kvantitativnem »sendvič« imunotestu, kjer gre za vezavo mišjih protiteles s histoni H1, H2A, H2B, H3 in H4 ter vezavo anti-DNA protiteles na enojne in dvojne vijačnice DNA. To omogoča specifično zaznavanje mono in oligonukleosomov v citoplazemski frakciji celičnih lizatov (Roche Product Catalog, 2011).

Celice SH-SY5Y (10^5 celic/ml, 100 μ l/vdolbinico) smo gojili na ploščah s 96 vdolbinicami 1-2 dni oz. do dosega približno 50-60% konfluentnosti, PC12 (10^6 celic/ml, 100 μ l/vdolbinico) pa celoten čas diferenciacije, to je 5 dni, ko je bila konfluentnost že zelo nizka, okoli 10-15%. Celice smo nato obdelali po različnih režimih in stradali 1-48 ur (pregl. 6). Sledil je protokol po navodilih proizvajalca, in sicer liziranje celic ter prenos citoplazemske frakcije, ki vsebuje DNA, na plošče, prevlečene s streptavidinom, dodajanje imunoreagenta, spiranje ter merjenje absorbance pri valovnih dolžinah 405 in 490 nm. Princip testa je prikazan na sliki 8. Kot negativno kontrolo (brez apoptoze) smo uporabili celice, gojene v polnem rastnem mediju, pri katerih nismo sprožali apoptoze. Pri računanju absorbance vzorcev smo absorbanco pri referenčni valovni dolžini (490 nm) odšteli od absorbance pri 405 nm in dobljeno razliko delili z dolžino poti optičnega žarka skozi medij. Rezultati so izraženi v obliki faktorja obogatitve (angl. *enrichment factor*), ki odraža relativni obseg apoptoze (2).



Slika 8. Shematski prikaz principa delovanja kompleta za merjenje razgradnje DNA (prirejeno po Roche Product Catalog, 2011).

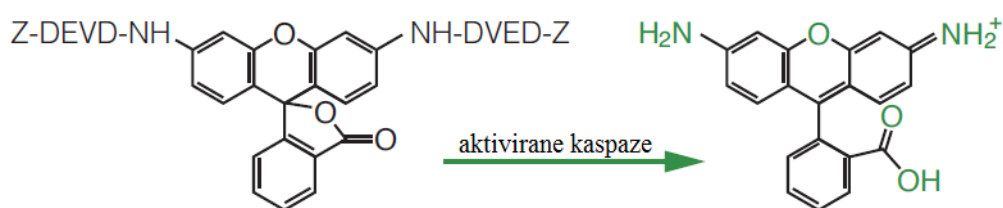
$$\text{Faktor obogatitve} = \frac{\text{absorbanca vzorca}}{\text{absorbanca negativne kontrole}} \quad \dots (2)$$

2.2.5 Test za merjenje aktivacije kaspaz

Celične kaspaze sodelujejo pri procesiranju citokinov in igrajo osrednjo vlogo pri uravnavanju apoptoze (Pižem in Cör, 2001). Kot specifični test za določanje apoptoze smo uporabili tudi Rochev komplet (*Homogeneous Caspases Assay, fluorimetric*), ki omogoča merjenje aktiviranih kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9 in 10 preko zaznavanja fluorescence. Celice smo do ustrezne konfluentnosti (60%) oz. diferenciranosti gojili v posebnih ploščah s 96 vdolbinicami, ki imajo ravno prozorno dno in črne stene, zaradi česar so primerne za merjenje fluorescence. SH-SY5Y celice so bile nasajene z gostoto $2 \cdot 10^5$ celic/ml, PC12 pa 10^6 celic/ml, 100 μ l/vdolbinico.

Sledila je 12-urna predhodna izpostavitve celic linije SH-SY5Y oz. sočasno stradanje in izpostavitve celic linije PC12 različnim koncentracijam EPO. Testirane koncentracije EPO na obeh celičnih linijah so bile 5, 25 in 50 E/ml, na celični liniji SH-SY5Y pa dodatno še 1

in 100 E/ml. Po 0,5 (PC12) do 1 h (SH-SY5Y) stradanja smo celicam dodali kaspazni substrat (DEVD-rodamin 110) in po 1,5-urni inkubaciji pri 37 °C začeli z merjenjem fluorescence sproščenega barvila rodamin 110 (slika 9). Merjenje s fluorescentnim čitalnikom pri 37 °C, z ekscitacijsko valovno dolžino 495 nm in emisijsko 521 nm, je potekalo v 1,5-urnih intervalih, 24 ur. Kot dodatne parametre smo nastavili mesto meritve signala (od zgoraj in od spodaj) ter stopnjo ojačitve izmerjenega signala (50, 100, 150 in avtomatsko). Rezultati so podani v obliki relativnih fluorescentnih enot (RFU), ki neposredno odražajo obseg apoptoze. Vrednosti so preračunane glede na negativno kontrolo (brez apoptoze).



Slika 9. Cepitev kaspaznega substrata, fuziranega z barvilom rodamin 110, v fluorescirajoč produkt (prirejeno po Promega Technical Bulletin, 2009: 3).

2.2.6 Prenos western

Metodo prenosa proteinov western smo uporabili za ugotavljanje vpliva EPO na aktivacijo znotrajceličnih signalnih poti oz. proteinov AKT, ERK IN STAT5. Merili smo razmerje med fosforiliranimi in nefosforiliranimi oblikami omenjenih proteinov in primerjali razlike fosforiliranosti v celicah, izpostavljenih različnim koncentracijam EPO. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice, izpostavljene placebo po enakem režimu kot ostale EPO. Za imunodetekcijo proteinov z metodo western moramo proteine najprej ločiti po molekularni masi z Na-DS poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Po velikosti razporejene proteine iz gela nato prenesemo na PVDF (polivinil difluoridno) membrano, ki jo označimo s specifičnimi protitelesi in slikamo s posebno kamero, da vidimo, ali je izbrani protein prisoten v našem vzorcu (Alberts in sod., 2008). Aktivacija signalne poti AKT pri izpostavitvi celic EPO je že bila potrjena, vendar nismo zasledili točnega režima obdelave celic oz. časovne sheme poskusa, ki bi ji lahko sledili (Ma in sod., 2009).

Celice SH-SY5Y smo s koncentracijo 10^5 celic/ml nasadili na plošče s 6 vdolbinicami (2 ml/vdolbinico) in jim po enem dnevu gojenja v polnem mediju (DME, dopolnjen z 10 % FBS ali DME/F12, dopolnjen z 10 % FBS) za 24 ur odstranili serum ter nato izpostavili EPO (0, 1, 5, 25, 50 in 100 E/ml) 1 in 3 ure. Za poskuse prenosa western so bile uporabljene celice PC12 drugega porekla (laboratorij doc. dr. Nataše Debeljak) kakor pri vseh ostalih eksperimentih. Obravnavali smo jih na enak način kot PC12 iz laboratorija prof. dr. Janka Kosa. Najprej smo jih 5 dni diferencirali na ploščah, prevlečenih s kolagenom tipa IV, v diferenciacijskem mediju (DME + 100 ng/ml NGF- β). Po 5 dneh diferenciacije smo najprej za 24 ur odvzeli serum, nato pa jih izpostavili EPO (0, 1, 5 in 25 E/ml). Po 30 minutah (PC12) oz. 1 in 3 urah (SH-SY5Y) smo medij z EPO odstranili in plošče zamrznili v tekočem dušiku ter jih nato do nadaljnje obdelave hranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iz celic smo kasneje izolirali proteine s pufrom za lizo celic (LLB, angl. *liver lysis buffer*) z dodanimi proteaznimi in fosfataznimi inhibitorji in centrifugiranjem pri 120000 RPM in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 minut. Del supernatanta s proteini smo zmešali z nanašalnim pufrom in 2-merkaptetanolom ter jih denaturirali z desetminutnim segrevanjem pri $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Preostanek supernatanta smo uporabili za spektrofotometrično merjenje (Epoch) koncentracije proteinov s pomočjo kompleta *Pierce BCA Protein Assay kit*. Pripravili smo si gel iz 10% akrilamidnega nanašalnega gela in 5% akrilamidnega ločitvenega gela za Na-DS poliakrilamidno elektroforezo in nanj nanесли vzorce denaturiranih proteinov, pozitivno kontrolo (celice linije UT7) in proteinsko lestvico (standard). Ločevanje proteinov je potekalo v elektroforezni banjici, napolnjeni s pufrom, 20 minut pri 50 V in nadaljnji 2 uri pri 90 V. Gel smo nato dobro sprali v pufru za prenos proteinov in pripravili sendvič iz nosilcev, gobic, filter papirjev, PVDF membrane in gela. Prenos proteinov je potekal 90 minut pri 80 V in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Membrano s prenešenimi protein smo blokirali s 5-% raztopino BSA (20 minut), za tem pa pustili čez noč stresati pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ v raztopini primarnih protiteles (STAT5, P-STAT5 IN AKT v razmerju 1:666; P-AKT 1:500; ERK, P-ERK 1:1000; redčitve v PBST s 5-% BSA). Naslednji dan smo jih dobro sprali v PBST in inkubirali s stresanjem še 1 uro v sekundarnih protitelesih (proti zajčjim IgG, *anti-rabbit-HRP*). Membrano smo ponovno dobro sprali s PBST in nazadnje izvršili zaznavanje proteinov z mešanico reagentov kompleta *Pierce ECL Western Blotting Substrate* na kameri LAS 4000 s kemiluminiscentnim načinom. Posneli smo približno 20 slik in jih najprej obdelali s programom *Multi Gauge*, nato pa rezultate kvantificirali s programom

ImageJ in obdelali z računanjem razmerja intenzitet lis fosforiliranih oz. aktiviranih in nefosforiliranih proteinov. Rezultati so prikazani v obliki slikanih PVDF membran in grafov s preračunanimi vrednostmi intenzitet lis z membran. Koncentracije nanešenih proteinov namreč niso bile popolnoma enake (slike 33, 34 in 37), zato so za lažje razumevanje vrednosti preračunane in prikazane v obliki grafa (slike 35, 36 in 38).

2.2.7 Statistična obdelava rezultatov

Dobljeni rezultati so na slikah prikazani kot povprečje najmanj 3 vzorcev $\pm$ standardna deviacija. Statistično smo jih obdelali s programom PASW verzije 18, kjer smo za računanje statističnih značilnosti razlik med povprečji vzorcev uporabili Studentov t-test oz. neparametrični Mann-Whitney-ev test (pri vzorcih z neenakimi variancami). Kot statistično značilne razlike smo označili tiste s P vrednostjo manjšo od 0,05. Glede na stopnjo zanesljivosti statistično značilne razlike vzorcev v primerjavi s pozitivno kontrolo (tj. sprožena apoptoza, npr. s stradanjem, brez izpostavitve EPO, označena kot »stradanje« ali »0 E/ml EPO«) smo vzorce označili z * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) ali *** ($P \leq 0,001$).

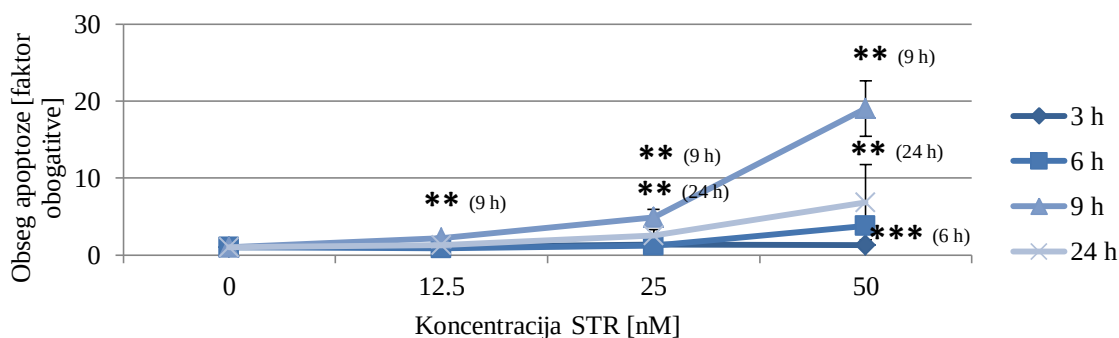
Pri rezultatih poskusov merjenja vpliva EPO na preživetje celic, ki vključujejo tako negativno (brez apoptoze) kot pozitivno kontrolo (stradane celice, brez izpostavitve EPO; označena kot »0 E/ml EPO«), je statistično značilno povečanje apoptoze pri pozitivni kontroli v primerjavi z negativno kontrolo označeno z # ($P \leq 0,05$), ## ($P \leq 0,01$) ali ### ($P \leq 0,001$).

3 REZULTATI

3.1 DOLOČANJE PRIMERNEGA SPROŽILCA APOPTOZE

Za proučevanje učinka eritropoetina na preživetje celic smo morali najprej najti ustrezen način sprožanja apoptoze. Preizkusili smo obdelavo z različnimi koncentracijami stavosporina (STR) in TNF- α ter sprožanje metaboličnega stresa s stradanjem celic. Poleg iskanja primerne soprožilca smo na celičnih linijah SH-SY5Y in PC12 ugotavljali tudi kinetiko apoptoze in določali primerno točko za merjenje učinka EPO na apoptozo.

Rezultati testa za merjenje internukleosomske razgradnje DNA so pokazali statistično značilen dvig apoptoze pri daljši obdelavi celic SH-SY5Y z 12,5 nM STR ($P_{9h} = 0,004$) oz. 25 nM STR ($P_{9h} = 0,012$; $P_{24h} = 0,002$). 50 nM STR je zelo očitno in statistično značilno sprožil apoptozo tudi pri 6-urni obdelavi ($P_{6h} < 0,000$). 3-urna obdelava celic s STR ni pokazala statistično značilnih razlik v obsegu apoptoze pri nobeni koncentraciji (slika 10).



