

SPOLNO SPECIFIČNO ZNOTRAJCELIČNO SPOROČANJE V MATIČNIH CELICAH SAMCEV IN SAMIC PSOV PO AKTIVACIJI INZULINSKEGA RECEPTORJA S POMOČJO METODE BRET²

Kaja Blagotinšek^{1,2#}, Eva Knuplež^{1,3#}, Milka Vrecl¹, Luka Mohorič^{1,4}, Gregor Majdič^{1,4}, Katerina Čeh^{1,4},
Valentina Kubale Dvojmoč^{1*}

¹Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, ²CFGBC, Medicinska fakulteta, ³Fakulteta za farmacijo, ⁴Animal d.o.o.,
Ljubljana, Slovenija

#obe avtorici sta enakovredno prispevali in si delita prvo avtorstvo

valentina.kubaledvojmoč@vf.uni-lj.si

Zdravljenje sklepnih obolenj živali z matičnimi celicami smo med prvimi v klinično prakso uvedli na Veterinarski fakulteti v Ljubljani. V okviru evropskega projekta smo proučevali spolni dimorfizem matičnih celic psov, pridobljenih iz maščobnega tkiva, predvsem morebitne razlike v znotrajceličnem sporočanju po aktivaciji inzulinskega receptorja (IR) *in vitro*. Za prikaz razlik v interakciji z β -arestinom 2 (β -arr2) po aktivaciji IR z inzulinom smo uporabili metodo bioluminiscenčnega prenosa resonančne energije (BRET²). Rezultati so pokazali, da je pri samicah vidna bistveno višja razlika v odzivu po stimulaciji z agonistom. Potrditev različne aktivacije inzulinskega receptorja v celicah samcev in samic, je pomembna za razumevanje bolezni, kot sta debelost in sladkorna bolezen. Razumevanje spolnega dimorfizma nam v prihodnosti lahko omogoča razvoj glede na spol usmerjene terapije.

Ključne besede: matične celice; BRET²; spolni dimorfizem

Uvod

Matične celice so celice, ki se lahko razvijejo v različne telesne celice. Tekom embrionalnega razvoja so ključnega pomena za normalen razvoj različnih tkiv in organov, medtem ko imajo v odrasli dobi vlogo nadomeščanja poškodovanih ali odmrlih specializiranih celic. Potencial uporabe matičnih celic je velik, saj jih je možno uporabljati za preizkušanje varnosti novih zdravil in predvsem kot vir za razvoj celic ter tkiv za uporabo celične terapije. Transplantacija obolelih tkiv in organov danes omogoča nadomeščanje obolelih tkiv pri boleznih kot so osteoartritis, nevrodegenerativne bolezni, bolezni srca, sladkorna bolezen, idr. V Sloveniji je v veterinarski medicini že na voljo zdravljenje bolezni sklepov, kit in vezi psov ter konjev (1, 2).

S tehnologijo BRET preučujemo medsebojne interakcije dveh specifično označenih proteinskih partnerjev. *Renilla luciferaza* (RLuc) se uporablja kot bioluminiscentna oznaka, za fluorescentno pa služi mutanta GFP-ja EYFP ali mutantna oblika zeleno fluorescirajočega proteina GFP². V prisotnosti substrata Coeletrazina, RLuc oddaja svetlobo z vrhom pri 480 nm. Če pride do interakcije med primerno orientiranima proteinoma RLuc in EYFP pride do pojava BRET, kar vidimo kot emisijo svetlobe z vrhom pri 526 nm. Luminiscenca nastane zaradi

katalitične razgradnje substrata z luciferazo, kar omogoči ekscitacijo EYFP-ja in posledično fluorescenco. Metoda BRET je bila pred kratkim z željo po boljšem ločevanju specifičnega signala od ozadja izboljšana z razvojem druge generacije tehnologije BRET, ti. metode BRET². Pri metodi BRET² se kot donorska oznaka uporablja RLuc8, kot akceptorska oznaka pa GFP². GFP² ima prilagojen ekscitacijski spekter za to valovno dolžino (ekscitacija pri 395 nm), kar ob predpostavki, da sta fuzijska konstrukta na GFP² in RLuc8 na maksimalni razdalji 100 Å, omogoča dobro spektrofotometrično ločevanje emisije donorja (395 nm) in akceptorja (~410 nm) in tako zmanjša problem ozadja ter s tem poveča občutljivost metode (3,4).

