Sastav gangliozida u staničnim linijama glioblastoma

Vuković, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:260055

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Kristina Vuković

SASTAV GANGLIOZIDA U STANIČNIM LINIJAMA GLIOBLASTOMA

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Kristina Vuković

SASTAV GANGLIOZIDA U STANIČNIM LINIJAMA GLIOBLASTOMA

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Viljetić.

Rad ima 26 stranica, 1 tablicu i 6 slika.

Posebna zahvala mentorici doc.dr.sc. Barbari Viljetić na ogromnoj pomoći prigodom izrade ovog završnog rada.

Velika zahvala doc.dr.sc. Senki Blažetić na pomoći prigodom izrade eksperimentalnog dijela.

Hvala mojoj obitelji, Marijanu i prijateljima na podršci i ohrabrivanju.

SADRŽAJ

1. UVOD …… 1

1.1. Stanična membrana i lipidne splavi ……..... 1

1.2. Gangliozidi u lipidnim splavima ……... 2

1.3. Glioblastomi ……..... 4

2. HIPOTEZA …… 6

3. CILJEVI …….. 7

4. MATERIJALI I METODE …… 8

4.1. Materijali…… 8

4.1.1. Stanične linije…… 8

4.1.2. Kemikalije.…….. 8

4.2. Metode…… 9

4.2.1. Kultura stanica *in vitro*…….. 9

4.2.2. Ekstrakcija gangliozida i tankoslojna kromatografija…… 9

4.3.3. Imunocitokemija……... 10

5. REZULTATI …… 12

5.1. Rezultati dobiveni pomoću tankoslojne kromatografije……... 12

5.1.1. Imunocitokemija.…….. 13

6. RASPRAVA …… 17

7. ZAKLJUČAK ……... 20

8. SAŽETAK …… 21

9. SUMMARY …….. 22

10. LITERATURA …….. 23

11. ŽIVOTOPIS …… 26

POPIS KRATICA

Cy3 – cijanin (engl. *cyanine*)

CRL-1620 – stanična linija glioblastoma humanog porijekla

DAPI – 4′,6-diamidino-2-fenilindol

DMEM – Dulbecco modificirani Eagle-ov medij

GPI – glikozilfosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol*)

HPTLC – visokotlačna tankoslojna kromatografija (engl. *High-performance thin-layer chromatography)*

HTB-15 – stanična linija glioblastoma humanog porijekla

Neu3 – neuraminidaza 3

PBS – fosfatni pufer (engl. *phosphate-buffered saline*)

PDGF – trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*)

PDGFB – trombocitni faktor rasta B (engl. *platelet-derived growth factor subunit B)*

PFA – paraformaldehid

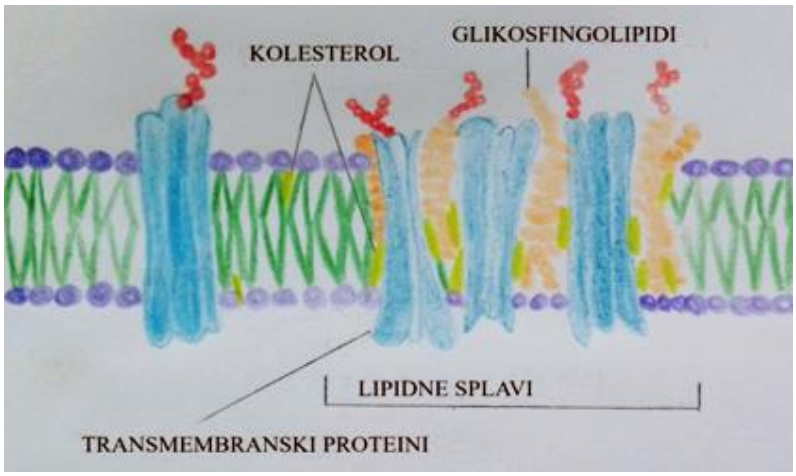
TLC – tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*)

1. UVOD

1.1 Stanična membrana i lipidne splavi

Stanična membrana je struktura koja okružuje stanicu i odjeljuje ju od izvanstaničnog prostora. Sastoji se od fosfolipidnog dvosloja koji oblikuje stabilnu barijeru između unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora te od proteina koji su uronjeni u dvosloj, a čija je uloga izvršavati specifične funkcije membrane (1, 2). Fosfolipidni dvosloj nije jednako građen u svim svojim dijelovima, što omogućava njegovu primarnu funkciju, a to je održavanje stalnog sastava stanične tekućine. Vanjski sloj čine fosfatidilkolin, sfingomijelin i glikolipidi, dok unutarnji sloj čine fosfolipidi i kolesterol (1, 3). Osim navedene, stanična membrana ima još mnogo funkcija pa je tako odgovorna za staničnu adheziju, staničnu signalizaciju te izmjenu tvari, a to sve obavljaju proteini uronjeni u njoj (1).

Unutar fosfolipidnog dvosloja mogu se pronaći dijelovi koji su manje fluidni i gušće pakirani od ostatka dvosloja te se nazivaju lipidne splavi. Lipidne splavi su visoko uređene polukrute domene čija je točka taljenja različita od ostatka fosfolipidnog dvosloja zbog čega se mogu lako detektirati odgovarajućim metodama npr. pomoću dvofotonskog mikroskopa (1). Sastoje se od sfingolipida i kolesterola u svom vanjskom dijelu, dok je unutarnji građen od kolesterola i fosfolipida (4). Uključene su u obavljanje mnogobrojnih procesa kao što su stanična signalizacija, stanična polarizacija te apoptoza (4). Lipidne splavi su također obogaćene proteinima s GPI-sidrom te dvostruko aciliranim i transmembranskim proteinima odgovornima za staničnu signalizaciju i endocitozu (1, 4) (Slika 1.1).



Slika 1.1. Građa stanične membrane. (Shema napravljena prema slici iz knjige autora Cooper GH, Hausmann RE (1)).

