

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJ REPAS

**VPLIV KATEPSINA X NA INTERAKCIJO CELIC  
JURKAT S CELICAMI NCTC2544**

EFFECT OF CATHEPSIN X ON THE INTERACTION OF JURKAT CELLS  
WITH NCTC2544 CELLS

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom doc. dr. Urše Pečar Fonovič.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Urši Pečar Fonovič za izjemno prijaznost, skbnost in zvrhano mero potrpežljivosti tako med raziskovalnim delom kot pri nastajanju magistrske naloge ter prof. dr. Janku Kosu za širše usmerjanje raziskovalnega dela. Posebej pa bi se rad zahvalil staršem, bratu in prijateljem, ki so me vsi ves čas podpirali in nikoli niso nehali verjeti vame.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom doc. dr. Urše Pečar Fonovič. Naloga je del programa Farmaceutvska biotehnologija: znanost za zdravje pod vodstvom prof. dr. Janka Kosa.

### **Komisija za zagovor:**

Predsednik: prof. dr. Danijel Kikelj

Član: izr. prof. dr. Simon Žakelj

Mentor: prof. dr. Janko Kos

Somentorica: doc. dr. Urša Pečar Fonovič

# Vsebina

Kazalo preglednic .....	ii
Kazalo slik .....	iii
Povzetek .....	iv
Abstract.....	v
1. Seznam kratic .....	1
2. Uvod .....	2
2.1 Katepsini .....	2
2.2 Katepsin X .....	2
2.3 LFA-1 .....	4
2.4 ICAM-1 in drugi zunajcelični ligandi LFA-1 .....	6
2.5 Uravnavanje afinitete LFA-1 .....	7
2.6 Vloga LFA-1 v patogenezi luskavice.....	9
2.7 LFA-1 kot terapevtska tarča.....	10
3. Načrt dela.....	12
4. Metode in materiali.....	13
4.1 Materiali.....	13
4.2 Priprava gojišč in pufrov.....	15
4.3 Celične kulture.....	19
4.4 Testi viabilnosti celic .....	22
4.5 Priprava preparatov za konfokalno mikroskopijo.....	23
4.6 Konfokalna mikroskopija .....	25
4.7 Test adhezije celic .....	25
4.8 Merjenje koncentracije proteinov v celičnih lizatih .....	27
4.9 Merjenje koncentracije katepsina X v celičnih lizatih.....	27
4.10 Merjenje aktivnosti katepsina X v celičnih lizatih.....	28
4.11 Statistična obdelava podatkov.....	29
5. Rezultati.....	30
5.1 Testi preživetja celic .....	30
5.2 Konfokalna mikroskopija .....	34
5.3 Testi adhezije celic .....	39
5.4 Vsebnost katepsina X v celičnih lizatih .....	44
5.5 Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih .....	44
6. Razprava .....	46
7. Zaključki.....	57
7.1 Omejitve raziskave in predlogi za nadaljnje raziskave.....	57
8. Viri.....	59

## Kazalo preglednic

Preglednica I: Uporabljene kemikalije. ....	13
Preglednica II: Uporabljeni reagenti. ....	14
Preglednica III: Uporabljena celična gojišča. ....	14
Preglednica IV: Uporabljeni proteini. ....	14
Preglednica V: Uporabljena protitelesa. ....	15
Preglednica VI: Sestavine gojišča kRPMI. ....	15
Preglednica VII: Sestavine gojišča kMEM. ....	16
Preglednica VIII: Sestavine 10×PBS. ....	16
Preglednica IX: Sestavine lizirnega pufra. ....	17
Preglednica X: Sestavine pufra A. ....	17
Preglednica XI: Sestavine pufra B. ....	18
Preglednica XII: Sestavine substratnega pufra. ....	18
Preglednica XIII: Sestavine osnovnega pufra. ....	19
Preglednica XIV: Sestavine aktivacijskega pufra. ....	19
Preglednica XV: Uporabljena gojišča in celične suspenzije (LFA-1 in katepsin X). ....	23
Preglednica XVI: Uporabljena gojišča in celične suspenzije (LFA-1 in ICAM-1). ....	23
Preglednica XVII: Uporabljena primarna protitelesa. ....	24
Preglednica XVIII: Uporabljena sekundarna protitelesa (konjugati). ....	24
Preglednica XIX: Gojišča in celične suspenzije za vzorce s celicami NCTC2544. ....	26
Preglednica XX: Gojišča in celične suspenzije za vzorce s kokulturami. ....	26