Material in metode

Pridobivanje matičnih celic

Veterinar živali v splošni anesteziji odvzame majhen košček maščobnega tkiva, običajno na področju hrbta, v našem primeru pri psih. Iz odvzetega maščobnega tkiva se v laboratoriju osamijo mezenhimske matične celice, ki jih je potrebno namnožiti, kar običajno traja sedem do dvanajst dni. Celice se po potrebi tudi zamrznejo. Alikvote matičnih celic, ki smo jih uporabili v našem projektu, smo dobili od podjetja Animacel d.o.o. Uporabili smo celice 20 živali, 10 samcev in 10 samic. Za vsako žival smo napravili po tri ponovitve v triplikatu.

Gojenje mezenhimskih matičnih celic in celic HEK-293 in vitro

Pri delu smo uporabljali humane embrionalne ledvične celice (HEK-293) (Evropska kolekcija živalskih celičnih kultur – European Collection of Animal Cell Cultures), ki so trajna linija primarnih ledvičnih celic, transformiranih z DNA humanega adenovirusa tipa 5 (5). Celice HEK-293 smo rutinsko vzdrževali v Eaglovem mediju, modificiranem po Dulbeccu (DMEM), z 1g/L glukoze, ki smo mu dodali 10% plodovega seruma goveda (FBS), 100 I.E./ml penicilina in 100 µg/ml streptomocina, mezenhimske matične celice pa v mediju DMEM, z 4,5 g/L glukoze, ki smo mu dodali 10% FBS, 100 I.E./ml penicilina in 100 µg/ml streptomocina, 1% MEM NEAA (MEM neesencialnih aminokislin) in 1% MEM natrijevega piruvata. Matične celice in celice HEK-293 smo vzdrževali pri nadzorovani temperaturi 37 °C in navlaženi atmosferi, ki je vsebovala 5% CO₂. Celice smo dnevno opazovali pod mikroskopom; ocenili smo gostoto celic v steklenici ter preverili ali ni prišlo do mikrobne okužbe ali okužbe s plesnijo. Hranilni medij smo menjavali v 3- do 4-dnevnih presledkih oz. takrat, ko so celice dosegle 90 do 100% gostoto. Celice smo subkultivirali tako, da smo jih najprej dvakrat sprali z Dulbeccovo fiziološko raztopino v fosfatnem pufru (DPBS), nato smo jih odstranili s podlage z raztopino tripsin/EDTA. Celicam v suspenziji (odlepljenim s podlage) smo nato dodali kompletni medij (FBS inhibira delovanje tripsina) z dodatkom 1 ali 4,5 g/L glukoze, jih razbili s pipetiranjem in ustrezno količino vrnili v steklenico. Preostanek celic smo uporabili za poskuse ali pa zamrznili v alikvotih po 1 ml, v kompletnem mediju z dodatkom 8% dimetilsulfoksida (DMSO) pri -80 °C. Vsi mediji in reagenti za gojenje celic so bili od proizvajalcev Sigma-Aldrich ali GibcoBRL, če ni navedeno drugače. Plastični potrošni material za gojenje in manipulacijo celic je od proizvajalca Costar (6).

Predhodna transfekcija z Lipofectaminom 3000[®] reagentom

Predhodno transfekcijo smo izvedli na mezenhimskih matičnih celicah ter celicah HEK-293 z Lipofectaminom 3000[®] (Invitrogen Co.) po navodilih proizvajalca. Celice HEK-293 smo