1.2. Gangliozidi u lipidnim splavima

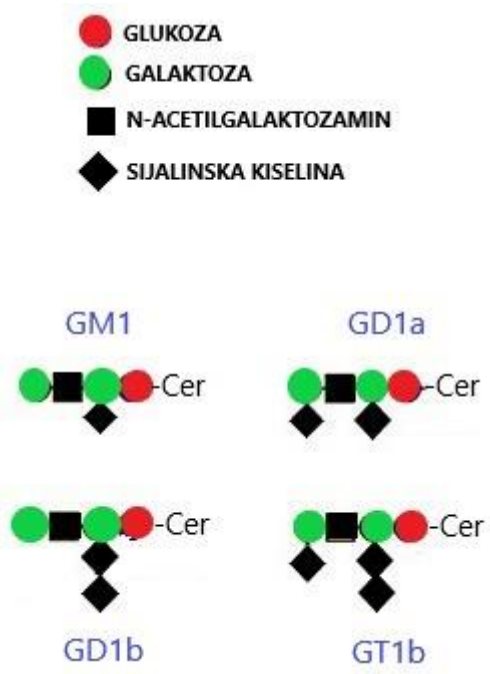
U vanjskom sloju lipidnih splavi nalaze se sfingolipidi čiji je hidrofobni dio građen od sfingozina acetiliranog masnom kiselinom pri čemu nastaje ceramid (5). Na ceramid mogu biti vezani lanci različite kemijske strukture, a ukoliko je riječ o šećernom lancu, odnosno oligosaharidu, tada se struktura naziva glikosfingolipid (5). Među glikosfingolipidima koji grade lipidne splavi, najvažniji su gangliozidi, molekule koje u svojoj strukturi sadrže jednu ili više sijalinskih kiselina (6). Zahvaljujući različitim oligosaharidnim lancima koji se mogu vezati na ceramid, ali i razlikama u lipidnom dijelu, gangliozidi su zapravo velika obitelj s preko stotinu različitih molekula (7).

Danas je prihvaćena nomenklatura gangliozida po Larsu Svennerholmu (8) prema kojoj se riječ „gangliozid“ označava slovom „G“, zatim slijedi broj sijalinskih kiselina koji se označava slovom „M“ (mono, jedan), „D“ (di, dva), „T“ (tri), „Q“ (tetra, četiri), „P“ (penta, pet). Nakon toga dolazi broj koji označava duljinu ugljikohidratnog lanca i to tako da se od broja pet oduzme stvarni broj šećera u lancu (npr. GM2 ima tri šećerna ostatka), dok se malim slovima označava broj sijalinskih kiselina vezanih na galaktozu i to tako da slovo „a“ predstavlja jednu sijalinsku kiselinu, slovo „b“ predstavlja dvije sijalinske kiseline, slovo „c“ tri ili više, a ukoliko nema sijalinskih kiselina, to se označava slovom „o“ (8, 9).
Gangliozidi se sintetiziraju najprije u endoplazmatskom retikulumu gdje nastaje ceramid koji čini lipidni dio, a potom se obrađuju u Golgijevom aparatu dodavanjem glukoze, galaktoze, sijalinske kiseline i N-acetilgalaktozamina na ceramid posredovanjem enzima glikoziltransferaza (10).

Razgradnja gangliozida odvija se u endosomima i lizosomima nakon što dijelovi stanične membrane dospiju endocitozom u intraendosomski i intralizosomski prostor (11). Taj proces zahtijeva prisutnost glikozidaza, odgovarajući pH te proteine odgovorne za transport (12). Prvi korak je uklanjanje monosaharida pomoću glikozidaza i upravo zbog defekta u tom dijelu razgradnje može doći do nastanka mnogobrojnih bolesti (11). Primjerice, Tay-Sachsova i Sandhoffova bolest nastaju zbog nakupljanja gangliozida GM2 uslijed nedostatka enzima heksozaminidaze. Osobe oboljele od navedenih bolesti zbog nakupljanja GM2 umiru u ranom djetinjstvu (13). Razgraditi ih može i gangliozid-specifična sijalidaza Neu3 smještena na staničnoj membrani počevši najprije od uklanjanja sijalinske kiseline (14).

Gangliozidi su najzastupljeniji u mozgu, osobito u sivoj moždanoj tvari gdje su neophodni za normalnu funkciju živčane stanice. U relativno visokim koncentracijama pronađeni su još i u koštanoj srži, eritrocitima, probavnom sustavu, jetri, testisima, bubrezima

i embrionalnim matičnim stanicama (11). U odraslom mozgu su najzastupljenija četiri kompleksna gangliozida - GM1, GD1a, GD1b i GT1b (6) (Slika 1.2), iako se odnos i sastav gangliozida mijenja tijekom razvoja mozga.



Slika 1.2. Prikaz strukture četiri najčešća gangliozida u mozgu. (Shema napravljena prema slici iz članka autora Sturgill ER. i sur. (15)).

Dramatičan porast količine gangliozida u mozgu odvija se tijekom prvih pet godina života kada je zapravo i najaktivniji period mijelinizacije (16). Kako se mozak razvija, tako se i obrazac pojavljivanja gangliozida mijenja, od jednostavnijih struktura kao što su GM3 i GD3 prema složenijima kao što su GD1a i GT1b (17).

GM1 je monosijalinski gangliozid koji je esencijalna komponenta lipidnih splavi i ima ulogu u regulaciji stanične interakcije, održavanju vijabilnosti živčanih stanica, regulaciji Na^+ kanala, te u kombinaciji s GD1a održavanje homeostaze Ca^{2+} u živčanim stanicama (18, 19). Oba su uključena u oblikovanje i stabilizaciju sinapsi, te su vrlo bitni u procesu pamćenja (20). GD1b i GT1b su vrlo bitni za neurogenezu, neuritogenezu, ali su karakteristični za zrele neurone koji s vremenom propadaju te samim time njihova se količina smanjuje tijekom starenja (21, 22). U procesima gliogeneze i mijelinizacije, uz GM1, bitan je i GM4 (21, 22).
Kolika je uistinu važnost gangliozida za normalnu funkciju i integritet živčanog sustava, pokazale su studije na genetički izmijenjenim miševima koji su imali nedostatke određenih vrsta gangliozida, a samim time i određeni nesklad u moždanoj funkciji (23). Zahvaljujući

istraživanju u kojem su analizirani gangliozidi u genetički izmijenjenih miševa, pokazana je disfunkcija lipidnih splavi koja je rezultirala upalnim reakcijama, a naposljetku i neurodegeneracijom (24). Narušen odnos gangliozida se odražava u poremećaju sastava lipidnih splavi, zatim stanične membrane, a samim time i stanice u cijelosti što rezultira mnogobrojnim bolestima.

1.3. Glioblastomi

U skupinu različitih bolesti koje uzrokuju promijenjeni gangliozidi pripadaju i glioblastomi (25). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO) spadaju u skupinu IV astrocitoma kao najagresivniji i najčešći tipovi glioma (26). Glioblastomi su najmaligniji tumori mozga čije je liječenje iznimno teško, a ukoliko se uspije izliječiti obično dolazi do reaktivacije tumora (27). Njihova patogeneza je vrlo složena, odnosno postoji veliki broj putova nastanka glioblastoma. Razvijaju se iz glija stanica koje su uz neurone najbrojnije stanice živčanog sustava. Glija stanice se mogu podijeliti u nekoliko podskupina:mikroglija, astrociti, oligodendrociti i ependimske stanice u središnjem živčanom sustavu te satelitne i Schwannove stanice u perifernom živčanom sustavu (28, 29). Njihova uloga je stvaranje ionskog okruženja neurona, moduliranje brzine prijenosa živčanog signala, omogućavanje popravka nakon neuralne ozljede, zaštita neurona kao i formiranje mijelina (29). Poremećaj njihove strukture i djelovanja vodi nastanku glioma, čija su podskupina i glioblastomi.