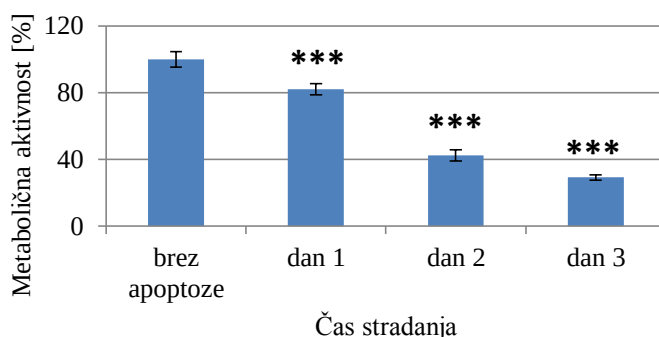
Slika 10. Določanje režima sprožanja apoptoze s STR (stavosporinom) na celični liniji SH-SY5Y s testom razgradnje DNA [** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$].

Figure 10. Defining a strategy of triggering apoptosis with STR (staurosporine) on the SH-SY5Y cell line with the DNA fragmentation assay [** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$].

Učinek izpostavitve 10 in 100 ng/ml TNF- α smo merili s testom za merjenje metabolične aktivnosti in z računanjem razmerja izražanja apoptotskih genov *BAX* in *BCL-2*, vendar nikjer nismo zaznali statistično značilnih razlik oz. je imel TNF- α celo rahlo zaščitni učinek (rezultati niso prikazani).

Tretji možni sprožilec apoptoze, ki smo ga testirali, je bilo stradanje. Na sliki 11 vidimo, da je stradanje celic SH-SY5Y povzročilo statistično značilen ($P < 0,001$) upad

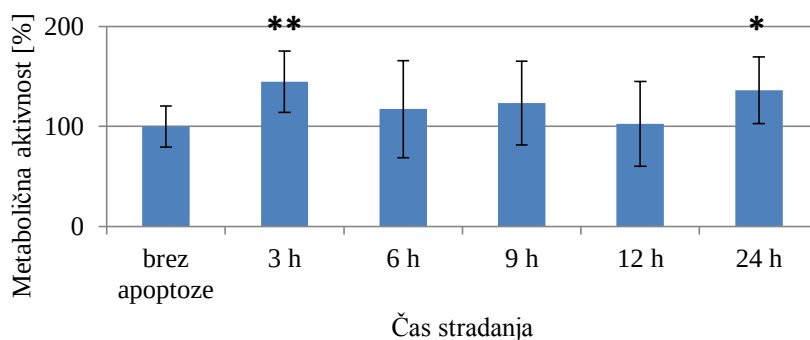
metabolične aktivnosti pri vseh merjenih točkah (dan 1, dan 2 in dan 3). Po enem dnevu stradanja se je metabolična aktivnost znižala za 20 %, po dveh dneh za 60 % in po treh dneh za 70 %.



Slika 11. Metabolična aktivnost celic SH-SY5Y po 1, 2 in 3 dneh stradanja (merjeno s proliferacijskim reagentom WST-1, 2 uri po dodatku reagenta) [*** $P \leq 0,001$].

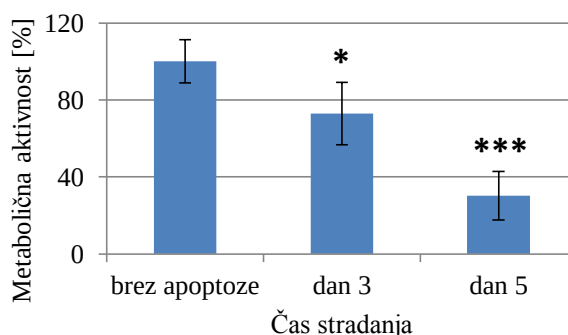
Figure 11. Metabolic activity of SH-SY5Y cells after 1, 2, and 3 days of starvation (measured using the WST-1 proliferation reagent, 2 hours after adding the reagent) [*** $P \leq 0.001$].

Na diferenciranih celicah PC12 po enodnevnem stradanju nismo zaznali statistično značilnega znižanja metabolične aktivnosti pri nobeni izmed testiranih časovnih točk (slika 12). Poskus smo zato ponovili po enaki shemi še z merjenjem po 3 in 5 dneh stradanja (slika 13) in slednjič dobili očiten padec metabolične aktivnosti celic (dan 3: 72 % metabolične aktivnosti, $P = 0,015$; dan 5: 30 % metabolične aktivnosti, $P < 0,000$).



Slika 12. Metabolična aktivnost celic PC12 po 3, 6, 9, 12 in 24 urah stradanja (merjeno s proliferacijskim reagentom WST-1, 2 uri po dodatku reagenta) [* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$].

Figure 12. Metabolic activity of PC12 cells after 3, 6, 9, 12 and 24 hours of starvation (measured using the WST-1 proliferation reagent, 2 hours after adding the reagent) [* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$].

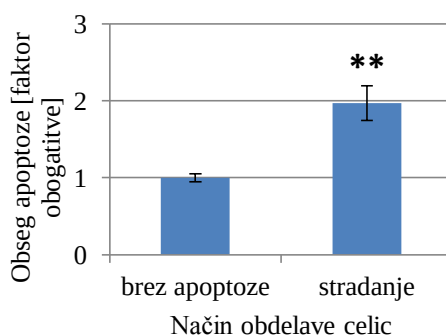


Slika 13. Metabolična aktivnost celic PC12 po 3 in 5 dneh stradanja (merjeno s proliferacijskim reagentom WST-1, 4 ure po dodatku reagenta) [* $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$].

Figure 13. Metabolic activity of PC12 cells after 3 and 5 days of starvation (measured using the WST-1 proliferation reagent, 4 hours after adding the reagent) [* $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$].

Za potrditev rezultata, ki ga je pokazal test za merjenje metabolične aktivnosti, da stradanje celic, povzročeno z inkubacijo v DME brez dodatkov, sproži apoptozo in ne nekroze, smo preženje apoptoze na enak način preizkusili tudi s specifičnimi testi za merjenje apoptoze.

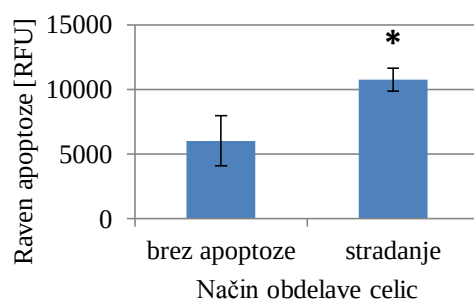
Obdelava rezultatov testa za merjenje internukleosomske razgradnje DNA je po 48 urah stradanja celic SH-SY5Y pokazala statistično značilno dvakratno povišanje obsega apoptoze ($P = 0,006$) v primerjavi z negativno kontrolo brez apoptoze (slika 14).



Slika 14. Raven apoptoze, merjena s testom za merjenje razgradnje DNA, po 48 urah stradanja celic SH-SY5Y [** $P \leq 0,01$].

Figure 14. Level of apoptosis, measured with the DNA fragmentation assay after 48 hours of starvation of SH-SY5Y cells [** $P \leq 0.01$].

Na celicah linije PC12 smo sprožitev apoptoze potrdili tako s testom za merjenje internukleosomske razgradnje DNA (slika 23) kot tudi s testom aktivacije kaspaz (slika 15). Pri slednjem je iz rezultatov razvidno skoraj dvakratno povišanje apoptoze po 2-urnem stradanju ($P = 0,05$).



Slika 15. Raven apoptoze, merjena s testom aktivacije kaspaz, po 2 urah stradanja celic PC12 [$* P \leq 0,05$].

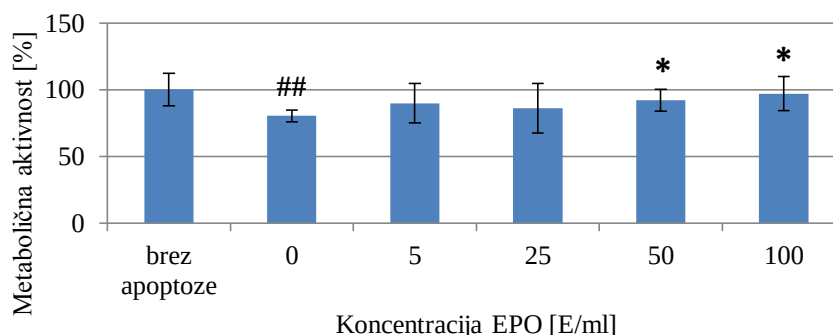
Figure 15. Level of apoptosis, measured with the activated caspase assay after 2 hours of starvation of PC12 cells [$* P \leq 0.05$].

3.2 UČINEK EPO NA PREŽIVETJE CELIC

V nadaljevanju so prikazani le rezultati tistih režimov izpostavitve EPO, ki so pokazali učinek na apoptozo. V preglednici 6 na strani 26 so sicer naštetni vsi preizkušeni režimi.

3.2.1 Test za merjenje metabolične aktivnosti

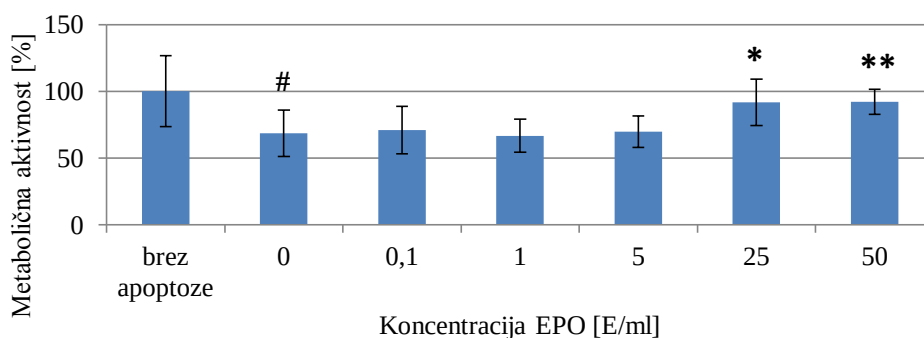
Za proučevanje učinka EPO na preživetje celic smo najprej uporabili test za merjenje metabolične aktivnosti. Različni režimi izpostavitve EPO odražajo zelo majhne razlike med posameznimi vzorci celic SH-SY5Y (slika 16), vendar nam je statistična obdelava rezultatov pokazala, da se metabolična aktivnost znatno poveča pri 12-urni predhodni izpostavitvi 50 E/ml ($P = 0,012$) in 100 E/ml EPO ($P = 0,018$), ki ji sledi 24-urno stradanje celic.



Slika 16. Vpliv 12-urne predhodne izpostavitve EPO na metabolično aktivnost 24 ur stradanih celic SH-SY5Y (merjeno s proliferacijskim reagentom WST-1, 2 uri po dodatku reagenta) [* $P \leq 0,05$ v primerjavi s pozitivno kontrolo – 0 E/ml EPO; ## $P \leq 0,01$ v primerjavi z negativno kontrolo – brez apoptoze].

Figure 16. Effect of 12-hour EPO pre-treatment followed by 24-hour starvation on metabolic activity of SH-SY5Y cells (measured using the WST-1 proliferation reagent, 2 hours after adding the reagent) [* $P \leq 0.05$ vs. positive control – 0 IU/ml EPO; ## $P \leq 0.01$ vs. negative control – no apoptosis].

Diferencirane celice PC12 smo za poskus merjenja učinka EPO na apoptozo s testom za merjenje metabolične aktivnosti stradali in sočasno izpostavili različnim koncentracijam EPO za 3 in 5 dni. Na sliki 17 so prikazani rezultati, izmerjeni s testom za merjenje metabolične aktivnosti po 3 dneh stradanja in sočasne izpostavitve EPO, iz katerih je razvidno, da nizke koncentracije EPO (do 5 E/ml) nimajo vpliva na preživetje celic ob metaboličnem stresu, pride pa do statistično značilnega povečanja metabolične aktivnosti pri sočasnem stradanju in izpostavitvi 25 E/ml ($P = 0,050$) in 50 E/ml EPO ($P = 0,010$). Rezultati 5-dnevnega stradanja in sočasne izpostavitve niso prikazani. Izmerjene razlike petdnevne izpostavitve EPO so bile primerljive s trodnevno, vendar so bile pri petdnevni večje napake med ponovitvami znotraj poskusa.

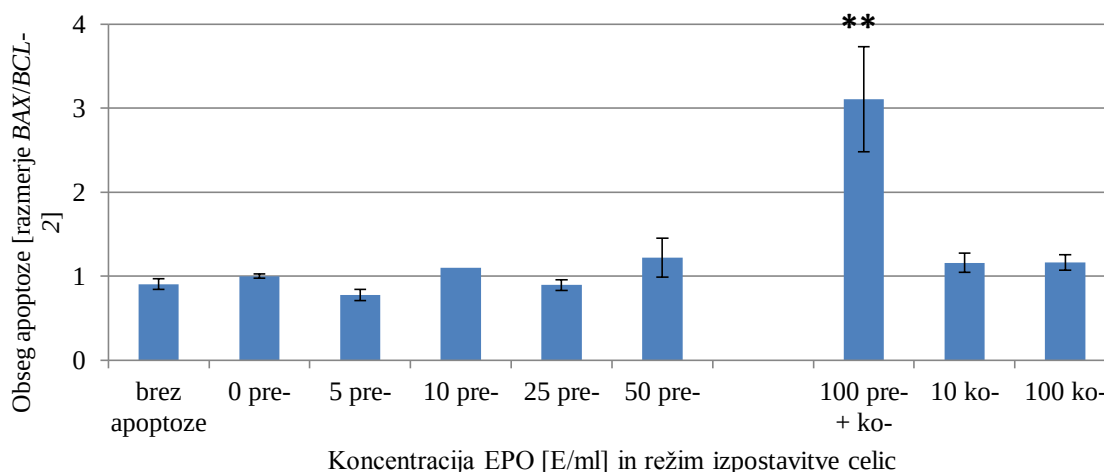


Slika 17. Vpliv 24-urnega stradanja in sočasne izpostavitve EPO na metabolično aktivnost celic PC12 (merjeno s proliferacijskim reagentom WST-1, 4 ure po dodatku reagenta) [* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ v primerjavi s pozitivno kontrolo – 0 E/ml EPO; # $P \leq 0,05$ v primerjavi z negativno kontrolo – brez apoptoze].