## Kazalo slik

Slika 1: Vpliv gojišč na preživetje celic NCTC2544.....	30
Slika 2: Vpliv kondicioniranih gojišč na preživetje celic NCTC2544.....	31
Slika 3: Preživetje celic NCTC2544 v kokulturah.....	32
Slika 4: Vpliv AMS36 na preživetje celic NCTC2544.....	33
Slika 5: Vpliv interferona $\gamma$ na preživetje celic NCTC2544.....	34
Slika 6: Kultura celic NCTC2544.....	35
Slika 7: Celice NCTC2544 v pristonosti AMS36.....	35
Slika 8: Celični stiki med celicami NCTC2544 in Jurkat/Jurkat-catX v kokulturah.....	36
Slika 9: Kultura celic NCTC2544 v odsotnosti in prisotnosti INF- $\gamma$ .....	37
Slika 10: Kokultura celic NCTC2544 in Jurkat v odsotnosti in v prisotnosti INF- $\gamma$ .....	38
Slika 11: Kolokalizacija LFA-1 in ICAM-1 v kokulturi celic NCTC2544 in Jurkat.....	39
Slika 12: Vpliv fibronektina na adhezijo celic NCTC2544.....	39
Slika 13: Potek adhezije celic NCTC2544 v različnih gojiščih.....	40
Slika 14: Vpliv gojišč na adhezijo celic NCTC2544.....	40
Slika 15: Vpliv kondicioniranih gojišč na adhezijo celic NCTC2544.....	41
Slika 16: Adhezija celic NCTC2544 v kokulturah in vpliv katepsina X.....	42
Slika 17: Vpliv interferona $\gamma$ na hitrost adhezije celic NCTC2544.....	43
Slika 18: Vsebnost katepsina X v celičnih lizatih.....	44
Slika 19: Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih.....	45

## Povzetek

Katepsin X je cisteinska peptidaza, ki s cepitvijo citoplazemskega repa z limfocitno funkcijo povezanega antigena 1 (LFA-1) uravnava njegov prehod med konformacijama s srednjo in visoko afiniteto za vezavo na medcelično adhezijsko molekulo 1 (ICAM-1). LFA-1 je kot ključna adhezijska molekula limfocitov T udeležen v patogenezi luskavice. Zdravljenje luskavice z monoklonskim protitelesom proti LFA-1, ki popolnoma inaktivira njegovodelovanje, je privedlo do neželenih učinkov zaradi pretirane imunosupresije. Selektivno zaviranje oblike LFA-1 z visoko afiniteto preko regulacije delovanja katepsina X bi lahko omogočilo podobno učinkovitost zdravljenja ob boljši varnosti, vendar vloga katepsina X v procesih luskavice še ni bila neposredno ovrednotena.

Da bi potrdili vpliv katepsina X na interakcijo limfocitov T s keratinociti, smo postavili celični model keratinocitne linije NCTC2544 in kondicioniranega gojišča T limfocitne linije Jurkat s stabilno nadizraženim katepsinom X ali njegovega zaviralca AMS36. Pripravili smo tudi kokulture omenjenih celic. Izražanje ICAM-1 smo inducirali z interferonom  $\gamma$ . Preživetje celic NCTC2544 smo določali s testom viabilnosti z uporabo MTS, njihovo adhezijo pa s testom adhezije. Razporeditev katepsina X, LFA-1 in ICAM-1 v celicah smo opazovali s konfokalno mikroskopijo. Vsebnost katepsina X v celičnih lizatih smo izmerili z encimsko-immunskim testom, njegovo aktivnost pa s testom aktivnosti.

Preživetje celic NCTC2544 je bilo v primerjavi s kontrolnim gojiščem manjše ( $p < 0,05$ ) v kondicioniranih gojiščih in v kokulturah s celicami Jurkat. Katepsin X in LFA-1 sta bila razporejena po celotni celici NCTC2544 s precejšnjo stopnjo kolokalizacije. Izražanje ICAM-1 na celicah NCTC2544 je bilo komaj zaznavno, bistveno se je povečalo ob dodatku interferona  $\gamma$ . Največ ICAM-1 je bilo ob celični membrani; v kokulturah se je kolokaliziral z LFA-1 v stikih s celicami Jurkat. Adhezija celic NCTC2544 se je v primerjavi s kontrolnim gojiščem zmanjšala ( $p < 0,05$ ) ob dodatku katepsina X, AMS36 ali interferona  $\gamma$ . V kokulturah s celicami Jurkat je bila adhezija večja ( $p < 0,05$ ) kot v monokulturi celic NCTC2544 le v prisotnosti interferona  $\gamma$ . Razlike med linijama Jurkat in Jurkat z nadizraženim katepsinom X niso bile statistično značilne v nobenem od poskusov, najverjetneje zaradi premajhne razlike v vsebnosti in aktivnosti katepsina X. Vpliva katepsina X na interakcijo med celicami Jurkat in NCTC2544 zato nismo mogli potrditi.