Sposobnost metastaziranja tumorskih stanica kontroliraju brojni čimbenici od kojih mnogi djeluju na staničnoj površini. Među najvažnijima je visoka ekspresija određenih glikosfingolipida, posebice gangliozida (30). Usporedbom sastava gangliozida u mozgu zdrave i u mozgu oboljele osobe mogu se vidjeti određene promjene. Naime, kod oboljele osobe ukupna količina gangliozida smanjuje se pet puta, a istovremeno pojedinačni gangliozidi postaju zastupljeniji u odnosu na zdravu osobu (25). Umjesto četiri kompleksna gangliozida, u glioblastomu najzastupljeniji postaje GD3,a odmah za njim i GD2 i GM3 (25). GD3 i GD2 su visoko eksprimirani u ranim razvojnim stadijima te su u odraslom mozgu prisutni u minimalnim količinama (31). Osim ove promjene u ekspresiji gangliozida, mogu se uočiti i promjene u strukturi ceramida, gdje su pronađene masne kiseline koje su imale od šesnaest do dvadeset i četiri C-atoma za razliku od zdravih ljudi gdje su pronađene uglavnom masne kiseline od osamnaest C-atoma vezane na ceramid (25). Nadalje, zbog poremećene glikozilacije glikosfingolipida, odnosno gangliozida, dolazi do promjene stanične površine, odnosno glikokaliksa te takva stanica prelazi u tumorsku stanicu sa sposobnošću

metastaziranja, migracije i invazivnosti (32). Kao baza za nastanak glioblastoma pokazala se promjena upravo u glikosfingolipidima, pri čemu se mijenjaju mikrodomene nazvane glikosinapse vrlo bitne u prepoznavanju stanica i adheziji (30). Istraživanje astrocita s nedostatkom p53 je pokazalo da je nastanak i invazivnost tumora niskog stupnja posredovana interakcijama povećane koncentracije GD3, α receptora trombocitnog faktora rasta i Yes kinaze (33). Prijelaz tumora niskog stupnja na tumor visokog stupnja povezan je s poremećajima RB, p16/CDKNαA i 19q tumor supresorskim genima (34).

2. HIPOTEZA

Fenotipski različite stanične linije istog (glioblastomskog) porijekla imat će različit sastav gangliozida.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

- odrediti ukupni sastav gangliozida u staničnim linijama glioblastoma
- odrediti udio kompleksnih gangliozida čija je uloga organiziranje lipidnih splavi odgovornih za iskorištavanje metaboličke energije te preživljavanje stanica

4. MATERIJALI I METODE

Rad je napravljen u sklopu projekata *Promjene u sastavu gangliozida utječu na promjene u sastavu lipidnih splavi glia stanica što dovodi do fenotipskih promjena i progresije tumora* (VIF2016-MEFOS-39) te *Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi* (IP-09-2014-2324).

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Stanične linije

Za potrebe ovog istraživanja korištene su dvije tumorske, adherentne stanične linije glioblastoma humanog porijekla. Korištene su stanične linije CRL-1620 i HTB-15 iz kojih su izolirani ukupni gangliozidi i na kojima je napravljena imunocitokemija. Za istraživanje je predviđena stanična linija glioblastoma XF 498, međutim zbog određenih tehničkih razloga, odnosno problema sa uzgojem stanica, ta je linija zamijenjena sa HTB-15.

4.1.2. Kemikalije

- Dulbecco modificirani Eagle-ov medij (DMEM) (Lonza, Basel, Switzerland)
- Fetalni goveđi serum (FBS) (GIBCO Invitrogen, Paisley, UK)
- Penicilin-Streptomicin 100x (GIBCO Invitrogen, Paisley, UK)
- L-glutamin 200 mM (GIBCO Invitrogen,Paisley, UK)
- PBS:
    - NaCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA),
    - KCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA),
    - $Na_2HPO_4x7H_2O$ (Sigma − Aldrich, St. Louis, MO, USA),
    - KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- kloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ploča za tankoslojnu kromatografiju (TLC ploča) (Aldrich, Milwaukee, WI, USA)
- poli-L-lizin (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- paraformaldehid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- goveđi serum (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)

- kozji serum (Gibco, Invitrogen Auckland, NZ)
- primarna protutijela na kompleksne gangliozide (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) te na gangliozid GD3, mišji monoklonalni IgG (protutijela su poklon prof. dr. sc. Ronalda L. Schnaara, The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MA, USA)
- sekundarno protutijelo: kozje anti-mišji IgG konjugirano sa Cy3 (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD)
- DAPI (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- VectaShield pokrivalo (VectorLab, Burlingame, CA, USA)

4.2. METODE

4.2.1. Kultura stanica *in vitro*

Kultura stanica je proces u kojem se uzgajaju stanice koje rastu u strogo kontroliranim i sterilnim uvjetima. Za uzgajanje stanica korištene su Petrijeve posude promjera 100 mm (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) prilagođene uzgoju stanica koje adheriraju na podlogu. Kao hrana za stanice korišten je DMEM medij koji sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS-a), 2mM L-glutamina te 100 U/0,1 mg penicilin/streptomicin antibiotika kako bi se spriječilo moguće zagađenje stanične kulture. Kultivacija stanica odvijala se u CO_2 inkubatoru (HeraCell, Termo FisherScientific, Waltham, MA, USA) pri temperaturi od 37 °C i atmosferi od 5% CO_2 zasićenoj vlagom. Stanice su svakodnevno provjeravane pomoću invertnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, Germany) te im je mijenjan medij svaka 3 dana.

4.2.2. Ekstrakcija gangliozida i tankoslojna kromatografija

Za ekstrakciju ukupnih gangliozida stanice su uzgajane u 3 Petrijeve posude promjera 100 mm. Kada su stanice dosegle maksimalnu konfluentnost, postrugane su u medij te centrifugirane. Medij iznad taloga stanica je uklonjen, a talog je ispran hladnim 1xPBS-om. Nakon još jednog centrifugiranja pročišćeni talog stanica je smrznut i pohranjen na -20 °C do postupka izolacije gangliozida. Ukupni gangliozidi izolirani su modificiranom metodom po Svennerholmu pomoću organskih otapala kloroforma i metanola te vode (C:M:W, 4:8:3) (8). Prvi korak bio je dodavanje ledeno hladne vode kako bi se dobio vodeni homogenat koji je zatim stavljen u sonifikator kako bi se stanice lizirale. Nakon toga je u lizirane stanice dodan metanol te su uzorci dobro promiješani sve dok se sadržaj u tubicama nije homogenizirao.