uporabili kot kontrolo, saj je v njih znotrajcelično sporočanje preko IR poznano. Dan pred transfekcijo smo 1×10^6 celic prenesli v petrijevke premera 60 mm, jim dodali kompletni medij DMEM ter jih inkubirali pri standardnih pogojih. Ko so celice dosegle vsaj 90% gostoto, smo izvedli transfekcijo. Skupno količino cDNA 5,5 μ g IR v vektorju pcDNA3.1(+), označenega z RLuc8 (IR-RLuc8) ter β -arestina 2 v vektorju pcDNA3.1(+), označenega z GFP² (GFP²/ β -arr2) v razmerju 1:3 smo prenesli v 1,5 ml epruveto (Eppendorf), v katero smo dodali 250 μ L hranilnega medija za transfekcijo Optimem ter dodali 11 μ L Reagenta 3000. V drugo 1,5 ml epruveto smo dodali 250 μ L medija Optimem in 8,25 μ L Lipofectamina ter inkubirali 5 min. V naslednjem koraku smo združili raztopini iz obeh epruvet in nastalo mešanico inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Po končni inkubaciji smo mešanico prenesli na celice, s katerih smo odstranili kompletni medij in jim dodali 4,5 ml novega svežega medija.

Metoda BRET²

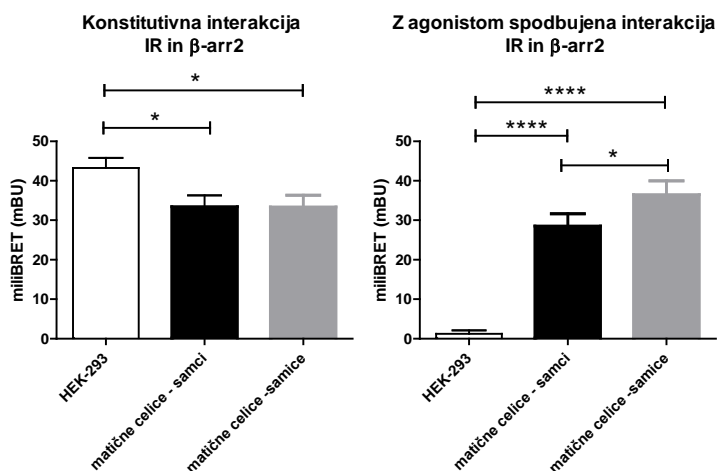
Celice smo 48 ur po transfekciji odlepili od podlage z raztopino tripsin/EDTA, sprali z DPBS, centrifugirali 5 min pri 1000 vrtljajev/min, previdno odstranili supernatant in celični pelet resuspendirali v DPBS, obogatenim s piruvatom in glukozo v gostoti 1×10^6 celic/ml. 180 ml resuspendiranih celic smo prenesli na ploščo s 96 jamicami (white 96 well Opti Plate; PerkinElmer) in celice pri sobni temperaturi tretirali z 10 μ L agonista inzulina S100 (rekombinantni humani inzulin S100; Novo Nordisk A/S). Substrat Coelentrazin 400A (Santa Cruz Biotechnology) smo dodali z avtomatskim injektorjem do končne koncentracije 5 μ M. Signal smo izmerili sekvenčno na dveh valovnih dolžinah, 410 nm in 515 nm, izračunali razmerje 515/410 ter vrednost preračunali v enote miliBRET (mBU) (BRET \times 1000) (7,8).

Statistična analiza

Pridobljene rezultate smo analizirali in statistično obdelali v programu GraphPad Prism 5.0. Za ugotavljanje razlik med kontrolnimi in matičnimi celicami pri obeh spolih ter med spoloma smo uporabili neparni Studentov t-test z dvorepo porazdelitvijo. Statistične razlike smo prikazali na grafih z različnim številom zvezdic, ki kažejo na statistično značilnost rezultatov, in sicer: * = p vrednost < 0,01; ** = p vrednost < 0,001, *** = p vrednost < 0,002 in **** = p vrednost < 0,0001.