Figure 17. Effect of 24-hour starvation and co-treatment with EPO on metabolic activity of PC12 cells (measured using the WST-1 proliferation reagent, 4 hours after adding the reagent) [* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ vs. positive control – 0 IU/ml EPO; # $P \leq 0.05$ vs. negative control – no apoptosis].

3.2.2 Razmerje med izražanjem pro- in anti-apoptotskih genov (*BAX/BCL-2*)

Vpliv 12-urne predhodne izpostavitve celic SH-SY5Y EPO, ki ji je sledilo 24-urno stradanje celic, na izražanje apoptotskih genov *BAX* in *BCL-2* je predstavljen na sliki 18, kjer je vidno rahlo zmanjšanje obsega apoptoze pri koncentraciji 5 E/ml ($P = 0,143$) in 25 E/ml ($P = 0,106$), vendar razlika ni statistično značilna. Kot primer so prikazani tudi rezultati izpostavitve EPO pred in po začetku stradanja ter sočasno s stradanjem. Izstopa statistično značilno povišanje obsega apoptoze celic ($P = 0,008$), ki jim 100 E/ml EPO dodajamo pred in po začetku stradanja. Ostale koncentracije EPO in različni načini izpostavitve niso pokazali učinka. Prav tako EPO ni imel učinka pri enaki zasnovi poskusa z 48-urnim sprožanjem apoptoze (rezultati niso prikazani).

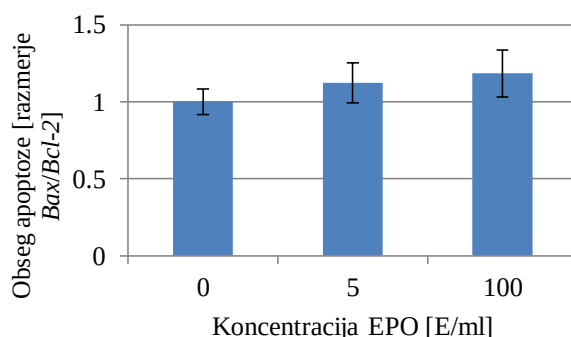


Slika 18. Vpliv različnih režimov izpostavitve in koncentracij EPO na izražanje apoptotskih genov v celicah SH-SY5Y (pre-: predhodna izpostavitve celic EPO (12 h); pre- + ko-: kombinacija predčasne (12 h) in sočasne (24 h) izpostavitve celic EPO; ko-: sočasno stradanje in izpostavitve celic EPO (24 h); metoda RT-PCR) [** $P \leq 0,01$].

Figure 18. Effect of different EPO treatment designs and concentrations on apoptotic gene expression in SH-SY5Y cells (pre-: 12-hour pre-treatment with EPO; pre- + ko-: combination of 12-hour pre-treatment and 24-hour co-treatment design; ko-: 24-hour co-treatment with EPO; RT-PCR method) [** $P \leq 0.01$].

Na podoben način smo testirali tudi celično linijo PC12. Diferencirane celice smo stradali 24 ur in sočasno izpostavili EPO, nato pa vzorce in rezultate obdelali na enak način kot pri

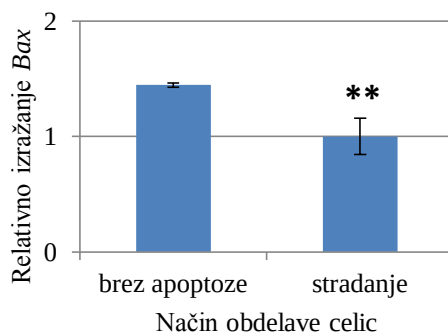
celični liniji SH-SY5Y. Rezultati kažejo, da po 24 urah sočasnega stradanja in izpostavitve EPO ne pride do statistično značilnih sprememb v izražanju genov (slika 19), prav tako po 48 urah stradanja ni značilnih razlik v obsegu apoptoze glede na razmerje izražanja genov *Bax/Bcl-2* (rezultati niso prikazani).



Slika 19. Vpliv 24-urnega stradanja in sočasne izpostavitve EPO na izražanje apoptotskih genov v celicah PC12 (metoda RT-PCR).

Figure 19. Effect of 24-hour starvation and co-treatment with EPO on apoptotic gene expression in PC12 cells (RT-PCR reaction).

Rezultati merjenja obsega apoptoze z računanjem razmerja *Bax/Bcl-2* so razkrili tudi sprva nepričakovano dejstvo, da celice PC12, gojene v polnem diferenciacijskem mediju, ne izražajo gena *Bcl-2*. Nenavadno pa je tudi izražanje pro-apoptotskih genov *Bax* in *Bad*, ki se po 3-dnevnem stradanju (slika 20), torej sprožanju apoptoze, statistično značilno zmanjša ($P = 0,008$) v primerjavi s celicami, gojenimi v polnem diferenciacijskem mediju (brez apoptoze) (izražanje *Bad* ni prikazano, vendar je podobno).

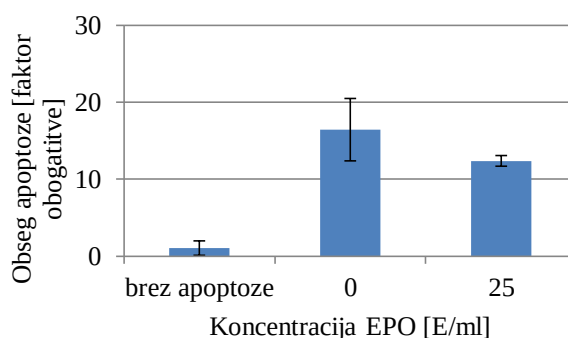


Slika 20. Znižanje izražanja gena *Bax* po 3 dneh stradanja celic PC12 (metoda RT-PCR) [$** P \leq 0,01$].

Figure 20. Decreased expression of *Bax* gene after 3 days of starvation of PC12 cells (RT-PCR method) [$** P \leq 0,01$].

3.2.3 Test za merjenje internukleosomske razgradnje DNA

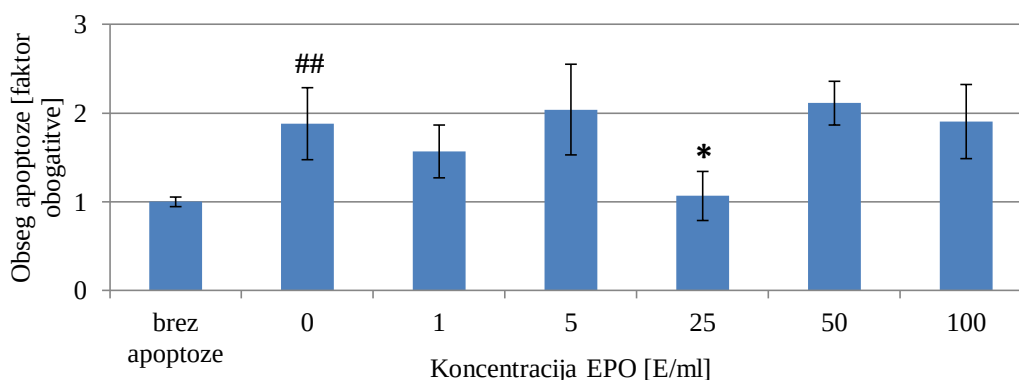
Celice SH-SY5Y smo po enem dnevu gojenja izpostavili 25 E/ml EPO za 24 ur, nato dodali 25 nM STR ter učinek pomerili po 9 urah s testom za merjenje internukleosomske razgradnje DNA. Predhodna izpostavitvev 25 E/ml EPO za 24 ur, ki ji je sledila 9-urna obdelava s STR, je vidno znižala izrazito povečan obseg apoptoze, sprožen s STR (0 E/ml EPO), vendar razlika ni statistično značilna ($P = 0,161$) (slika 21).



Slika 21. Učinek 24-urne izpostavitve celic SH-SY5Y 25 E/ml EPO pred 9-urnim sprožanjem apoptoze s 25 nM STR (stavrosporinom) na obseg razgrajene DNA.

Figure 21. Effect of 24-hour pre-treatment with 25 IU/ml EPO followed by 9-hour treatment with 25 nM STR (staurosporine) on the level of fragmented DNA.

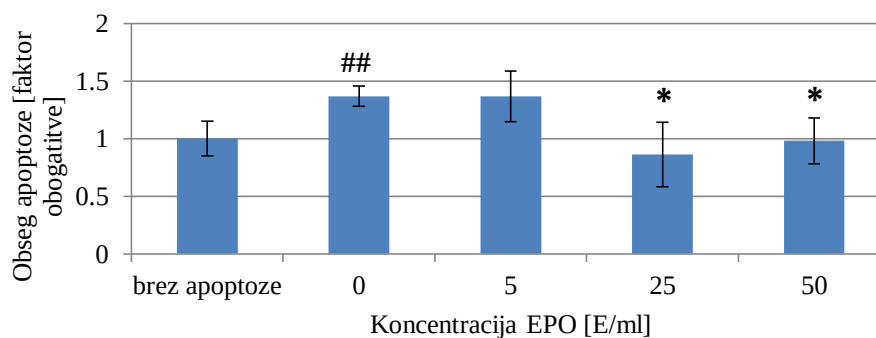
Test za merjenje internukleosomske razgrajenosti DNA smo na celični liniji SH-SY5Y uporabili tudi za ugotavljanje vpliva treh različnih režimov izpostavitve EPO (12 ur pred stradanjem, 48 ur sočasno s stradanjem ter kombinacija obojega) na apoptozo, sproženo s stradanjem. Statistično značilen zaščitni učinek EPO se je izkazal le pri 12-urni predhodni izpostavitvi 25 E/ml EPO ($P = 0,031$) pred sprožitvijo stradanja, ki je trajalo 48 ur (slika 22; rezultati ostalih režimov niso prikazani).



Slika 22. Vpliv 12-urne predhodne izpostavitve celic SH-SY5Y različnim koncentracijam EPO na obseg razgrajene DNA po 48 urah stradanja [* $P \leq 0,05$ v primerjavi s pozitivno kontrolo – 0 E/ml EPO; ## $P \leq 0,01$ v primerjavi z negativno kontrolo – brez apoptoze].

Figure 22. Effect of 12-hour EPO pre-treatment on the level of fragmented DNA after 48 hours of starvation of SH-SY5Y cells [* $P \leq 0.05$ vs. positive control – 0 IU/ml EPO; ## $P \leq 0.01$ vs. negative control – no apoptosis].

Na celični liniji PC12 smo naredili podoben poskus, vendar s krajšim inkubacijskim časom. Diferencirane celice smo stradali in hkrati za 3 ure izpostavili EPO. Dobili smo podobne rezultate (slika 23). Statistično značilen zaščitni učinek EPO smo zaznali pri sočasnem stradanju in izpostavitvi 25 E/ml ($P = 0,014$) in 50 E/ml ($P = 0,016$).

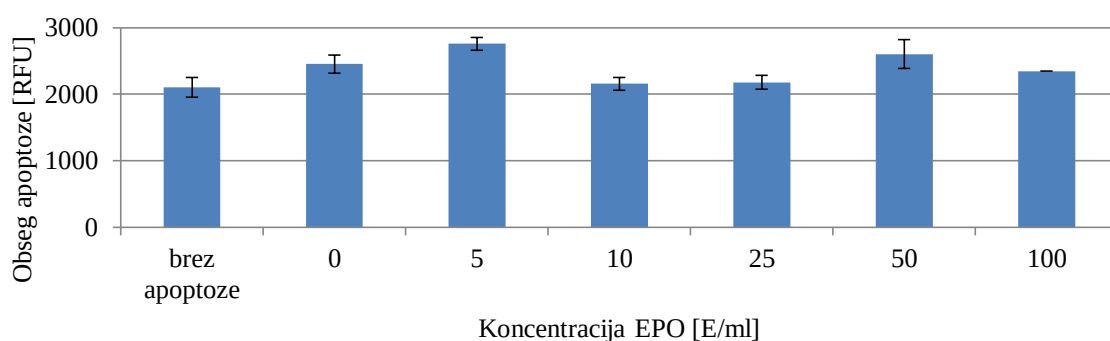


Slika 23. Vpliv 3-urnega stradanja in sočasne izpostavitve različnim koncentracijam EPO na obseg razgrajene DNA celic PC12 [* $P \leq 0,05$ v primerjavi s pozitivno kontrolo – 0 E/ml EPO; ## $P \leq 0,01$ v primerjavi z negativno kontrolo – brez apoptoze].

Figure 23. Effect of 3-hour starvation and co-treatment with different concentrations of EPO on the level of fragmented DNA of PC12 cells [* $P \leq 0.05$ vs. positive control – 0 IU/ml EPO; ## $P \leq 0.01$ vs. negative control – no apoptosis].