Sljedeći korak je bio dodavanje kloroforma, a kako su njegove pare toksične, to je napravljeno u digestoru. Uzorci su ponovno promiješani kako bi se sadržaj homogenizirao. Nakon toga su uzorci centrifugirani na 5000 rpm tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja faze su se razdvojile (Slika 4.1). U gornjoj fazi nalazili su se gangliozidi te je zato gornja faza otpipetirana u nove tubice. Tako dobiveni uzorci su preko noći ostavljeni kako bi se uparili.



Slika 4.1. Razdvajanje dviju faza nakon centrifugiranja.

Nakon uparavanja, gangliozidi su otopljeni u otapalu kloroforma i metanola (C:M, 2:1). Sljedeći korak bio je nanošenje uzoraka (3µl) na ploču za tankoslojnu kromatografiju 1,5 cm od donjeg ruba ploče zajedno sa standardom. Prije nanošenja uzoraka, ploču za tankoslojnu kromatografiju bilo je potrebno aktivirati tijekom 10 minuta na 100 ^{o}C. Uzorci su nanošeni na ploču u međusobnom razmaku 6-8 mm. Ploča je uronjena u kromatografsko otapalo koje se sastoji od kloroforma, metanola i 0,2% $CaCl_2$ (C:M:0,2% $CaCl_2$,50:42:11) dubine 1 cm u zatvorenom spremniku na sobnoj temperaturi. Nakon toga ploča je dobro osušena, a kako bi se detektirali gangliozidi, poprskana je Svennerholmovim reagensom te zatim zagrijana u pećnici tijekom 10 minuta na 120^{o}C.

4.2.3. Imunocitokemija

Postupak imunocitokemije napravljen je na plastičnim pokrovnicama koje su tretirane poli-L-lizinom 1 sat na 37^{o}C, zatim isprane 3 puta vodom te ostavljene pod UV svjetlom

preko noći. Nakon toga su na tako pripremljene pokrovnice nasađene stanice i ostavljene preko noći u inkubatoru. Stanice su fiksirane pomoću 4% PFA 1 sat na sobnoj temperaturi, zatim isprane 3 puta u PBS-u te stavljene u otopinu za blokiranje (1% goveđi serum i 5% kozji serum u 1xPBS-u) kako bi se blokirale nespecifične reakcije u trajanju od 2 sata na +4^{o}C. Stanice su potom inkubirane u primarnim protutijelima na gangliozide 2 sata na +4^{o}C. Protutijela su pripremljena u otopini za blokiranje u razrjeđenjima: GM11:1000, GD1a 1:10000, GD1b 1:10000, GT1b 1:3000 te GD3 1:3000. Nakon toga su isprana 3 puta u 1xPBS-u i inkubirana u flourescentno označenom sekundarnom protutijelu - kozji anti-mišji IgG konjugiran sa Cy3 1 sat na +4^{o}C. Nakon još jednog seta ispiranja, stanice su inkubirane u DAPI-u 5 minuta na sobnoj temperaturi. DAPI ili 4,6-diamino-2-fenilindol je flourescentna boja koja se čvrsto veže za regije bogate adeninom i timinom u molekuli DNA te na taj način detektiramo jezgre stanica. Nakon DAPI-a stanice su ponovno isprane s PBS-om, stavljene na predmetna stakalca i pokrivene sa pokrivalom VectaShield.

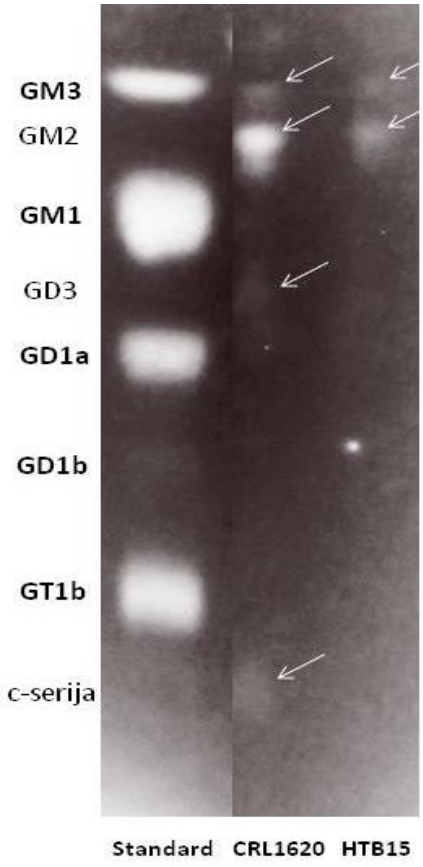
Nakon imunocitokemije preparati su mikroskopirani pomoću fluorescentnog mikroskopa (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) te slikani kamerom *Olympus DP70* (Olympus DP70, OpticalOlympus, Japan) koja je montirana na mikroskop. Slike su analizirane i složene pomoću računalnog programa *CorelDraw X3* (Corel Corporation, Ottawa, Canada).

5. REZULTATI

Za izolaciju i proučavanje gangliozida u staničnim linijama glioblastoma humanog porijekla CRL-1620 i HTB-15 korištene su metode ekstrakcije gangliozida pomoću organskih otapala i tankoslojna kromatografija te imunocitokemija pomoću visoko specifičnih monoklonskih protutijela na gangliozide i flourescetna mikroskopija.

5.1. Rezultati dobiveni pomoću tankoslojne kromatografije

Nakon ekstrakcije ukupnih gangliozida iz dvije stanične linije glioblastoma CRL-1620 i HTB-15 napravljena je tankoslojna kromatografija koja je prikazana na slici 5.1.



Slika 5.1. Tankoslojna kromatografija gangliozida izoliranih iz dvije stanične linije glioblastoma CRL-1620 i HTB-15.

