

## TESTI CELIČNE ADHEZIJE

### UVOD

Za vse teste na celicah bomo uporabljali celično linijo HaCaT, nesmrtno človeške keratinocyte, ki so glavni predstavniki epidermisa, torej zgornje plasti kože.

Integriteta tkiv je močno odvisna tako od povezovanja celic med seboj kakor tudi od pripenjanja celic na zunajcelični matriks. Delovanje slednjega uravnavajo celični receptorji iz družine integrinov. Gre za heterodimerne transmembranske strukture, sestavljene iz podenot  $\alpha$  in  $\beta$ , ki skupaj tvorita vezavno mesto za ligand. Pri sesalcih je trenutno identificiranih 24 heterodimerov, ki jih sestavlja 18 tipov podenote  $\alpha$  in 8 tipov podenote  $\beta$ . Za delovanje integrinov je ključnega pomena prisotnost  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  ionov. Medtem ko je vloga le-teh v primeru podenote  $\alpha$  še nejasna in verjetno vključuje stabilizacijo njene strukture, so dvovalentni ioni podenote  $\beta$  direktno vključeni v koordinacijo vezanega liganda. Večina integrinov se izraža na več različnih celicah, kot tudi celice izražajo različne integrine, kar omogoča vezavo več različnih molekul zunajceličnega matriksa. Moč interakcije integrinov z makromolekulami zunajceličnega matriksa je v primerjavi z vezavo hormonov in njihovih receptorjev relativno nizka ( $K_d$  med  $10^{-6}$  in  $10^{-8}$  M v primerjavi z  $10^{-9}$  do  $10^{-11}$  M), vseeno pa je zaradi vezave 100 do 1000 takšnih receptorjev interakcija precej močna in stabilna. Na strani zunajceličnega matriksa se integrini povezujejo s proteini preko kratkih aminokislinskih zaporedij; najbolj značilno prepoznavno zaporedje je tripeptid RGD, ki ga vsebujejo npr. fibronektin, laminin, vitronektin, ali pa motiva DGEA oz. GFOGER, kot ju poznamo v primeru nekaterih kolagenov. Glede na stabilnost povezave, kot tudi glede na vrsto citoskeletnih proteinov celice udeležene v interakcijo z zunajceličnim matriksom ločimo dve vrsti celičnih stikov: hemidezmosome ter fokalne stike.

Hemidezmosomi so strukture, ki omogočajo stabilne stike med zunajceličnim matriksom in celico. Nastanejo predvsem na bazalni strani epiteljskih celic in jih tesno povezujejo z bazalno lamino. Na citosolni strani hemidezmosoma se nahajajo adapterski proteini, s katerimi se povezujejo keratinski filament, ki jih uvrščamo med intermediarne filamente. Integrin  $\alpha 6\beta 4$ , ki je značilen za hemidezmosome, se preko adapterskega proteina plectina povezuje z zunajceličnim proteinom lamininom. Prav zaradi povezovanja intermediarnih filamentov z zunajceličnim matriksom so hemidezmosomi močni stiki in za razliko od fokalnih stikov omogočajo stabilno in stalno pritrjevanje epiteljskih celic.

Vloga fokalnih stikov je v primerjavi s hemidezmosomi veliko bolj dinamična. Fokalne stike lahko razumemo kot začasne strukture, ki omogočajo pritrjevanje premikajočih se celic. Tako kot v primeru hemidezmosomov se signal iz okolice prenese v notranjost celice preko integrinov, med katerimi so najbolj pogosti  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$  in  $\alpha V\beta 6$ . Na citosolni strani se integrin povezuje z mnogimi adapterskimi proteini kot so vinkulin, paksilin, talin in tensin, ki se naprej pripenjajo na aktinske filamente. Aktinski filament so v primerjavi z intermediarnimi tanjši, zaradi česar je tudi moč interakcije v primerjavi s hemidezmosomi šibkejša.

## POSTOPEK DELA

1. Na mikrotitrne ploščice nanesite naraščajoče koncentracije ustreznega rekombinantnega proteina (0 – 40 µg/ml) v PBS. V spodnjo tabelo označite luknjice nanesenih proteinov. Ploščice inkubirajte preko noči pri 4 °C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

2. Mikrotitrne ploščice stresajte, da odstranite vse nevezane proteine. Luknjice z vezanimi proteini blokirajte 30 min pri 37 °C z dodatkom 100 µl 1 % (w/v) BSA v PBS, s čimer preprečite nespecifično vezavo celic na plastično površino.
3. Po odstranitvi blokirne raztopine v vsako luknjico mikrotitrne ploščice dodajte 100 µl  $1 \times 10^6$  celic HaCaT, redčenih z medijem DMEM brez dodanega seruma in jih inkubirajte 30 min v inkubatorju pri 37 °C.
4. Nepritrjene celice odstranite s trikratnim spiranjem s PBS, pritrjene celice pa fiksirajte s 4 % formaldehidom. Celice smo nato sperite in jih obarvajte s 0,1 % barvilom kresil-vijolično ter inkubirajte 15 min pri sobni temperaturi. Po barvanju s temeljitim spiranjem celice sperite, adsorbirano barvo pa raztopite z dodatkom 10 % raztopine očetne kisline. Intenziteto barve, sorazmerno količini pritrjenih celic, kvantificirajte s čitalcem mikrotitrskih ploščic, Tecan Sunrise, pri 590 nm.