3.2.4 Test za merjenje aktivacije kaspaz

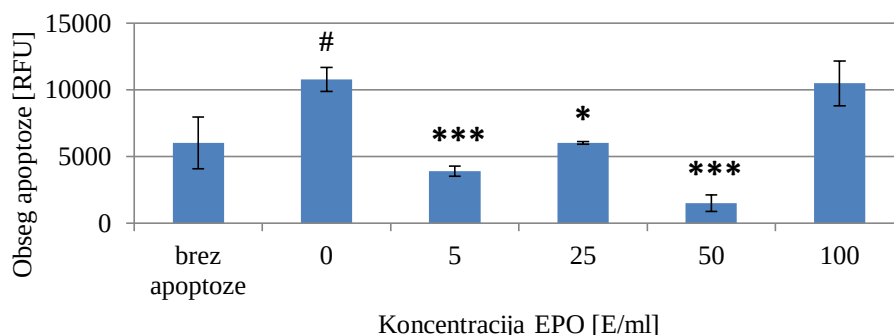
Za potrditev rezultatov, pridobljenih s predhodnimi testi, smo uporabili Rochev test, ki meri skupno aktivacijo različnih kaspaz v celici. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca, vendar statistično značilnih razlik v aktivaciji kaspaz nismo opazili. Kljub temu lahko vidimo rahel porast apoptoze pri stradanju brez izpostavitve EPO ter pri izpostavitvi 5 E/ml ($P = 0,121$) in 50 E/ml EPO ($P = 0,493$) ter zmanjšan obseg apoptoze pri izpostavitvi 10 E/ml ($P = 0,126$) in 25 E/ml EPO ($P = 0,148$) (slika 24).



Slika 24. Aktivacija kaspaz po 12-urni predhodni izpostavitvi EPO in 2,5-urnem stradanju celic SH-SY5Y (mesto merjenja fluorescence: dno; avtomatska ojačitev signala).

Figure 24. Activation of caspases after 12-hour pre-treatment with EPO followed by 2.5-hour starvation of SH-SY5Y cells (fluorescence detection position: bottom; automatic signal gain).

Rezultati podobnega poskusa s 30 minut krajšo inkubacijo s kaspaznim substratom na diferenciranih celicah PC12 kažejo na statistično značilen zaščitni učinek sočasne izpostavitve EPO koncentracij 5 E/ml ($P = 0,001$), 25 E/ml ($P = 0,017$) in 50 E/ml ($P = 0,001$) ob stradanju. Izpostavitve 100 E/ml EPO hkrati s stradanjem ne kaže učinka na apoptozo (slika 25).



Slika 25. Aktivacija kaspaz po 2-urnem stradanju in sočasni izpostavitvi celic linije PC12 EPO (mesto merjenja fluorescence: od zgoraj; avtomatska ojačitev signala) [* $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$ v primerjavi s pozitivno kontrolo – 0 E/ml EPO; # $P \leq 0,05$ v primerjavi z negativno kontrolo – brez apoptoze].

Figure 25. Activation of caspases after 2-hour starvation and co-treatment of PC12 cell line with EPO (fluorescence detection position: top; automatic signal gain) [* $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$ vs. positive control – 0 IU/ml EPO; # $P \leq 0,05$ vs. negative control – no apoptosis].

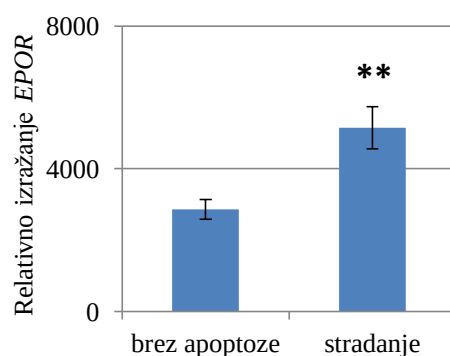
3.3 IZRAŽANJE GENOV *EPO* IN *EPOR* V IZBRANIH CELIČNIH LINIJAH

Izražanje gena *EPO* je v obeh celičnih linijah (pri diferenciranih in nediferenciranih PC12 ter pri SH-SY5Y v obeh medijih, DME in DME/F12) v vseh testiranih razmerah pod mejo zaznave ($C_T > 35$).

Izražanje gena *EPOR* smo z metodo RT-PCR potrdili v obeh celičnih linijah, o čemer pričajo sledeči rezultati (slike 26-32).

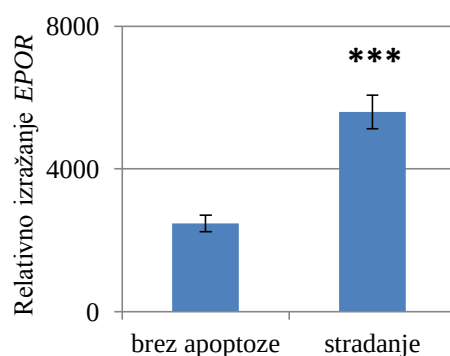
3.3.1 Vpliv stradanja na izražanje gena *EPOR*

Izražanje gena *EPOR* smo merili z metodo RT-PCR. Približno dvakratno statistično značilno povišanje izražanja smo zaznali po 24-urnem stradanju celic SH-SY5Y v obeh preizkušanih rastnih medijih – DME ($P = 0,008$; slika 26) in DME/F12 ($P < 0,001$; slika 27).



Slika 26. Izražanje *EPOR* po 24 urah stradanja celic SH-SY5Y v mediju DME (metoda RT-PCR) [** $P \leq 0,01$].

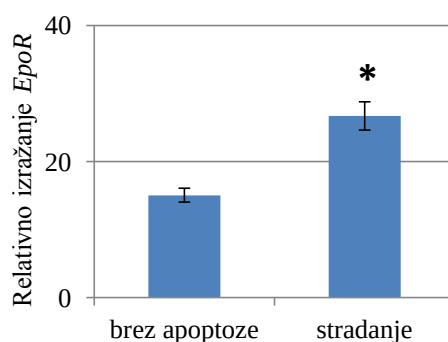
Figure 26. *EPOR* expression after 24 hours of starvation of SH-SY5Y cells in DME growth medium (RT-PCR method) [** $P \leq 0.01$].



Slika 27. Izražanje *EPOR* po 24 urah stradanja celic SH-SY5Y v mediju DME/F12 (metoda RT-PCR) [*** $P \leq 0,001$].

Figure 27. *EPOR* expression after 24-hour starvation of SH-SY5Y cells in DME/F12 growth medium (RT-PCR method) [*** $P \leq 0.001$].

1,7-kratno statistično značilno povišanje izražanja *EpoR* je vidno tudi v celični liniji PC12 že po 24 urah stradanja ($P = 0,019$; slika 28).



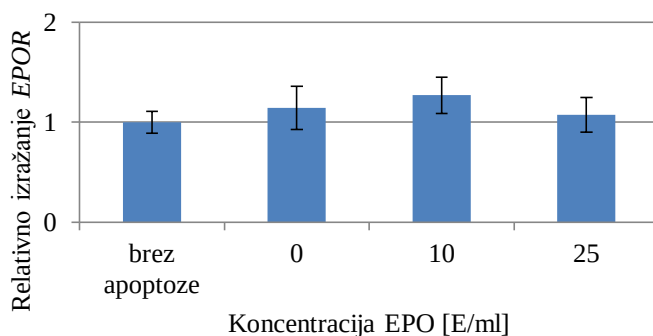
Slika 28. Izražanje *EpoR* po 24 urah stradanja celic PC12 (metoda RT-PCR) [* $P \leq 0,05$].

Figure 28. *EpoR* expression after 24-hour starvation of PC12 cells (RT-PCR method) [* $P \leq 0.05$].

3.3.2 Vpliv EPO na izražanje gena *EPOR*

Z metodo RT-PCR smo testirali vpliv različnih koncentracij in režimov izpostavitve EPO na izražanje *EPOR*. Prikazane so le nekatere koncentracije in režimi izpostavitve EPO; vsi ostali preizkušeni načini (preglednica 6) niso imeli vpliva na izražanje *EPOR*.

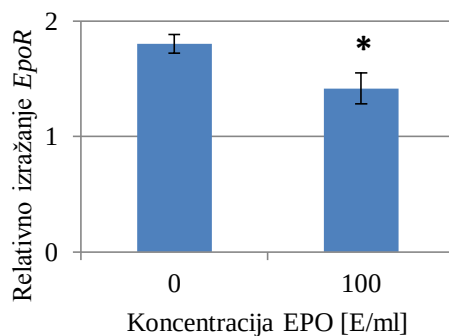
Pri 12-urni izpostavitvi EPO in sledečem 24-urnem stradanju celic linije SH-SY5Y je predvsem pri koncentraciji 10 E/ml EPO viden rahlo povečan obseg izražanja *EPOR*-Q2 (slika 29), vendar rezultat ni statistično značilen ($P = 0,678$). Analiza rezultatov kaže, da kljub 24-urnemu stradanju ni prišlo do statistično značilnega povečanja obsega apoptoze, kar smo sicer s precejšnjo gotovostjo potrdili s predhodnimi poskusi (slika 26).



Slika 29. Vpliv 12-urne izpostavitve EPO in sledečega 24-urnega stradanja na izražanje *EPOR*-Q2 v celicah SH-SY5Y (metoda RT-PCR).

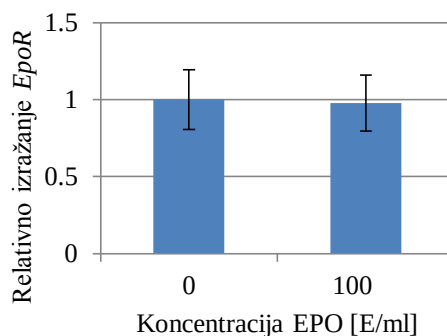
Figure 29. Effect of 12-hour EPO pre-treatment followed by 24-hour starvation on *EPOR*-Q2 expression in SH-SY5Y cells (RT-PCR method).

Visoka koncentracija EPO (100 E/ml) v celični liniji PC12 po 24 urah stradanja in sočasne izpostavitve EPO statistično značilno ($P = 0,013$) zniža izražanje *EpoR* (slika 30), vendar tega po 48 (slika 31) ali 72 urah ne moremo več zaznati.



Slika 30. Vpliv 24-urnega stradanja in sočasne izpostavitve visoki koncentraciji EPO na izražanje *EpoR* v celicah PC12 (metoda RT-PCR) [* $P \leq 0,05$].

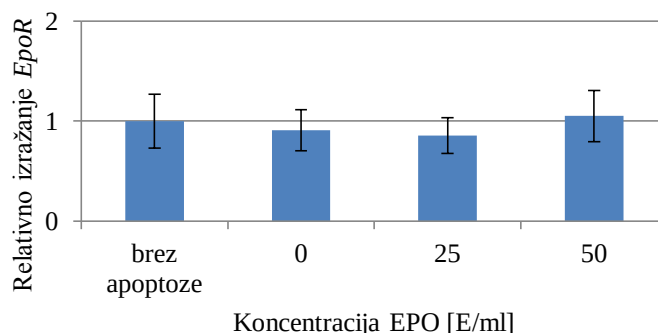
Figure 30. Effect of 24-hour starvation and co-treatment with EPO on *EpoR* expression in PC12 cells (RT-PCR method) [* $P \leq 0.05$].



Slika 31. Vpliv 48-urnega stradanja in sočasne izpostavitve visoki koncentraciji EPO na izražanje *EpoR* v celicah PC12 (metoda RT-PCR).

Figure 31. Effect of 48-hour starvation and co-treatment with high concentration of EPO on *EpoR* expression in PC12 cells (RT-PCR method).

Prav tako ni pokazalo razlik v izražanju *EpoR* 3-dnevno stradanje celic linije PC12 in sočasna izpostavitve nižjim koncentracijam EPO (slika 32).

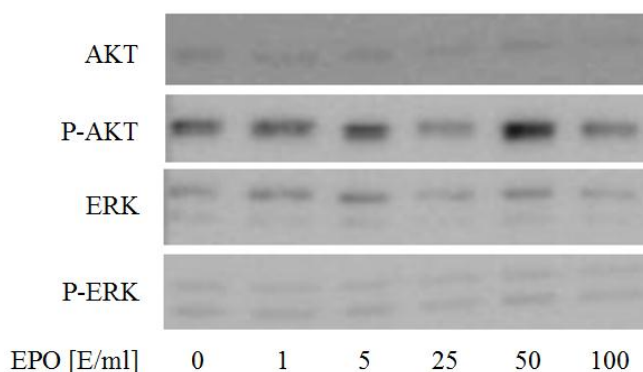


Slika 32. Vpliv 72-urnega stradanja in sočasne izpostavitve EPO na izražanje *EpoR* v celicah PC12 (metoda RT-PCR).

Figure 32. Effect of 72-hour starvation and co-treatment with EPO on *EpoR* expression in PC12 cells (RT-PCR method).

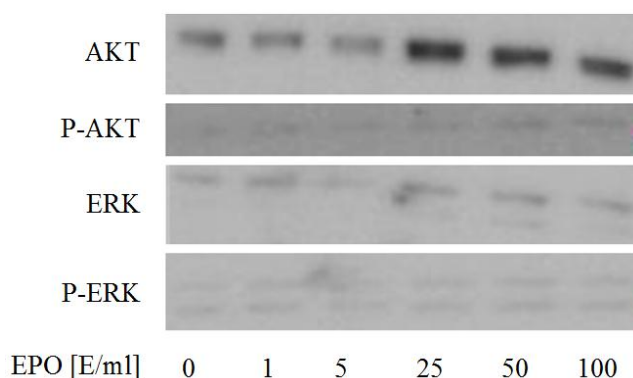
3.4 AKTIVACIJA SIGNALNIH POTI

Za potrditev aktivacije signalne poti, preko katere predvidoma poteka zaščitno delovanje EPO (AKT oz. ERK), smo uporabili metodo prenosa proteinov western. Pri celicah SH-SY5Y, gojenih v mediju DME/F12, je bilo izražanje fosforiliranih oblik proteinov prešibko, zato so prikazani le rezultati na celicah, gojenih v mediju DME. Slika 33 prikazuje aktivacijo signalnih poti AKT in ERK po 1 uri izpostavitve EPO, slika 34 pa po 3 urah. Izražanje STAT5 je bilo prešibko, da bi ga zaznali.