Rezultati

Prikazani rezultati kažejo na razlike v konstitutivni in z agonistom inzulinom S100 spodbujeni interakciji med IR in β -arr2 v matičnih celicah samcev in samic psov. Dobljeni rezultati kontrolnih celic HEK-293 so primerljivi s podatki v literaturi (9), kjer je bila interakcija med IR in β -arr2 že dokazana. V primerjavi z celicami HEK-293 so bile pri matičnih celicah samcev in samic opazne primerljive značilne razlike v konstitutivni interakciji IR z β -arr2. Pri samicah je vidna značilna razlika po stimulaciji IR z agonistom na interakcijo z β -arr2 v primerjavi s samci. Interakcija pri matičnih celicah samcev in samic se značilno povišana v primerjavi s kontrolnimi HEK-293 celicami (Grafikon 1). Za potrditev vpliva te interakcije na znotrajcelično signalizacijo želimo v nadaljevanju izvesti dodatne poskuse testa aktivacije sekundarnega sporočilnega sistema, s katerimi bi potrdili ali izključili direktne, od agonista odvisne proteinsko-proteinske interakcije med IR in β -arr.



Grafikon 1: Signal BRET² po aktivaciji inzulinskega receptorja v matičnih celicah samcev in samic psov v primerjavi s kontrolnimi celicami HEK-293. Prikazane so razlike med konstitutivno interakcijo ter z agonistom spodbujeno interakcijo med IR in β -arr2 med kontrolnimi celicami HEK-293 ter v matičnih celicah samcev in samic psov. Prikazane so vrednosti reprezentativnih poskusov, ki so bili ponovljeni trikrat, meritve so bile opravljene v treh ponovitvah. *Razlika je statistično značilna pri * = p vrednost < 0,01; ** = p vrednost < 0,001, *** = p vrednost < 0,002 in **** = p vrednost < 0,0001

Razprava

Rezultati prikazujejo razliko v interakciji med IR in β -arr2 v kontrolni celični liniji HEK-293 in v matičnih celicah pridobljenih iz maščobnega tkiva samcev in samic psov brez dodatka agonista (konstitutivna interakcija) in z dodatkom agonista inzulina. Dodatek agonista inzulina je v celicah povzročil značilno višjo interakcijo med β -arr2 ter IR med kontrolnimi celicami HEK-293 ter matičnimi celicami maščobnega tkiva samcev in samic, kar vpliva na prenos signala v celico. Pri samicah je bila z agonistom spodbujena interakcija IR in β -arr2 višja kot pri samcih, kar kaže na razlike med spoloma. β - arestini so bistvene urejevalne molekule za diferenciacijo maščobnih celic, saj imajo vlogo pri prenosu znotrajceličnega signala ter razvoju in napredovanju adipogeneze (10).

Prikazane razlike lahko delno pojasnijo razlike v odzivnosti na inzulin v organizmu, saj interakcija β -arestina z IR uravnava občutljivost organizma na inzulin in posledično vpliva na razvoj debelosti in sladkorne bolezni tipa 2 (11). Rezultati sovpadajo z dosedanjimi odkritji, ki potrjujejo razlike v znotrajceličnem sporočanju med spoloma. Tako na primer razlike v znotrajceličnem sporočanju kortikotropinskega receptorja (CRF-1) vodijo v različen odziv organizma na stres pri moških in ženskah. V literaturi najdemo razlike med spoloma še pri receptorju GPR30, za katerega je značilna različna lokalizacija receptorja v celici med spoloma v srčnih mišičnih celicah, kar ima pomembno vlogo pri kardiovaskularnih obolenjih (12). Za receptor siroto GPR50, ki prav tako spada v superdružino GPCR, so pokazali spolni dimorfizem v smislu njegove vloge pri dovzetnosti za nastanek bipolarnih motenj (13). Za receptor za melanokortin tip 4 (MC4R), ki je pomembna tarča za zdravljenje metabolnih motenj, je prav tako značilen spolni dimorfizem (14). Dodatno razumevanje spolnega dimorfizma, ki je lahko vzrok različnemu poteku bolezni, nam omogoča identifikacijo ustreznih tarč za zdravljenje in v prihodnosti individualizacijo ter optimizacijo zdravljenja glede na spol osebnika, kar bi za paciente pomenilo manj neželenih učinkov in hitrejšo ozdravitev (15).

Reference

1. O matičnih celicah. (31.08.2014) Dostopno na: <http://www.animacel.com/sl/o-maticnih-celicah>.
2. Avasthi S, Srivastava RN, Singh A, Srivastava M. Stem cell: Past, Present and future- A review article. IJMU 2008;3:22-30.