U staničnoj liniji glioblastoma CRL-1620 izolirani su gangliozidi GM3, GM2, GD3 te gangliozidi c-serije označeni strjelicama. Od navedenih najviše je prisutan GM2 što se vidi

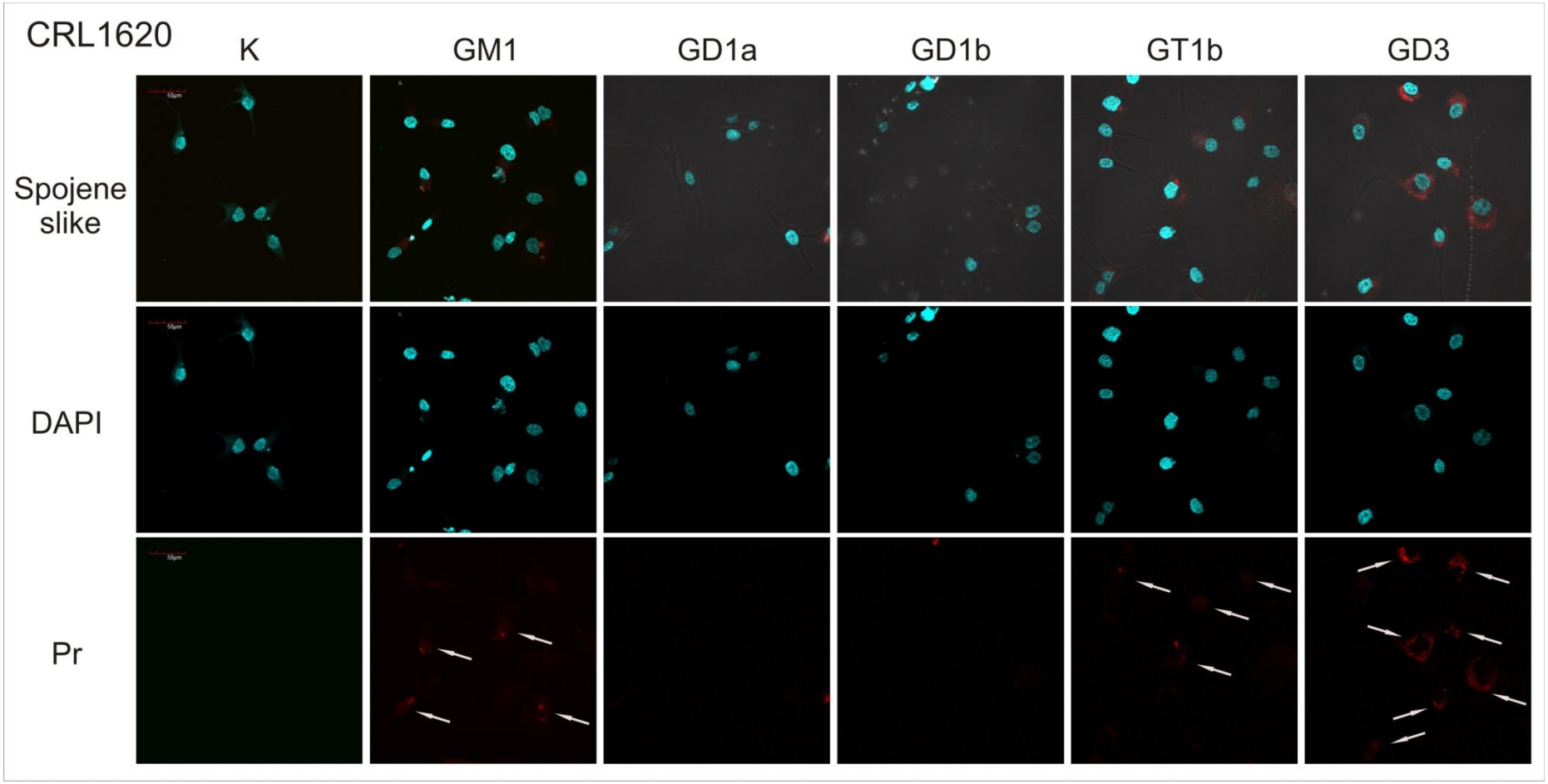
kao najjače obojanje. U staničnoj liniji glioblastoma HTB-15 izolirani su GM3 i GM2, jednako slabo zastupljeni.

5.1.1. Imunocitokemija

Kako bismo potvrdili rezultate dobivene tankoslojnom kromatografijom, napravili smo i imunocitokemiju. Imunocitokemija je napravljena pomoću visoko specifičnih protutijela na gangliozide te je stoga osjetljivija metoda za analizu gangliozida u navedenim staničnim linijama glioblastoma.

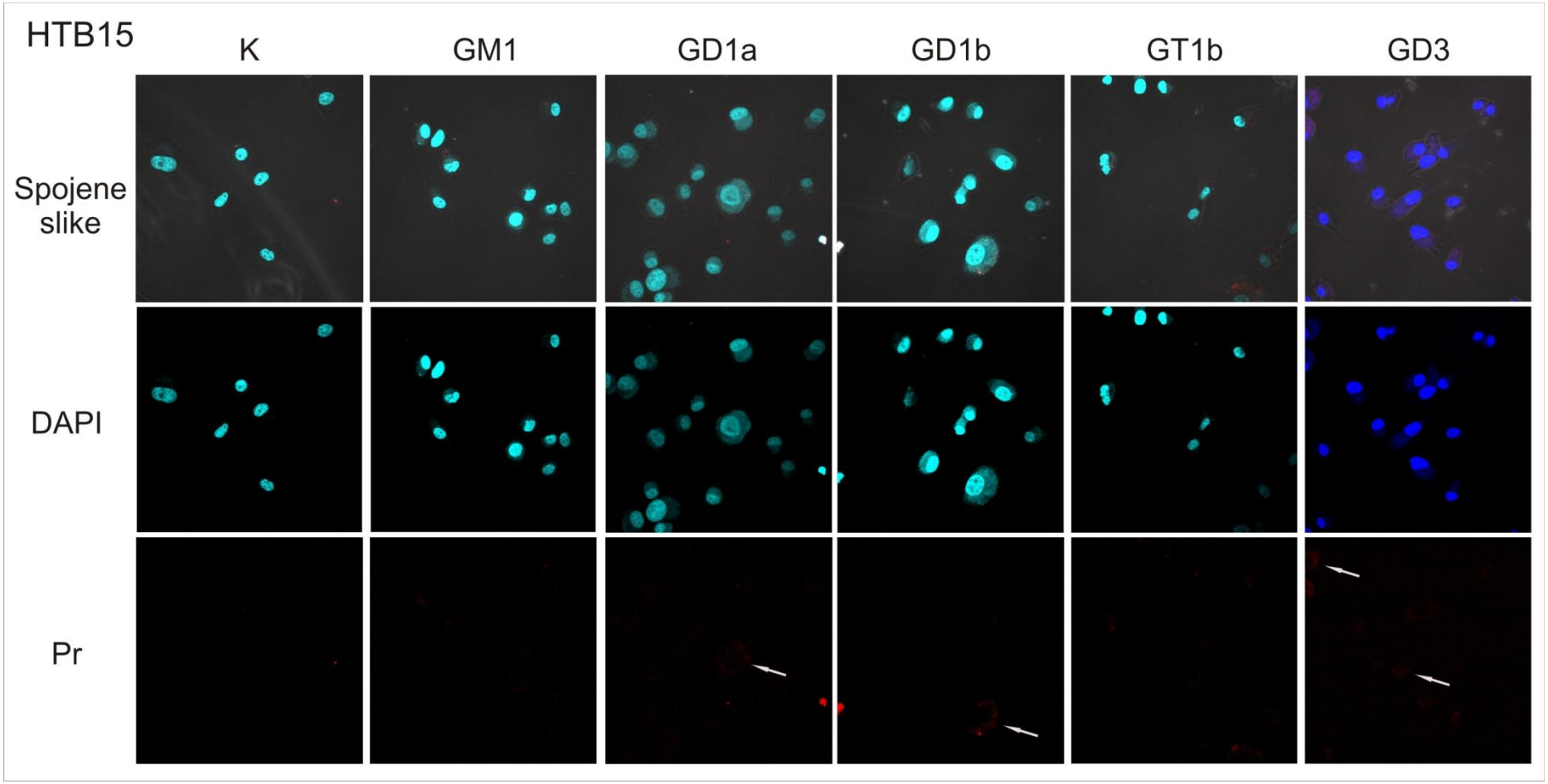
Imunocitokemijskom analizom stanične linije glioblastoma CRL-1620 utvrđena je ekspresija tri gangliozida. Najviše eksprimiran je GD3, a od kompleksnih gangliozida utvrđena je prisutnost GT1b te vrlo malo i GM1. Nespecifičnih vezanja protutijela nije bilo što je i pokazano na kontrolnim stanicama (Slika 5.2).