Slika 33. Aktivacija signalnih poti AKT in ERK po 1 uri stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah SH-SY5Y (metoda prenosa western).

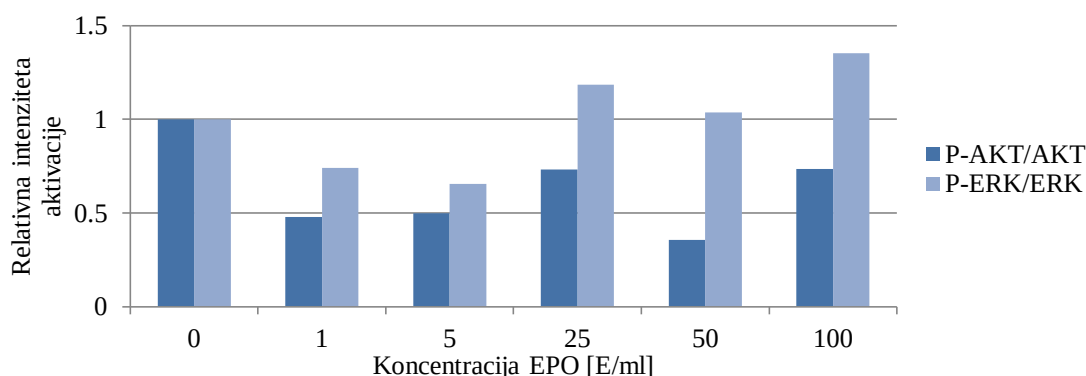
Figure 33. AKT and ERK signal pathways activation after 1-hour starvation and co-treatment with EPO in SH-SY5Y cells (western blot analysis).



Slika 34. Aktivacija signalnih poti AKT in ERK po 3 urah stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah SH-SY5Y (metoda prenosa western).

Figure 34. AKT and ERK signal pathways activation after 3-hour starvation and co-treatment with EPO in SH-SY5Y cells (western blot analysis).

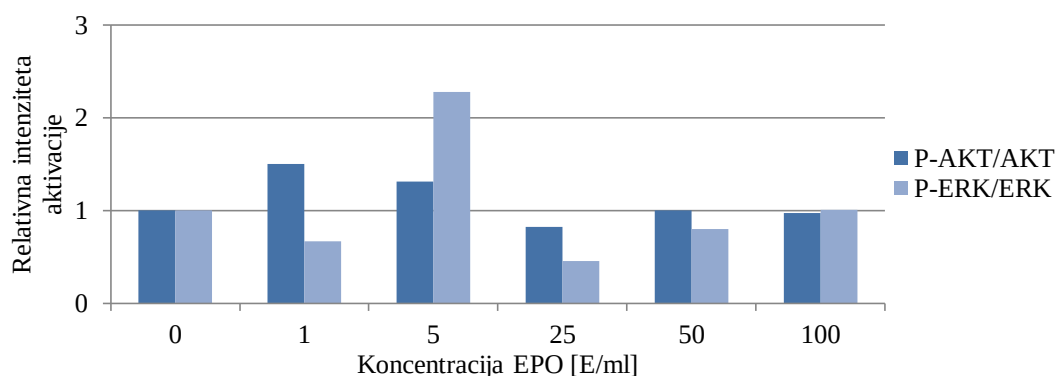
Intenzitete lis na PVDF membranah smo kvantificirali s programom ImageJ. Preračunana razmerja aktivacije proteinov AKT in ERK po 1 uri izpostavitve EPO so prikazana na sliki 35. AKT se ni aktiviral pri nobeni izmed preizkušenih koncentracij EPO, vidimo pa povečano aktivacijo ERK pri koncentracijah 25, 50 in 100 E/ml EPO.



Slika 35. Grafični prikaz relativne stopnje aktivacije signalnih poti AKT in ERK po 1 uri stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah SH-SY5Y (metoda prenosa western, preračunano iz razmerja lis na PVDF membrani).

Figure 35. Graphic display of AKT and ERK signal pathways relative activation after 1-hour starvation and co-treatment with EPO in SH-SY5Y cells (western blot analysis, calculated from the ratio of bands' intensities on PVDF membrane).

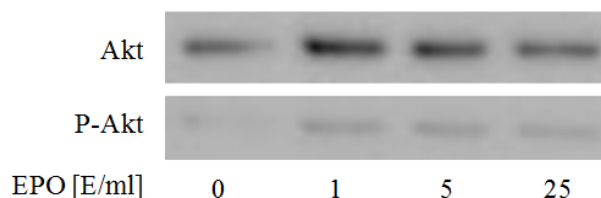
Nasprotno je po 3 urah vidna aktivacija AKT pri izpostavitvi nizkim koncentracijam EPO (1 in 5 E/ml) in tudi aktivacija ERK pri izpostavitvi 5 E/ml EPO (slika 36).



Slika 36. Grafični prikaz relativne stopnje aktivacije signalnih poti AKT in ERK po 3 urah stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah SH-SY5Y (metoda prenosa western, preračunano iz razmerja lis na PVDF membrani).

Figure 36. Graphic display of AKT and ERK signal pathways relative activation after 3-hour starvation and co-treatment with EPO in SH-SY5Y cells (western blot analysis, calculated from the ratio of bands' intensities on PVDF membrane).

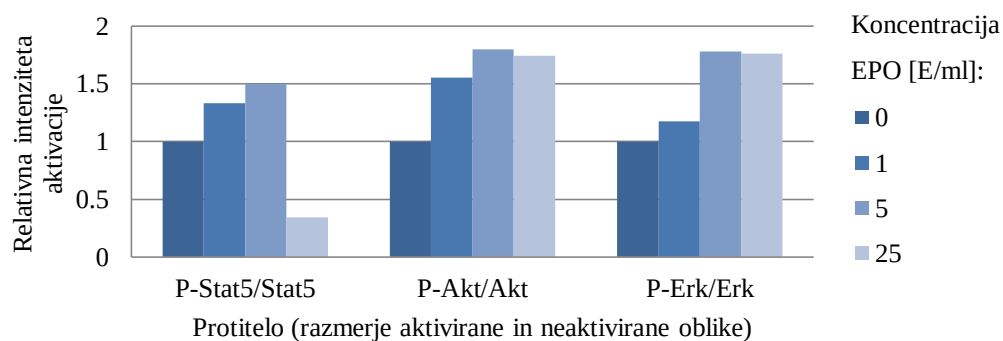
Slika 37 prikazuje aktivacijo signalne poti AKT v diferenciranih celicah PC12, ki smo jih 24 ur stradali in nato za 30 minut izpostavili EPO, kot je vidna na PVDF membrani.



Slika 37. Aktivacija signalne poti AKT po 30 minutah stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah PC12 (metoda prenosa western).

Figure 37. AKT signal pathway activation after 30-minute starvation and co-treatment with EPO in PC12 cells (western blot analysis).

Opazimo, da predvsem koncentraciji 5 in 25 E/ml EPO aktivirata signalno pot Akt in Erk, medtem ko 25 E/ml EPO povzroči močno znižanje signaliziranja preko poti Stat5 (slika 38).



Slika 38. Grafični prikaz relativne stopnje aktivacije signalnih poti Stat5, Akt in Erk po 30 minutah stradanja in sočasne izpostavitve EPO v celicah PC12 (metoda prenosa western, preračunano iz razmerja lis na PVDF membrani).

Figure 38. Graphic display of the Stat5, Akt and Erk signal pathways relative activation after 30-minute starvation and co-treatment with EPO in PC12 cells (western blot analysis, calculated from the ratio of bands' intensities on PVDF membrane).

4 RAZPRAVA

Glavni cilj magistrskega dela je bil razvoj primernih *in vitro* metod za proučevanje tkivnozaščitnega učinka EPO v celicah nevralnega izvora. Takšne metode bi bile primerne za visoko zmogljivostno testiranje molekul EPO v farmacevtski industriji, ki bi tkivnozaščitni učinek EPO na živčevje lahko uporabila v različne namene, npr. za zdravljenje bolnikov z nevrodegenerativnimi boleznimi ali po možganski kapi. Izpostaviti velja problem modela celičnih linij kot živega organizma, kar pomeni, da lahko pride do znatnih odstopanj med rezultati poskusov, saj je znotraj kulture prav tako prisotna naravna diverziteta, ki pa se med različnimi poskusi še precej poveča zaradi različnega števila pasaž, spreminjajoče pH vrednosti in drugih dejavnikov, na katere zelo težko vplivamo. Poleg tega rezultati, pridobljeni na celičnih linijah, niso popolnoma prenosljivi v organske sisteme, saj celice v klasični kulturi ne izražajo vseh biokemijskih in morfoloških lastnosti celic tkiva, temveč imajo ohranjene predvsem osnovne lastnosti, ki omogočajo preživetje v kulturi. Kljub naštetemu so celične linije zelo pomemben modelni sistem, predvsem zaradi omogočanja visoko zmogljivostnih analiz in zagotavljanja nespremenljivih razmer, v katerih poteka poskus. Rezultati so večinoma primerljivi z organskimi sistemi oz. organizmi, prednost pa je tudi etično izogibanje poskusom na živalih.

Dela smo se lotili z iskanjem primerne sprožilca apoptoze. Najprej smo preizkusili izpostavitve celic različnim koncentracijam stavrosporina (STR), ki je znan kot eden najboljših in najpogostejše uporabljenih sprožilcev apoptoze (López in sod., 2000; Yuste in sod., 2002; Pregi in sod., 2006). S testom za merjenje internukleosomske razgradnje DNA smo kot primeren režim za sprožanje apoptoze določili 9-urno obdelavo celic s 25 nM STR (slika 10). Vendar pa nekateri avtorji poročajo o neprimernosti sprožanja apoptoze s STR na celični liniji SH-SY5Y (Shi in sod., 2010). Prav tako smo zasledili, da naj bi EPO med drugim deloval preko proteinske kinaze C (von Lindern in sod., 2010), medtem ko STR sproži apoptozo prav preko zaviranja delovanja tega proteina (Pregi in sod., 2006), poleg tega pa smo našli zadovoljiv način sprožanja apoptoze na fiziološki način (s stradanjem), zato smo metodo sprožanja apoptoze s STR kasneje opustili.

Ker smo v literaturi našli nekaj poročil o raziskavah zaščitnega učinka EPO na celice, pri katerih so apoptozo sprožili s TNF- α (Pregi in sod., 2009; Wenker in sod., 2010), smo

metodo preizkusili tudi mi, a se ni izkazala za primerno. Izpostavitve celic SH-SY5Y 10 in 100 ng/ml TNF- α ni povzročila razlike v obsegu apoptoze v primerjavi z negativno kontrolo. Proteini družine TNF namreč signalizirajo preko vsaj 29 različnih receptorjev, od česar je odvisen odziv, ki ga določen protein sproži v celici. TNF- α tako lahko deluje na različne signalne poti, od katerih nekatere vodijo v celično smrt, druge pa do aktivacije anti-apoptotskih proteinov, proliferacije in diferenciacije celic (Aggarwal, 2003; Hehlhans in Pfeffer, 2005, Wang in sod., 2011a).

Kot najprimernejši sprožilec apoptoze se je pokazalo stradanje celic z odtegnitvijo seruma, ki ga sicer dodajamo v rastni medij (SH-SY5Y: 10 % FBS; PC12: 10 % HS in 5 % FBS). Stradanje v celici sproži močan metabolični stres, ki je normalen fiziološki pojav, in vodi v apoptozo. Ustreznost sprožitve apoptoze z metodo stradanja celic smo potrdili tako s testom za merjenje metabolične aktivnosti kakor tudi s specifičnimi apoptotskimi testi, ki razlikujejo med apoptozo in nekrozo: s testom za merjenje internukleosomske razgradnje DNA, s testom aktivacije kaspaz in z razmerjem izražanja genov *BAX* in *BCL-2* (metoda RT-PCR). S popolno odtegnitvijo seruma celični liniji SH-SY5Y uspešno sprožimo apoptozo že po 24 urah stradanja (slika 11), ko metabolična aktivnost pade na 80 %. Po 48 urah se metabolična aktivnost zniža na 40 %, po 72 urah pa na slabih 30 %. Kot primerni časovni točki za merjenje obsega apoptoze smo najprej izbrali 24- in 48-urno stradanje in nadaljevali poskuse z merjenjem na teh dveh točkah. Kasneje se je izkazalo, da je za opazovanje učinka EPO na celice oz. na raven preživetja primernejše 24-urno stradanje, saj so po 48 urah očitno celice že preveč poškodovane, da bi bil viden učinek EPO. Za sprožitev apoptoze celic PC12 z enako metodo je potrebno dolgotrajnejše stradanje. Preizkusili smo merjenje metabolične aktivnosti prvih 24 ur na vsake tri ure (slika 12), a na nobeni točki nismo zaznali statistično značilnega znižanja metabolične aktivnosti, kar je v nasprotju z rezultati, ki jih navajajo nekateri avtorji (Maroto in sod., 1997; Ji in sod., 2001). Po 3 in 24 urah stradanja smo zaznali znatno povišanje metabolične aktivnosti, kar je običajen odziv celic preden nastopi apoptoza, pogosto opažen pri obdelavi vzorca z odmerkom, ki je nižji od sprožitvenega za apoptozo, oz. pri krajšem času izpostavitve dejavnikom, ki sprožajo apoptozo. Drugi avtorji so začetek apoptoze zaznali tri do pet dni po začetku stradanja celic linije PC12 (Tanaka in sod., 1997; Koshimura in sod., 1999) in na teh točkah smo statistično značilno znižanje metabolične aktivnosti zaznali tudi mi

(slika 13). Po treh dneh stradanja je metabolična aktivnost upadla na 72 %, po petih pa na 30 %. Kot primerno časovno točko za merjenje učinka EPO na preživetje celic smo izbrali tretji dan stradanja. Apoptozo smo v izbranih časovnih točkah potrdili tudi s specifičnimi testi za merjenje apoptoze (sliki 14 in 15).