3. Drinovec L, Kubale V, Larsen JL, Vrecl M. Mathematical models for quantitative assessment of bioluminescence resonance energy transfer: application to seven transmembrane receptors oligomerization. *Front Endocrinol* 2012; 3:1-10.
4. Kubale V, Vrecl M. Novi postopki za ugotavljanje proteinsko-proteinskih interakcij v živih celicah. *Vet Nov* 2004; 30: 271-8.
5. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36: 59-74.
6. Blagotinšek K. Funkcionalni pomen območja v tretji znotrajcelični zanki za specifičnost delovanja dolge oblike dopaminskega receptorja tipa 2 (D_{2L} -R). Ljubljana, 2012: 18-25.
7. Xu Y, Kanauchi A, von Arnim AG, Piston DW, Johnson CH. Bioluminescence resonance energy transfer: monitoring protein-protein interactions in living cells. *Methods Enzymol* 2003; 360: 289-301.
8. Vrecl M. The use of BRET of study receptor protein interaction. *Frontiers in endocrinology*. (Online) 2014, 2, http://www.frontiersin.org/books/The_use_of_BRET_to_study_receptor-protein_interactions/269 (dostopno 31.8.2014).
9. Mandic M, Drinovec L, Glisic S, Veljkovic N, Nøhr J, Vrecl M. Demonstration of a Direct Interaction between β_2 -Adrenergic Receptor and Insulin Receptor by BRET and Bioinformatics. *PLoS One*. 2014; 9(11): 1-15.
10. Santos-Zas I, Lodeiro M, Gurriarán-Rodríguez U, Bouzo-Lorenzo M, Mosteiro CS, Casanueva FF, Casabiell X, Pazos Y, Camiña JP. β -Arrestin signal complex plays a critical role in adipose differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 5:1281-92.
11. Feng X, Wang W, Liu J, Liu Y. β -Arrestins: multifunctional signaling adaptors in type 2 diabetes. *Mol Biol Rep* (2011) 38:2517-2528.
12. Lenhart PM, Broselid S, Barrick CJ, Leeb-Lundberg LM, Caron KM. G-protein-coupled receptor 30 interacts with receptor activity-modifying protein 3 and confers sex-dependent cardioprotection. *J Mol Endocrinol*. 2013; 51(1):191-202.
13. Thomson PA, Wray NR, Thomson AM, Dunbar DR, Grassie MA, Condie A, Walker MT, Smith DJ, Pulford DJ, Muir W, Blackwood DH, Porteous DJ. Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor. *Mol Psychiatry*. 2005; 10:470-8.
14. Lensing CJ, Haskell-Luevano C. Ac-Trp-DPhe(p-I)-Arg-Trp-NH₂, a 250-Fold Selective Melanocortin-4 Receptor (MC4R) Antagonist over the Melanocortin-3 Receptor (MC3R), Affects Energy Homeostasis in Male and Female Mice Differently. *ACS Chem Neurosci*. 2016 Jul 22. (Epub ahead of print)
15. Valentino RJ, Van Bockstaele E, Bangasser D. Sex-specific cell signaling: the corticotropin-releasing factor receptor model. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34: 437-44.

Sex specific intracellular signaling of the female and male dog stem cells after insulin receptor activation with the use of BRET² method

Veterinary faculty in Ljubljana was among the first to use animal joint treatments in clinical practice. The European project goal was to develop new treatment methods using donor stem cells. Within the project we studied sexual dimorphism in dog's stem cells derived from adipose tissue for the potential differences in intracellular signaling after insulin receptor (IR) activation *in vitro*. To display the differences in the interaction of IR with β -arrestin 2 (β -arr2) after the activation of IR, we used the method of bioluminescence

resonance energy transfer (BRET2). The results showed that the difference after agonist stimulation is significantly higher in female stem cells. The discovery of differences in insulin receptor activation in female and male cells is important for understanding pathology of diseases such as obesity and diabetes. The understanding of sexual dimorphism could enable the development and use of gender-targeted therapy.

Key words: stem cells; BRET2; sexual dimorphism