U staničnoj liniji HTB-15 također su detektirana tri gangliozida kao i u CRL-1620 staničnoj liniji, ali ovaj put GD1a, GD1b te GD3. S tim da su sva tri gangliozida prisutna u vrlo malim količinama što i pokazuje vrlo slabo pozitivno bojanje.



Slika 5.2. Imunocitokemijsko bojanje kompleksnih gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) te gangliozida GD3 na staničnoj liniji glioblastoma CRL-1620.

K je kontrola bez protutijela. Pr označava protutijelo. Strjelicama su označena pozitivna bojanja.



Slika 5.2. Imunocitokemijsko bojanje kompleksnih gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) te gangliozida GD3 na staničnoj liniji glioblastoma HTB-15.

K je kontrola bez protutijela. Pr označava protutijelo. Strjelicama su označena pozitivna bojanja.

Razlike u zastupljenosti gangliozida između dvije navedene stanične linije su najbolje prikazane u tablici 5.1.

Tablica 5.1. Kvalitativna analiza imunokemijskog bojanja kompleksnih gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) te gangliozida GD3 dviju staničnih linija glioblastoma CRL-1620 i HTB-15. Legenda: „+ + +“ najjače bojanje, „+ +“ srednje bojanje, „+“najslabije bojanje, „-„ nema bojanja.

GANGLIOZIDI	**CRL-1620**	**HTB-15**
GM1	**+**	**-**
GD1a	**-**	**+**
GD1b	**-**	**+**
GT1b	**+ +**	**-**
GD3	**+ + +**	**+**

6. RASPRAVA

Glioblastomi su najagresivniji tumori mozga koji nastaju kao posljedica promjena u strukturi glikosfingolipida, posebice gangliozida (26, 32). Gangliozidi sudjeluju u izgradnji gušće pakiranih i manje fluidnijih domena koje nazivamo lipidne splavi (1). Uloga lipidnih splavi je višestruka te služe za staničnu signalizaciju, staničnu polarizaciju, a važni su i u apoptozi (4). Postoji mnogo vrsta gangliozida, a u mozgu odrasle osobe najzastupljenija su četiri tipa: GM1, GD1a, GD1b i GT1b (6). Udio pojedinih gangliozida se mijenja uslijed fizioloških procesa; odrastanja i starenja, ali i kao rezultat patoloških procesa- nastanka tumora te nekih drugih bolesti.

U radu su analizirane dvije stanične linije glioblastoma; CRL-1620 i HTB-15 gdje je trebalo odrediti ukupni sastav gangliozida, te odrediti prisutne kompleksne gangliozide. Nakon obrade rezultata dobivenih pomoću tankoslojne kromatografije, a osobito pomoću imunocitokemije, uočeno je da postoji razlika između dvije navedene stanične linije glioblastoma. GM1, najčešći gangliozid u zdravom moždanom tkivu više nije najzastupljeniji gangliozid u objema staničnim linijama, što je u skladu s do sada provedenim istraživanjima. Naprtotiv, u staničnoj liniji glioblastoma HTB-15 metodom imunocitokemije gangliozid GM1 uopće nije detektiran. U istraživanju Fabris D. i sur. analizom kirurški odstranjenog tumorskog moždanog tkiva pomoću metode HPTLC-a dokazana je povećana ekspresija gangliozida GD3 i GT1b (25). Osim toga, dokazano je, uspoređujući normalno zdravo tkivo, peritumorsko i tumorsko tkivo, kako pretvorbom iz normalnog tkiva u peritumorsko i tumorsko, raste udio GD3 i GM3 (25). Spomenuti gangliozidi su metodom tankoslojne kromatografije detektirani i u našim istraživanim staničnim linijama glioblastoma. U staničnoj liniji CRL1620 je posebno eksprimiran GM2, a izolirani su još i GM3 te GD3, dok su u staničnoj liniji HTB15 podjednako eksprimirani GM3 i GM2.

GD3, gangliozid b-serije koji ima dvije sijalinske kiseline, nastaje iz svog prekursora GM3 djelovanjem enzima GD3 sintaze i njegova koncentracija korelira sa stupnjem malignosti nastalog tumora (35). Utvrđivanje postojanja povećane vrijednosti navedenog gangliozida u lipidnim splavima je iznimno važno, budući da su istraživanja pokazala kako se pomoću protutijela specifičnih za $GD3^+$ stanice (tumorske stanice) izaziva njihova smrt, što bi moglo biti ključ razvoja novih terapija protiv glioblastoma (27).

U drugom istraživanju, koje se bavilo proučavanjem Neu3 sijalidaze bitne u razgradnji gangliozda, utvrđeno je kako poremećaj djelovanja enzima Neu3 sijalidaze dovodi do nakupljanja GM3, stvarajući uvjete u stanici koji joj omogućavaju abnormalnu pokretljivost i

invaziju te se iz tog razloga mogu pronaći povećane količine GM3 i GD3 u tumorskim stanicama (36). Osim navedenih, postoje mnoga istraživanja koja su dokazala povećanu ekspresiju GM3 i GD3 u glioblastomima bez obzira na put njihova nastanka. Tako su Ohkawa Y. i sur. u svom istraživanju, proučavajući astrocite s nedostatkom p53 u koje su postupkom transfekcije ugradili vektor s onkogenim genom koji kodira PDGFB (trombocitni faktor rasta B), dokazali povećanu ekspresiju gangliozida GD3 (33). PDGF (trombocitnim faktorom rasta posredovan put) put nastanka glioblastoma podrazumijeva povećano stvaranje gangliozda GD3 pod utjecajem PDGFB, zbog čega nastaje α receptor trombocitnog faktora rasta. Gangliozid GD3 tada stvara kompleks s α receptorom trombocitnog faktora rasta, a to stanici omogućava staničnu proliferaciju i invazivnost (33).