Delo smo nadaljevali z merjenjem učinka EPO na preživetje celic v izbranih časovnih točkah. Test za merjenje metabolične aktivnosti smo uporabili predvsem za grobo določanje parametrov testiranja. Izkazalo se je, da so izmed vseh preizkušenih režimov, naštetih v preglednici 6 (str. 26), statistično značilne razlike opazne le kadar celice SH-SY5Y izpostavimo EPO 12 ur pred stradanjem in pri sočasnem stradanju in izpostavitvi EPO celic PC12. Zaznali smo povišanje metabolične aktivnosti celic SH-SY5Y, predhodno izpostavljenih 50 in 100 E/ml EPO, vendar zaščitnega učinka 100 E/ml kasneje s specifičnimi apoptotskimi testi nismo potrdili. Dvig metabolične aktivnosti celic PC12 je povzročilo sočasno stradanje in izpostavitve 25 in 50 E/ml EPO. Rezultati posameznih poskusov, zastavljenih po enaki shemi, so se sicer večkrat precej razlikovali. Glede na kasneje pridoblje rezultate smo ugotovili, da test za merjenje metabolične aktivnosti z reagentom WST-1 ni primeren za natančno spremljanje učinka EPO na apoptozo na celični liniji SH-SY5Y, ker je učinek EPO na apoptozo manjši od variabilnosti, do katere pride zaradi merjenja splošne celične metabolične aktivnosti.

Uporaba RT-PCR in računanja razmerja pro- in anti-apoptotskih genov (*Bax/Bcl-2*) se za celično linijo PC12 ni izkazalo kot primerna metoda. Prvi razlog je odsotnost izražanja gena *Bcl-2* v celicah, kjer ne sprožimo apoptoze (celice, gojene v mediju DME s 100 ng/ml NGF- β). Poleg tega pa nam tudi izražanje pro-apoptotskih genov (*Bax* in *Bad*), ki se po 3-dnevnem sprožanju apoptoze zniža (slika 20), pove, da je pri naši zasnovi poskusa očitno vpleten nek drug mehanizem in ne izbrani geni. Precejšnja verjetnost je, da lahko ugotovitev posplošimo za celično linijo PC12, saj sta do enakih ugotovitev prišla že Maroto in Perez-Polo (1997). Prav tako je skladno z našimi rezultati tudi Renzi s sodelavci (2002) z metodo mikromrež zaznal povišanje izražanja *Bax* in *Bad* po 3-urni izpostavitvi diferenciranih PC12 10 E/ml EPO (brez sprožanja apoptoze), po drugi strani pa je opazil povečanje izražanja anti-apoptotskega gena *Bcl-XL* in znižanje izražanja pro-apoptotskega gena *Bak*. Prišli so tudi do ugotovitve, da z metodo RT-PCR učinka EPO prej kot po 24

urah ne moremo zaznati, vendar pa so v tem primeru merili spremembo izražanja genov po izpostavitvi 0,2 E/ml EPO, koncentraciji, ki v naših poskusih ni pokazala nobenega učinka. Kljub temu da očitno lahko spremembe na ravni izražanja genov opazimo že po 24 urah stradanja, so te glede na naše rezultate vidne tudi še po 72 urah. Izražanja genov *Bcl-XL* in *Bak* v naših poskusih nismo testirali. Pri celični liniji SH-SY5Y smo izražanje apoptotskih genov merili le po 24 in 48 urah stradanja in nismo zaznali nobenih sprememb v izražanju apoptotskih genov. Poskus bi bilo morda smiselno ponoviti pri krajšem času stradanja.

Eden izmed rezultatov, ki smo jih dobili s sprožanjem apoptoze s stavrosporinom, preden smo ga označili kot neprimerne za naše namene, je pri testu za merjenje razgradnje DNA kazal rahlo zaščitni učinek po 24-urni predhodni izpostavitvi 25 E/ml EPO, vendar razlika ni bila statistično značilna, rezultata pa v nadaljnjih poskusih nismo več uspeli ponoviti.

Test za merjenje internukleosomske razgradnje DNA se je sicer na obeh celičnih linijah pokazal kot zelo primeren za merjenje učinka EPO na preživetje. Na celični liniji SH-SY5Y smo apoptozo sprožali 48 ur. Glede na rezultate bi bilo morda bolje uporabiti krajši čas, a smo kljub temu opazili statistično značilno znižanje obsega apoptoze na približno enako raven kakor pri negativni kontroli (brez apoptoze) pri 12-urni predhodni izpostavitvi 25 E/ml EPO (slika 22). Na celični liniji PC12 smo apoptozo sprožali le 3 ure, zato smo dobili precej šibke vrednosti absorbanc, vendar se tudi tu vidijo statistično značilni zaščitni učinki sočasnega stradanja in izpostavitve 25 in 50 E/ml EPO in znižanje obsega apoptoze na enako stopnjo kakor pri kontroli brez stradanja oz. brez apoptoze (slika 23).

Aktivacijo kaspaz v celicah linije SH-SY5Y smo merili po dveh urah in pol, kar se je izkazalo za predolgo dobo, saj razlike med posameznimi koncentracijami verjetno zaradi tega niso bile statistično značilne. So pa kljub temu vidni odmiki v smeri, ki nakazujejo zaščitni učinek koncentracij 10 in 25 E/ml EPO, kar se lepo sklada z rezultati, ki jih kaže test za merjenje internukleosomske razgradnje DNA. Enak test smo zato na celični liniji PC12 uporabili za merjenje aktivacije kaspaz 2 uri po začetku stradanja. Rezultat nedvoumno kaže na zaščitni učinek sočasne izpostavitve 5, 25 in 50 E/ml EPO, ki statistično značilno znižajo aktivacijo celokupnih kaspaz – v nasprotju s koncentracijo 100 E/ml EPO, za katero smo že na podlagi prejšnjih testov dognali, da nima učinka na

apoptozo oz. je celo rahlo toksična. Celice PC12 po sočasnem stradanju in izpostavitvi 5 in 50 E/ml EPO kažejo celo na višjo viabilnost kakor pri negativni kontroli, kjer nismo sprožali apoptoze. Na vsaki celični liniji smo sicer opravili 16 meritev aktivacije kaspaz s fluorescentnim čitalnikom (v 1,5-urnih intervalih, 24 ur), vendar so bili uporabni le prvi rezultati; kasneje so se precej povečale napake, verjetno predvsem zaradi zelo hitrega izhlapevanja medija med merjenjem, vrednosti pa so zelo hitro upadle, kar pomeni, da bi bilo morda smiselno poskusiti tudi s še krajšim časom stradanja in krajšo inkubacijo v kaspaznem substratu.

Zaščitnega učinka predhodne izpostavitve celic SH-SY5Y 1 E/ml in 5 E/ml EPO, ki ga zagovarjajo Pregi in sod. (2006), nismo potrdili z nobenim testom. Prav tako v nasprotju z nekaterimi raziskovalci (Tanaka in sod., 2001) zaščitnega učinka nismo zaznali pri sočasnem stradanju in izpostavitvi celic koncentracijam EPO, nižjim od 5 E/ml.

Pri večini poskusov je bil zaščitni učinek EPO na preživetje celic velik, saj so primerni režimi izpostavitve EPO povrnili celično viabilnost na raven, kakršna je bila pred sprožanjem apoptoze (negativna kontrola – brez apoptoze). Rezultat je skladen z raziskavami Zhi-Kun-ove skupine (2012) in ne popolnoma z dognanji Um-ove skupine (2007), ki je zaznala le 50-odstotno povišanje viabilnosti v primerjavi z negativno kontrolo.

Z metodo RT-PCR smo dokazali, da izbrani celični liniji v nobeni izmed testiranih razmer endogeno ne izražata gena *EPO*. S to ugotovitvijo smo izničili možnost, da bi le-ta vplival na odziv celic oz. da bi bila dejanska koncentracija EPO v celicah različna od eksogeno dodane. Prav tako smo za obe celični liniji potrdili, da se izražanje *EPOR* ob sprožanju apoptoze statistično značilno poveča (slike 26-28).

Vpliv EPO na izražanje gena *EPOR* smo merili, da bi ugotovili, ali je mehanizem zaščitnega delovanja EPO povezan z izražanjem *EPOR* (povratna zanka). Rezultati kažejo, da se pri 12-urni izpostavitvi 10 E/ml EPO, ki ji sledi 24-urno stradanje celic SH-SY5Y sicer izražanje *EPOR* rahlo poviša, vendar rezultat nima dovolj velike statistične teže. Pri tem poskusu nismo uspeli potrditi povečanja izražanja *EPOR* ob stradanju, kar smo sicer potrdili že s prejšnjimi testi, zato menimo, da bi bilo potrebno poskus ponoviti. Podobne

rezultate smo dobili tudi pri sočasnem stradanju in izpostavitvi celic PC12 EPO, kjer po 3 dneh za nobeno od koncentracij EPO, ki naj bi imele zaščitni učinek, nismo mogli potrditi spremembe v izražanju *EpoR*. Statistično značilna razlika je vidna le pri 24-urnem sočasnem stradanju in izpostavitvi visoki koncentraciji EPO (100 E/ml), ki je za celice toksična – ta zniža izražanje *EpoR*, kar je skladno s hipotezo o povratni zanki. Po 48 urah sočasnega stradanja in izpostavitve EPO nismo več zaznali znižanja v izražanju *EPOR*, kar pomeni, da bi morali tudi nižje koncentracije EPO testirati še pri krajšem času stradanja in sočasni izpostavitvi EPO (PC12 24 ur, SH-SY5Y pa še manj, morda 12 ur).

Aktivacijo signalnih poti smo v celični liniji SH-SY5Y merili po 1 in 3 urah izpostavitve EPO. Po 1 uri je bila vidna le šibka aktivacija ERK pri izpostavitvi 25, 50 in 100 E/ml EPO, po 3 urah pa pri 5 E/ml EPO. Šibko aktivacijo AKT smo zaznali le pri 3-urni izpostavitvi 1 in 5 E/ml EPO. Glede na dobljene rezultate z metodo prenosa western na celični liniji PC12 pa lahko potrdimo, da EPO deluje preko signalne poti Akt in Erk. Posebej lepo so predvidene signalne poti izražene pri izpostavitvi 25 E/ml EPO, kjer sta vidni močni aktivaciji tako Akt kot Erk ter tudi utišanje signalne poti Stat5, ki naj ne bi bila vključena v zaščitno delovanje EPO.

5 SKLEPI

5.1 SPROŽILCI APOPTOZE

- a) Metabolični stres, povzročen s stradanjem, vpliva na izražanje gena *EPOR* in je sprožilec apoptoze v celičnih linijah SH-SY5Y in PC12.
- b) Primeren čas sprožanja apoptoze s stradanjem, t. j. popolno odtegnitvijo seruma, v celični liniji SH-SY5Y je 24 ur, v celični liniji PC12 pa 72 ur.
- c) Stavrosporin in TNF- α nista primerna za določanje vpliva EPO na preživetje celic izbranih linij (SH-SY5Y in PC12).

5.2 METODE MERJENJA APOPTOZE

- a) Test za merjenje metabolične aktivnosti z reagentom WST-1 je primeren za grobo določanje apoptoze na celičnih linijah SH-SY5Y in PC12, če so razlike dovolj velike, ni pa primeren za natančno spremljanje učinka EPO na apoptozo celic linije SH-SY5Y.
- b) Test za merjenje sproščenega encima laktat dehidrogenaza ni primeren za proučevanje obsega apoptoze na izbranih celičnih linijah.
- c) Merjenje razmerij izražanja pro-apoptotskega gena *Bax* in anti-apoptotskega gena *Bcl-2* ni primerno za določanje apoptoze celic linije PC12.
- d) Testa za merjenje internukleosomske razgradnje DNA in aktiviranih kaspaz sta zelo primerna za določanje vpliva EPO na preživetje celic obeh testiranih linij.

5.3 UČINEK EPO NA APOPTOZO

- a) EPO lahko privede do velikih razlik v obsegu apoptoze – ob primernem režimu izpostavitve EPO se celična viabilnost povrne na raven, kakršna bi bila brez sprožanja apoptoze.
- b) Rezultati kažejo na izstopajočo zaščitno vlogo 12-urne izpostavitve 25 E/ml EPO pred stradanjem celične linije SH-SY5Y ter sočasnega stradanja in izpostavitve 50 E/ml EPO celične linije PC12 in medtem ko bi zaščitno vlogo lahko pripisali še enakemu režimu izpostavitve EPO koncentracij 10 E/ml na SH-SY5Y ter 5 in 25 E/ml na PC12, poskusi z ostalimi koncentracijami (0,1-100 E/ml) in režimi (izpostavitvev EPO pred stradanjem, sočasno s stradanjem ter kombinacija obojega) niso pokazali učinka oz. je bil ta toksičen.
- c) Vpliva EPO na izražanje *EPOR* nismo zaznali.
- d) EPO v izbranih celičnih linijah aktivira signalni poti AKT in ERK.

6 POVZETEK MAGISTRSKEGA DELA

6.1 POVZETEK

Človeški eritropoetin (EPO) je citokin, ki preko vezave na eritropoetinski receptor (EPOR) v celici sproži različne biokemijske poti. Poleg dobro proučenih vlog uravnavanja proliferacije, diferenciacije in celične smrti eritroidnih predniških celic, ki so jih od odkritja dalje zaradi pomembne vloge v eritropoezi intenzivno proučevali znanstveniki po vsem svetu, novejša raziskava nakazujejo tudi tkivnozaščitni učinek EPO na nekatera tkiva: kožno, endotelno, srčno, živčno itd. Mehanizem tkivnozaščitnega delovanja na živčevje naj bi bil podoben kot v hematopoetskih tkivih, kjer EPO preprečuje vnetje in celično apoptozo ter na okoliško tkivo deluje regenerativno. Izkazalo se je, da je za tkivnozaščitno delovanje potrebna mnogo višja koncentracija EPO kot za osnovno eritropoetsko delovanje. Farmacevtska industrija ima glede uporabe EPO dva osnovna cilja, in sicer razvoj molekule z izničeno hematopoetsko in ohranjeno tkivnozaščitno vlogo ter razvoj metod za visoko zmogljivostno proučevanje učinka teh molekul *in vitro*. Cilji magistrskega dela so bili: (i) najti primeren sprožilec apoptoze za merjenje učinka eksogeno dodanega EPO, (ii) razviti metodo, ki omogoča merjenje tkivnozaščitnega učinka eritropoetina *in vitro* v celičnem modelu, ter (iii) proučiti učinek EPO na izbrane celične linije nevralnega izvora. Pričakovali smo, da bomo ob ustreznem režimu izpostavitve celic EPO zaznali zmanjšan obseg apoptoze v primerjavi s kontrolnimi celicami.

Magistrsko delo je bilo narejeno na dveh celičnih linijah: SH-SY5Y (človeški nevroblastom) in PC12 (podganji feokromocitom), ki sta bili večinoma gojeni v mediju DME, obogatenem s serumom. Testirali smo različne teste za specifično in nespecifično merjenje apoptoze, sprožene z različnimi sprožilci, večinoma pa s stradanjem, t. j. odstranitvijo seruma iz polnega gojitvenega medija. Za začetne poskuse smo uporabili test za merjenje metabolične aktivnosti z reagentom WST-1, katerega rezultat smo izrazili kot metabolično aktivnost celic. Uporabljeni specifični testi, ki razlikujejo apoptozo od nekroze, pa so bili merjenje izražanja apoptotskih proteinov z metodo RT-PCR (obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo) ter kompleta testov za merjenje internukleosomske razgradnje DNA in aktivacije kaspaz (Roche). Testirali smo različne režime izpostavitve EPO: pred stradanjem, sočasno s stradanjem in kombinacijo obojega,

vse to testirano z različnimi časi izpostavitve in koncentracijami EPO (0,1-100 E/ml). Za preverjanje aktivacije signalnih poti AKT, ERK in STAT5 smo uporabili metodo prenosa western.

Statistično značilno povišanje obsega apoptoze ($P < 0,001$) smo pri stradanju celic SH-SY5Y zaznali že po 24 urah, ko se je metabolična aktivnost znižala na 80 %, medtem ko je bilo na celični liniji PC12 za statistično značilno znižanje potrebno vsaj 72-urno stradanje ($P = 0,015$), ko se je metabolična aktivnost spustila na 72 %. Apoptozo, sproženo s stradanjem, smo potrdili tudi s specifičnimi apoptotskimi testi. Statistično značilen zaščitni učinek EPO smo zaznali le pri predhodni izpostavitvi celic SH-SY5Y in sočasnem stradanju in izpostavitvi celic PC12. Povrnitev celične viabilnosti na raven, kakršna je bila pred stradanjem (negativna kontrola) smo s testom za merjenje razgradnje DNA zaznali pri 12-urni predhodni izpostavitvi celic SH-SY5Y 25 E/ml EPO ($P = 0,031$) in z merjenjem aktivacije kaspaz na celicah PC12 pri 72-urnem sočasnem stradanju in izpostavitvi EPO koncentracij 5 ($P = 0,001$), 25 ($P = 0,017$) in 50 E/ml ($P = 0,001$). Z metodo RT-PCR smo dokazali, da se EPO v izbranih celičnih linijah ne izraža endogeno, kot tudi da eksogeno dodan EPO nima vpliva na izražanje gena *EPOR*. S prenosom western smo v obeh celičnih linijah, predvsem pa v PC12, zaznali povišan delež fosforiliranih proteinov AKT in ERK ob izpostavitvi EPO.

Metabolični stres, povzročen s stradanjem, vpliva na izražanje gena *EPOR* in je primeren sprožilec apoptoze v proučevanih celičnih linijah. Primeren čas sprožanja apoptoze s stradanjem v celični liniji SH-SY5Y je 24 ur, v celični liniji PC12 pa 72 ur. Kot najprimernejša testa za določanje vpliva EPO na preživetje celic obeh testiranih linij sta se izkazala merjenje internukleosomske razgradnje DNA in merjenje aktiviranih kaspaz. Rezultati kažejo na izstopajočo zaščitno vlogo 12-urne predhodne izpostavitve 10 in 25 E/ml EPO na celični liniji SH-SY5Y ter sočasnega stradanja in izpostavitve 5, 25 in 50 E/ml EPO na celični liniji PC12. Vpliva EPO na izražanje *EPOR* nismo zaznali. EPO v izbranih celičnih linijah aktivira signalni poti AKT in ERK. Razvoj metod za proučevanje učinka EPO *in vitro* je bil uspešen: ob primernem režimu izpostavitve smo zabeležili zaščitni učinek EPO na celice nevralnega izvora.

6.2 SUMMARY

As a vital cytokine for erythroid development, the effects of erythropoietin (EPO) *via* the erythropoietin receptor (EPOR) have been studied extensively on the physiological, cellular and molecular levels. Besides regulating proliferation, differentiation and death of erythroid precursor cells, an increasing number of studies demonstrate its role as a tissueprotective agent. Protective effects have been shown on various non-hematopoietic tissues: skin, endothelial, myocardial, neural *etc.* The mechanism of action in neural tissue is supposed to be similar to the one in hematopoietic: anti-apoptotic, (neuro-)regenerative and anti-inflammatory. Due to the fact that the concentration of exogenously added EPO has to be much higher to observe neuroprotective in contrast to erythropoietic effect, two promising niches arise for pharmaceutical industry: the modification of an EPO molecule that would have diminished erythropoietic and enhanced neuroprotective role and development of *in vitro* methods for high-throughput analyses. Therefore, the objectives of this Master's Thesis were (i) to find a suitable apoptotic trigger, (ii) to develop a method that enables measuring the effect of EPO *in vitro*, and (iii) to study neuroprotective effect of EPO *in vitro*. Our hypothesis was that we will be able to detect decrease in apoptotic ratio in cells, treated with EPO by appropriate design.

All of the Master's Thesis work was done on two cell lines: SH-SY5Y (human neuroblastoma) and PC12 (rat pheochromocytoma), cultured mostly in DME medium and supplemented with serum. We tested several apoptotic triggers and tests for measuring apoptosis to find the most appropriate. As an apoptotic trigger in most experiments we used a serum starvation method (total serum depletion from full growth medium). For initial experiments we used a non-specific test for apoptosis where we measured metabolic activity of the cells with the WST-1 reagent. Later we applied more specific apoptotic tests for measuring the expression of apoptotic proteins (with RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) method), the fragmentation of DNA and the activation of caspases (for the last two we used Roche's kits). We tested several different treatment designs: pre-treatment, co-treatment (concomitantly with depletion of serum) and a combination of both (pre- + co-treatment). In addition, we also applied various different

treatment time periods and concentrations ranging from 0.1 to 100 IU/ml. We used western blot analysis to test the activation of the AKT, ERK and STAT5 signaling pathways.

Statistically significant rise in apoptosis ($P < 0.001$) in serum-starved SH-SY5Y was already seen after 24 hours of starvation, when metabolic activity decreased to 80 %. By contrast, no effect on metabolic activity was seen on the PC12 cell line until three days after the serum depletion, when metabolic activity finally decreased to 72 % ($P = 0,015$). We confirmed apoptotic-like cell death with specific apoptotic tests. Only two treatment designs with EPO have shown to have protective effect, one on each cell line. Restitution to the apoptotic level as seen in negative control (without triggering the apoptosis) was detected by a DNA fragmentation test when SH-SY5Y cells were pre-treated for 12 hours with 25 IU/ml EPO ($P = 0.031$), and by a caspase activation test when PC12 cells were co-treated with 5 ($P = 0.001$), 25 ($P = 0.017$) and 50 IU/ml EPO ($P = 0.001$). . We have proven that there is no endogenous expression of EPO in our cell lines and also that EPO has no effect on the level of expressed *EPOR* gene. Western blot analysis revealed phosphorylation of AKT and ERK in both cell lines, especially in PC12 when treated with EPO.

Metabolic stress, induced by serum starvation, influences *EPOR* gene expression and is a suitable trigger of apoptosis for further studies of neuroprotective effects of EPO *in vitro*. Furthermore, the appropriate period of time for triggering apoptosis has proven to be 24 hours in the SH-SY5Y cell line, and at least 72 hours in PC12. Measuring DNA fragmentation and activation of homogenous caspases have been verified as the most appropriate methods for measuring the effect of EPO on both cell lines. EPO showed to be neuroprotective on SH-SY5Y when pre-treated for 12 hours with 25 IU/ml. Similar effects on the PC12 cell line were seen when differentiated cells were co-treated with 5, 25 and 50 IU/ml EPO. We perceived no effect of EPO on *EPOR* gene expression. We confirmed the involvement of AKT and ERK signaling pathways in cells treated with EPO. To conclude, we successfully developed methods for *in vitro* studies of EPO, which enabled us to detect tissueprotective effects on cells of neural origin, exerted by appropriate treatment design with EPO.

7 VIRI

- Aggarwal, B. B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamiliy: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* 3 (9): 745-756
- Alberts, B., Johnson, A. in sod. 2008. Manipulating proteins, DNA, and RNA. V: *The Cell*. 5th ed. New York, Garland Science: 517- 518, 573-574
- Aubry, J. M., Schwald, M. in sod. 2009. Early effects of mood stabilizers on the Akt/GSK-3beta signaling pathway and on cell survival and proliferation. *Psychopharmacology* 205 (3): 419-429
- Bao, H., Jacobs-Helber, S. M. in sod. 1999. Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood* 93 (11): 3757-3773
- Bernaudin, M., Martin, H. H. in sod. 1999. A potential role of erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 19 (6): 643-651
- Bren, A., Kandus, A. in sod. 2002. A comparison between epoetin omega and epoetin alfa in the correction of anemia in hemodialysis patients: a prospective, controlled crossover study. *Artificial Organs* 26 (2): 91-97
- Brines, M. in Cerami, A. 2005. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 484-494
- Brines, M. in Cerami, A. 2012. The Receptor that tames the innate immune response. *Molecular Medicine* 18: 486-496
- Brines, M., Grasso, G. in sod. 2004. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14907-14912
- Brines, M., Patel, N. S. A. in sod. 2008. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31): 10925–10930
- Burgering, B. M. in Coffey, P. J. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376: 599-602
- Campana, W. M., Misasi, R. in O'Brien, J. S. 1998. Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. *International Journal of Molecular Medicine* 1: 235-241

- Carnot, P. in Deflandre, C. 1906. S'ur l'activite hematopoietique de serum au cours de la regeneration du sang. *Comptes rendus de l'Académie des sciences* 143: 384-386
- Chateauvieux, S., Grigorakaki, C. in sod. 2011. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochemical Pharmacology* 82: 1291-1303
- Constantinescu, S. N., Ghaffari, S. in Lodish, H. F. 1999. The erythropoietin receptor: structure, activation and intracellular signal transduction. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 10: 18-23
- Culmsee, C. in Mattson, M. P. 2005. p53 in neuronal apoptosis. *Biochememical and Biophysical Research Communications* 331: 761-777
- D'Andrea, A. D., Lodish, H. F. in Wong, G. G. 1989. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 57, 277-285
- Das, K. P., Freudenrich, T. M. in Mundy, W. R. 2004. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicology and Teratology* 26 (3): 397-406
- Datta, S. R., Brunet, A. in Greenberg, M. E. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development* 13: 2905-2927
- Datta, S. R., Dudek H., in sod. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241
- De Vos, A. M., Ultsch, M. in Kossiakoff, A. A. 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255: 306-311
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M. in sod. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278: 687-689
- del Poeta, G., Venditti, A. in sod. 2003. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 101 (6): 2125-2131
- Digicaylioglu, M., Bichet, S. in sod. 1995. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 3717-3720
- Dojindo Molecular Technologies, Inc. 2012. Application: NADH and NADPH detection, superoxide detection.
<http://www.dojindo.com/store/p/289-WST-1.aspx> (1. 8. 2012)