Kao što je i očekivano, u staničnim linijama CRL-1620 i HTB-15 analiziranih metodom imunocitokemije došlo je do porasta količine GD3 gangliozida, osobito u CRL-1620 staničnoj liniji gdje je GD3 najzastupljeniji gangliozid. Ostali gangliozidi; GD1a, GD1b, GT1b prema dobivenim rezultatima nisu jednako zastupljeni. Naime, u staničnoj liniji CRL-1620 od navedenih je zastupljen samo GT1b, dok su u staničnoj liniji HTB-15 zastupljeni GD1a i GD1b, ali u vrlo malim količinama. Kako su GD1a, GD1b, GT1b gangliozidi tipični za zdrava tkiva, ovakav rezultat je očekivan. Prema istraživanju Fabris D. i sur. u glioblastomima je količina ovih gangliozida manja kada se uspoređuje s normalnim tkivima, odnosno gangliozidi koji se javljaju u tumorima imaju manje sijalinskih kiselina i jednostavnije su građe (25).

Ograničenje naše studije je broj staničnih linija glioblastoma na kojima smo radili, odnosno za ovo istraživanje korištene su samo dvije stanične linije. U narednim istraživanjima bilo bi korisno povećati broj staničnih linija glioblastoma kako bi se stekao detaljniji uvid u razlike sastava gangliozida između navedenih. Osim toga, TLC se nije pokazao kao najbolji mogući izbor, budući da nije jednako osjetljiv i specifičan kao imunocitokemija, gdje smo koristili visoko specifična protutijela za gangliozide. Svakako bi bilo korisno povećati broj stanica za ekstrakciju te nakon TLC-a napraviti i dvodimenzionalni TLC. S obzirom na to da je masena spektrometrija metoda pomoću koje se dobivaju najprecizniji i najtočniji rezultati, u budućim istraživanjima bi se pomoću navedene metode mogle detektirati sve forme gangliozida koje se nalaze u stanicama.

Uzimajući u obzir rezultate navedenih radova kao i naše rezultate, može se zaključiti kako su u glioblastomima svakako najzastupljeniji i najznačajniji gangliozidi GD3, GM3 i GM2, dok se gangliozidi prisutni u zdravom tkivu kvantitativno smanjuju. Budući da dolazi do promjene u sastavu i broju gangliozida unutar lipidnih splavi, njezina stanična membrana,

a onda i sama stanica u potpunosti, više ne može obavljati normalnu funkciju zbog čega ona prelazi u tumorsku stanicu.

7. ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati dovode do sljedećih zaključaka:

- Fenotipski različite stanične linije glioblastoma imaju različit sastav gangliozida što je pokazala imunocitokemija korištenja specifičnih monoklonskih protutijela na gangliozide.
- U objema staničnim linijama glioblastoma postoji porast količine gangliozida GD3, osobito u CRL-1620 staničnoj liniji, te gangliozida GM2 i GM3 što je najvažnije obilježje tumora glioblastoma.

8. SAŽETAK

Uvod: Stanična membrana sastoji se od fosfolipidnog dvosloja koji je na pojedinim mjestima gušće pakiran i manje fluidan i takvi se dijelovi nazivaju lipidne splavi. Lipidne splavi, osim proteina, kolesterola i lipida, su građene i od gangliozida koji su zastupljeni u svim tkivima, ali su najbrojniji u mozgu. Njihov poremećaj dovodi do neurodegeneracije, različitih poremećaja i tumora, uključujući i najagresivnije, teško izlječive glioblastome.

Ciljevi: Odrediti ukupni sastav gangliozida te odrediti kompleksne gangliozide u staničnim linijama glioblastoma.

Materijali i metode: Za istraživanje su korištene dvije stanične linije glioblastoma (CRL-1620 i HTB-15). Nakon kultivacije iz stanica je bilo potrebno ekstrahirati gangliozide. Potom su ukupni gangliozidi analizirani metodom TLC-a. Kako bi se odredili prisutni gangliozidi, napravljena je imunokemijska analiza stanica pomoću visokospecifičnih, mišjih monoklonskih IgG protutijela. Dobiveni rezultati su analizirani flourescentnim mikroskopom, slikani kamerom, a slike su potom složene pomoću računalnog programa *CorelDraw X3*.

Rezultati: Razlika u sastavu gangliozida dobivenih metodom imunocitokemije između dvije stanične linije postoji. U staničnoj liniji glioblastoma CRL-1620 najzastupljeniji je GD3, dok su u staničnoj liniji glioblastoma HTB-15 jednako slabo zastupljeni GD1a, GD1b i GD3. Pomoću TLC-a su detektirani GM3 i GM2 u obje stanične linije te GD3 u staničnoj liniji glioblastoma CRL-1620.

Zaključak: Fenotipski različite stanične linije glioblastoma imaju različit sastav gangliozida, no kod obje analizirane linije kompleksni gangliozidi su zastupljeni u vrlo malim količinama ili ih uopće nema. Najvažniji gangliozidi koji su pojačano eksprimirani su GD3, GM2 i GM3.

Ključne riječi: gangliozidi; lipidne splavi; stanična linija glioblastoma; stanična membrana

9. SUMMARY

GANGLIOSIDE COMPOSITION IN GLIOBLASTOMA CELL LINES

Introduction: Cell membrane consists of phospholipid double layer that is thicker packed and less fluid in some places. These parts are called lipid rafts. Lipid rafts, except proteins, cholesterol and lipids, are built of gangliosides which are present in all tissues, but they are the most numerous in the brain. Their disorder leads to neurodegeneration, various disorders and tumors, including the most agressive, hard to cure, glioblastoma.

Goals: To determine the total composition of gangliosides and to determine present complex gangliosides in glioblastoma cell lines.

Materials and methods: For this study two glioblastoma cell lines (CRL-1620 i HTB-15) were used. After cultivation, it was needed to extract gangliosides from the cells. Then the total gangliosides were analysed using the TLC method. In order to determine present gangliosides, immunochemical analysis of the cells is made using highly specific, mouse monoclonal IgG antibodies. The results were then analyzed using a flourescent microscope and were photographed by camera. The created images were made in computer program *CorelDraw X3*.

Results: The difference between two (glioblastoma)* cell lines in composition of gangliosides obtained by the method immunocytochemistry is present. In glioblastoma cell line CRL-1620 the most abundant ganglioside is GD3, while in glioblastoma cell line HTB-15 are equally poorly presented GD1a, GD1b and GD3. Using the TLC are detected GM3 and GM2 in both cell lines and GD3 in glioblastoma cell line CRL-1620.

Conclusion: Phenotypically different glioblastoma cell lines differ in the composition of gangliosides, but in both analyzed cell lines complex gangliosides are present in very small amounts on none at all. The most important gangliosides that are overexpressed are GD3, GM2 and GM3.

Keywords: gangliosides; lipid ratfs; glioblastoma cell lines; cell membrane

10. LITERATURA

1. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
2. Vega- Cabrera LA, Pardo- Lopez L. Membrane remodeling and organization: Elements common to prokaryotes and eukaryotes. IUBMB Life. 2017;69(2):55-62.
3. Yang NJ, Hinner MJ. Getting Across the Cell Membrane: An overview for Small Molecules, Peptides and Proteins. Methods Mol Biol. 2015;1266:29-53.
4. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. J Clin Invest. 2002;110:597-603.
5. D'auria L, Bongarzone ER. The fluid levity of the Cell: The role of membrane lipid architecture in genetic sphingolipidoses. J Neurosci Res. 2016;94(11):1019-1024.
6. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa T. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides—An overview. J Oleo Sci. 2011;60(10):537-544.
7. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. Glycobiology. 2006;17(1):1R-13R.
8. Svennerholm L. Ganglioside designation. Adv. Exp. Med. Biol. 1980;125:11.
9. Lauc G, Heffer-Lauc M. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol- anchored proteins. Biochim Biophys Acta. 2006;1760(4):584- 602.
10. Maccioni HJ. Glycosylation of glycolipids in the Golgi complex. J Neurochem. 2007;103:81-90.
11. Kolter T. Ganglioside biochemistry. ISRN Biochem. 2012;103(1):81-90.
12. Kolter T, Sandhoff K. Lysosomal degradation of membrane lipids. FEBS Lett. 2010;584:1700-1712.
13. Zhang X, Kiechle FL. Glycosphingolipids in Health and Disease. Ann Clin Lab Sci. 2004;34(1):3-13.
14. Wang Y, Yamaguchi K, Wada T, Hata K, Zhao X, Fujimoto T, i sur. A close Association of the Ganglioside- specific Sialidase Neu3 with Caveolinin Membrane Microdomains. J Biol Chem. 2002;277:26252-26259.
15. Sturgill ER, Aoki K, Lopez PHH, Colacurcio P, Vajn K, Lorenzini I, i sur. Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. Glycobiology. 2012;22(10):1289-1301.
16. Kinney HC. Human myelination and perinatal white matter disorders. J Neurol Sci. 2005;228:190-192.

17. Yu RK, Tsai YT, Ariga T. Functional roles of gangliosides in neurodevelopment—An overview of recent advances. Neurochem Res. 2012;37(6):1230-1244.
18. Bisel B, Pavone FS, Calamai M. GM1 and GM2 gangliosides: recent developments. Biomol Concepts. 2014;5(1):87-93.
19. Ledeen RW, Wu G. Nuclearsphingolipids: metabolism and signaling. J Lipid Res. 2008;49(6):1176-1186.
20. Rahmann H. Brain gangliosides and memory formation. Behav Brain Res. 1995;66:105-116.
21. Kracun I, Rosner H, Drnovsek V, Heffer-Lauc M, Cosovic C, Lauc G. Human brain gangliosides in development, aging and disease. Int J Dev Biol. 1991;35:289-295.
22. Rösner H. Developmental expression and possible roles of gangliosides in brain development. Prog. Mol. Subcell. Biol. 2003;32:49-73.
23. Palmano K, Rowan A, Guillermo R, Guan J, McJarrow P. The Role of Gangliosides in Neurodevelopment. Nutrients. 2015;7:3891-3913.
24. Furukawa K, Ohmi Y, Tajima O, Ohkawa Y, Kondo Y, Shuting J, i sur. Gangliosides in Inflammation and Neurodegeneration. Prog Mol Biol Transl Sci. 2018;156:265-287.
25. Fabris D, Rožman M, Sajko T, Vukelić Ž. Aberrant ganglioside composition in glioblastoma multiforme and peritumora ltissue: A mass spectrometry characterization. Biochimie. 2017;137:56-68.
26. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Diemling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, i sur. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. 2016;131(6):803-20.
27. Yeh SC, Wang PY, Lou YW, Khoo KH, Hsiao M, Hsu TL, i sur. Glycolipid GD3 and GD3 synthase are key drivers for glioblastoma stem cells and tumorigenicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(20):5592-5597.
28. Jäkel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. Front Cell Neurosci. 2017;11:24.
29. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, i sur. Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.
30. Hakomori S. Tumor Malignancy Defined by Abberant Glycosylation and Sphingo(glyco)lipid Metabolism. Cancer Res. 1996;56:5309-5318.
31. Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. J Lipid Res. 2009;50(Suppl):S440-S445.

32. Prinetti A, Prioni S, Loberto N, Aureli M, Nocco V, Illuzzi G, i sur. Aberrant glycosphingolipid expression and membrane organizationin tumor cells: consequences on tumor-host interactions. Adv Exp Med Biol. 2011;705:643-67.
33. Ohkawa Y, Momota H, Kato A, Hashimoto N, Tsuda Y, Kontani N, i sur. GD3 Enhances Invasiveness of Gliomas by Forming a Complex with Platelet-derived Growth Factor Receptor α and Yes Kinase. J Biol Chem. 2015;290(26):16043-58.
34. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. Annu Rev Pathol. 2006;1:97-117.
35. Rückhaberle E, Karn T, Rody A, Hanker L, Gätje R, Metzler D, i sur. Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2009;135(8):1005-13.
36. Takahashi K, Proshin S, Yamaguchi K, Yamashita Y, Katakura R, Yamamoto K, i sur. Sialidase NEU3 defines invasive potential of human glioblastoma cells by regulating calpain- mediated proteolysis of focal adhesion proteins. Biochim Biophys Acta. 2017;1861(11Pt A):2778-2788.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Kristina Vuković

Datum i mjesto rođenja:

15. travnja 1996., Vinkovci

Obrazovanje:

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

2011. – 2015. Opća gimnazija, Školski centar fra Martina Nedića Orašje

2003. – 2011. Osnovna škola Ruđera Boškovića u Donjoj Mahali