- Ehrenreich, H., Timner, W. in Sirén AL. 2004. A novel role for an established player: anemia drug erythropoietin for the treatment of cerebral hypoxia/ischemia. *Transfusion and Apheresis Science* 31 (1): 39-44
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35: 495-516
- Fibach, E. 2011. Involvement of phosphatases in proliferation, maturation, and hemoglobinization of developing erythroid cells. *Journal of Signal Transduction* 2011 (spletna objava)
- Fisher, J. W., Koury, S. in Mendel, S. 1996. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *British Journal of Haematology* 95 (1): 27-32
- Frank, S. J. 2002. Receptor dimerization in GH and erythropoietin action – it takes two to tango, but how? *Endocrinology* 143: 2-10
- Franke, T. F., Kaplan, D. R. in Cantley, L. C. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88: 435-437
- Fu, A., Hui, E. K. in sod. 2011. Neuroprotection in stroke in the mouse with intravenous erythropoietin-Trojan horse fusion protein. *Brain Research* 1369: 203-207
- Ghezzi, P. in Brines, M. 2004. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death & Differentiation* 11 (Suppl. 1): S37–S44
- Grasso, G., Sfacteria, A. in sod. 2004. Erythropoietin as a tissue-protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go? *Neuroscientist* 10 (2): 93-98
- Greene, L. A. in Tischler, A. S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 2424-2428
- Gross, A. W. in Lodish, H. F. 2006. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *The Journal of Biological Chemistry* 281: 2024-2032
- Gunning, P. W., Landreth, G. E. in sod. 1981. Nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells: evaluation of changes in RNA and DNA metabolism. *The Journal of Neuroscience* 1 (4): 368-379
- Harrill, J. A. in Mundy, W. R. 2011. Quantitative assessment of neurite outgrowth in PC12 cells. V: *In vitro* Neurotoxicology: Methods and Protocols, Methods for Molecular

- Biology 758. Costa, L. G. in sod. (eds.). LLC, Springer Science + Business Media: 331-337
- Hehlgans, T. in Pfeffer, K. 2005 The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115: 1-20
- Henry, D. H. in Abels, R. I. 1994. Recombinant human erythropoietin in the treatment of cancer and chemotherapy-induced anemia: results of double-blind and open-label follow-up studies. *Seminars in Oncology* 21 (suppl 3): 21-28
- Ishiyama, M., Miyazono, Y. in sod. 1997. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44 (7): 1299-1305
- Jelkmann, W. 2007. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *European Journal of Haematology* 78: 183-205
- Jelkmann, W. 2011. Regulation of erythropoietin production. *The Journal of Physiology* 589 (6): 1251-1258
- Ji, Z. N. in Liu, G. Q. 2001. Inhibition of serum deprivation-induced PC12 cell apoptosis by tanshinone II A. *Acta Pharmacologica Sinica* 22 (5): 459-462
- Juul, S. E., Yachnis, A. T. in sod. 1999. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatric and Developmental Pathology* 2 (2): 148-158
- Klingmueller, U. et al. 1996. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8324-8328
- Köllensperger, M., Krismer, F. in sod. 2011. Erythropoietin is neuroprotective in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Movement Disorders* 26 (3): 507-515
- Koshimura, K., Murakami, Y. in sod. 1999. Effects of Erythropoietin on Neuronal Activity. *Journal of Neurochemistry* 72: 2565-2572
- Koury, M. J. in Bondurant, M. C. 1988. Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. *Journal of Cellular Physiology* 137: 65-74

- Koury, M. J. in Bondurant, M. C. 1990. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed cell death in erythroid progenitor cells. *Science* 248: 378-381
- Krantz, S. B. 1991. Erythropoietin. *Blood* 77 (3): 419-434
- Kumral, A., Genc, S. in sod. 2006. Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Biology of the Neonate* 89: 205-210
- Leist, M., Ghezzi, P. in sod. 2004. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 305: 239-242
- LGC/ATTC. 2012. Product description CRL-2266
<http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2266&Template=cellBiology> (1. 2. 2012)
- Li, G., Ma, R. in sod. 2008. Protective effect of erythropoietin on beta-amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms. *Neuroscience Letters* 442 (2): 143-147
- López, E. in Ferrer, I. 2000. Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Molecular Brain Research* 85 (1-2): 61-67
- Ma, R., Huang, C. in sod. 2009. Erythropoietin protects PC12 cells from beta-amyloid(25-35)-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Neuropharmacology* 56 (6-7): 1027-1034
- Macleod, M. R., Alsopp, T. E. in sod. 2001. Serum withdrawal causes apoptosis in SHSY 5Y cells. *Brain Research* 889: 308-315
- Maroto, J. in Perez-Polo, J. R. 1997. BCL-2-related protein expression in apoptosis: oxidative stress versus serum deprivation in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 69 (2): 514-523
- Masuda, S., Nagao, M. in sod. 1993. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics: comparison with receptor properties of erythroid cells. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 11208-11216
- Meloni, B. P., Tilbrook, P. A. in sod. 2006. Erythropoietin preconditioning in neuronal cultures: signaling, protection from *in vitro* ischemia, and proteomic analysis. *Journal of Neuroscience Research* 83: 584-593

- Middleton, S. A., Barbone, F. P. in sod. 1999. Shared and unique determinants of the erythropoietin (EPO) receptor are important for binding EPO and EPO mimetic peptide. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (20): 14163-14169
- Miyake, T., Kung, C. K. in Goldeasser, E. 1977. Purification of human erythropoietin. *The Journal of Biological Chemistry* 252: 5558-5564
- Mocini, D., Leone, T. in sod. 2007. Structure, production and function of erythropoietin: implications for therapeutical use in Cardiovascular disease. *Current Medicinal Chemistry* 14 (21): 2278-7787
- Morishita, E., Masuda, S. in sod. 1997. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents *in vitro* glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76: 150-116
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63
- Murphy, E. A., Bell, A. L. in sod. 1994. Study of erythropoietin in treatment of anaemia in patients with rheumatoid arthritis. *BMJ* 309: 1337-1338
- Noguchi, C. T., Asavaritikrai, P. in sod. 2007. Role of erythropoietin in the brain. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 64: 159-171
- Noshita, N., Lewén, A. in sod. 2001. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 21: 1442-1450
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. in Korsmeyer, S. J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74 (4): 609-619
- Otsuki, Y., Li, Z., in Shibata, M. A. 2003. Apoptotic detection methods—from morphology to gene. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 38: 275-339
- Pižem, J. in Cör, A. 2001. Kaspaze. *Medicinski razgledi* 40: 283-291
- Pregi, N., Vittori, D. in sod. 2006. Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 238-246
- Pregi, N., Wenker, S. in sod. 2009. TNF-alpha-induced apoptosis is prevented by erythropoietin treatment on SH-SY5Y cells. *Experimental Cell Research* 315: 419-431

- Promega Technical Bulletin. 2009. Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay. Madison, ZDA. Promega Corporation
- Renzi, M. J., Farrell, F. X. in sod. 2002. Erythropoietin induces changes in gene expression in PC-12 cells. *Molecular Brain Research* 104: 86-95
- Richardson, H. and Kumar, S. 2002. Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *Journal of Immunological Methods* 265 (1-2): 21-38
- Roche product catalog. 2011.
http://www.roche-applied-science.com/proddata/gpip/3_5_3_21_2_11.html (5. 5. 2012)
- Rožman, P. in Jež, M. 2010. Matične celice in napredno zdravljenje (zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo) – Pojmovnik. Ljubljana, DCTIS: 90 str.
- Sakanaka, M., Wen, T. C. in sod. 1998. *In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 4635-4640
- Shein, N. A., Grigoriadis, N. in sod. 2008. Differential neuroprotective properties of endogenous and exogenous erythropoietin in a mouse model of traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 25 (2): 112-123
- Shi, C., Wu, F. in sod. 2010. Bilobalide prevents apoptosis through activation of the PI3K/Akt pathway in SH-SY5Y cells. *Apoptosis* 15: 715-727
- Sinclair, A.M., Coxon, A. in sod. 2010. Functional erythropoietin receptor is undetectable in endothelial, cardiac, neuronal, and renal cells. *Blood* 115: 4264-4272
- Sola, A., Wen, T. C. in sod. 2005. Potential for protection and repair following injury to the developing brain: a role for erythropoietin? *Pediatric Research* 57: 110R-117R
- Spitaler, M. in Cantrell, D. A. 2004. Protein kinase C and beyond. *Nature Immunology* 5 (8): 785-790
- Spivak, J. L. 2005. The anemia of cancer: death by a thousands cuts. *Nature Reviews Cancer* 5: 543-555
- Storring, P. L., Tiplady, R. J. in sod. 1998. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *British Journal of Haematology* 100 (1): 79-89

- Syed, R. S., Reid S. W. in sod. 1998. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Letters to Nature* 395: 511-516
- Štiblar Martinčič, D. 1998. Morfološke spremembe med apoptozo. *Medicinski razgledi* 37: 191-198
- Štiblar Martinčič, D. 2005. Hematopoeza. V: Histologija. Učbenik. Petrovič, D. in Zorc, M. (ur.). Ljubljana, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani: 80
- Tanaka, J. J., Koshimura, K. in sod. 2001. Involvement of tetrahydropterin in trophic effect of erythropoietin on PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (2): 358-362
- Tanaka, J., Koshimura, K. 1997. Neuronal protection from apoptosis by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Regulatory Peptides* 72: 1-8
- Tsujimoto, Y. in Croce, C. M. 1986. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (14): 5214-5218
- Um, M., Gross, A. W. in Lodish, H. F. 2007. A "classical" homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cellular Signalling* 19: 634-645
- van der Kooij, M. A., Groenendaal, F. in sod. 2008. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in *in vitro* and *in vivo* experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Research Reviews* 59: 22-33
- Verhaegen, S. 1998. Microscopical study of cell death via apoptosis. *Europe Microscopy Analysis* 31: 3
- Viault, F. 1890. Sur l'augmentation considérable du nombre des globules rouges dans le sang chez les habitants des hauts plateaux de l'Amérique du Sud. *Comptes rendus de l'Académie des sciences Paris* 111: 917-918
- von Lindern, M., Parren-van Amelsvoort, M. in sod. 2000. Protein kinase C a controls erythropoietin receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (44): 34719-34727
- Wallner, S. F., Kurnick, J. E. in sod. 1977. Levels of erythropoietin in patients with the anemias of chronic diseases and liver failure. *American Journal of Hematology* 3: 37-44

- Wang, L., Chopp, M. in sod. 2011a. Tumor necrosis factor alpha primes cerebral endothelial cells for erythropoietin-induced angiogenesis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31: 640-647
- Wang, L., Hai-Gang, L. in sod. 2011b. Prognostic significance of erythropoietin and erythropoietin receptor in gastric adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 17 (34): 3933-3940
- Watanabe, M., Hitomi, M. in sod. 2002. The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microscopy and Microanalysis* 8 (5): 375-391
- Watanabe, W., Sudo, K. in sod. 1995. Use of lactate dehydrogenase to evaluate the anti-viral activity against influenza A virus. *Journal of Virological Methods* 51 (2-3): 185-191
- Watowich, S. S., Liu, K. D. in sod. 1999. Oligomerization and scaffolding functions of the erythropoietin receptor cytoplasmic tail. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (9): 5415-5421
- Watowich, S. S., Hilton, D. J. and Lodish, H. F. 1994. Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization. *Molecular and Cellular Biology* 14 (6): 3535-3549
- Wei, L., Han, B. H. in sod. 2006. Cell death mechanism and protective effect of erythropoietin after focal ischemia in the whisker-barrel cortex of neonatal rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317: 109-116
- Wenker, S. D., Chamorro, M. E. in sod. 2010. Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 110: 151-161
- Witthuhn, B. A., Quelle, F. W. in sod. 1993. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74: 227-236
- Wojchowski, D. M., Gregory, R. C. in sod. 1999. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Experimental Cell Research* 253: 143-156
- Wrighton, N. C., Farrel, F. X. in sod. 1996. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 273: 458-464
- Wu, Y., Shang, Y. in sod. 2007. Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3 β /caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis* 12: 1365-1375

- Yuste, V. J., Sánchez-López, I. in sod. 2002. The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by BclxL, but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry* 80 (1): 126-139
- Zhao, Y. in Rempe, D. A. 2011. Prophylactic neuroprotection against stroke: low-dose, prolonged treatment with deferoxamine or deferasirox establishes prolonged neuroprotection independent of HIF-1 function. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31 (6): 1412-1423
- Zhi-Kun, S., Hong-Qi, Y. in sod. 2012. Erythropoietin prevents PC12 cells from betaamyloid-induced apoptosis via PI3K/Akt pathway. *Translational Neurodegeneration* 2012: 1-7

ZAHVALA

Hvala mentorju prof. dr. Radovanu Komelu za odlično ponujeno priložnost.

Iskrena hvala somentorici asist. dr. Tadeji Režen za vpeljavo v laboratorijski svet, za usmerjanje dela in potrpežljive odgovore na vsa vprašanja ter za vzpodbudo v trenutkih, ko sem bila že čisto na tleh.

Hvala recenzentu za hiter in korekten pregled magistrske naloge.

Hvala doc. dr. Nataši Debeljak za podarjeni celični liniji SH-SY5Y in PC12 ter prof. dr. Janku Kosu in dr. Anji Hafner za celično linijo PC12.

Posebna zahvala Nuši Trošt za pomoč pri westernih in psihično podporo tudi v poznejših urah.

Hvala doc. dr. Klementini Fon Tacer za pomoč pri RT-PCR in Nini Trošt za začetne oligonukleotide.

Hvala tudi Heleni Klavžar in vsem ostalim iz CFGBC in MCMB za nesebično pomoč kadarkoli sem jo potrebovala.

Hvala Zali za lektoriranje naloge in vse slovnične nasvete vedno in povsod.

Hvala Studnom za ljubljansko streho nad glavo; brez tega mi do zdaj zagotovo še ne bi uspelo.

Hvala staršem, starim staršem, Nejcju in Karotu za potrpežljivost, finančno pomoč in prijeten odmik od vseh laboratorijskih težav.

In nazadnje, največja zahvala Danetu za vse. Tu mi zmanjka besed – pa saj veš ...