**Ključne besede:** katepsin X, z limfocitno funkcijo povezan antigen 1, celice Jurkat, celice NCTC2544, medcelična adhezijska molekula 1

## Abstract

Cathepsin X is a cysteine protease that, by cleaving the cytoplasmic tail of lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1), regulates its transition between conformations with medium and high affinity for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). As the main T lymphocyte adhesion molecule, LFA-1 is involved in the pathogenesis of psoriasis. Treatment of psoriasis with an anti-LFA-1 monoclonal antibody that completely inactivates the function of LFA-1 has led to side effects due to excessive immunosuppression. Selective inhibition of the high affinity form of LFA-1 through regulation of cathepsin X activity promises similar treatment efficacy with a better safety profile, although the role of cathepsin X in psoriatic processes has not yet been studied directly.

To confirm the effect of cathepsin X on the lymphocyte interaction with keratinocytes, we developed a cell model using the NCTC2544 keratinocyte cell line and conditioned medium of the Jurkat T lymphocyte cell line stably overexpressing cathepsin X, or alternatively, AMS36, a selective inhibitor of cathepsin X. We also prepared cocultures using the aforementioned cell lines. ICAM-1 expression was induced with interferon  $\gamma$ . Survival of NCTC2544 cells was measured with a viability assay using MTS, and their adhesion with real time xCELLigence® System. Localization of cathepsin X, LFA-1 and ICAM-1 was determined using confocal microscopy. Concentration and activity of cathepsin X in cell lysates were measured by enzyme-linked immunoassay and activity assay, respectively.

In comparison to control medium, the survival of NCTC2544 cells was reduced ( $p < 0,05$ ) in conditioned media and cocultures. Cathepsin X and LFA-1 were distributed throughout the NCTC2544 cells with a substantial degree of colocalization. ICAM-1 expression was barely detectable but increased greatly in the presence of interferon  $\gamma$ , with the highest levels at the cell membrane. In cocultures, it colocalized with LFA-1 in the cell junctions. Adhesion of NCTC2544 cells was reduced ( $p < 0,05$ ) compared to control medium in the presence of cathepsin X, AMS36 or interferon  $\gamma$ . The adhesion was higher ( $p < 0,05$ ) in cocultures than in NCTC2544 monoculture only in the presence of interferon  $\gamma$ . No statistically significant difference was found between the wild-type and cathepsin X overexpressing Jurkat cell lines in any of the experiments, likely due to insufficient difference in concentration and activity of cathepsin X. The effect of cathepsin X on the interaction between Jurkat and NCTC2544 cells could therefore not be confirmed.

**Keywords:** cathepsin X, lymphocyte function-associated antigen 1, Jurkat cell line, NCTC2544 cell line, intercellular adhesion molecule 1

# 1. Seznam kratic

BSA – goveji serumski albumin

DMSO - dimetilsulfoksid

EDTA - etilendiamintetraocetna kislina

HEPES - 4-(2-hidroksietil)-1-piperaziniletansulfonska kislina

ICAM-1 – medcelična adhezijska molekula 1

INF- $\gamma$  – interferon  $\gamma$

Jurkat-catX – celice Jurkat z nadizraženim katepsinom X

kMEM – kompletno gojišče MEM oziroma gojišče za celice NCTC2544

kRPMI – kompletno gojišče RPMI oziroma gojišče za celice Jurkat

LFA-1 – z limfocitno funkcijo povezani antigen 1

Mac-1 – antigen makrofagov 1

MEM – Eaglovo minimalno esencialno gojišče

MHC – poglobitni kompleks tkivne skladnosti

MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol

PBS - izotonični fosfatni pufer (ang. phosphate buffered saline)

RPMI – gojišče Roswell Park Memorial Institute

TNF- $\alpha$  – dejavnik tumorske nekroze alfa



## **2. Uvod**

### **2.1 Katepsini**

Peptidaze ali proteaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi. Glede na mesto cepitve ločimo eksopeptidaze, ki odcepijo eno ali nekaj aminokislin na N- ali C-koncu polipeptidne verige, ter endopeptidaze, ki katalizirajo cepitev znotraj verige. Po mehanizmu katalize hidrolize poznamo serinske, treoninske, aspartatne in cisteinske peptidaze ter metalopeptidaze. Sodobnejša evolucijska delitev peptidaz na klane in znotraj slednjih na družine temelji na sorodnosti in poleg mehanizma katalize upošteva tudi podobnosti v aminokislinskem zaporedju. (1)

Cisteinske peptidaze so velika skupina peptidaz, ki imajo v aktivnem mestu cisteinski ostanek, katerega tiolna skupina deluje kot nukleofil pri prvotnem napadu na ogljikov atom v peptidni vezi substrata. Cisteinske peptidaze predstavljajo približno četrtno vseh peptidaz in obsegajo več različnih družin peptidaz. Pomembna družina cisteinskih peptidaz je družina C1, ki obsega 11 različnih peptidaz. (1) Njeni predstavniki, imenovani katepsini, se med seboj razlikujejo po svoji specifičnosti za različne substrate in ravni izražanja v različnih tkivih in celicah. Katepsini so dolgo časa veljali za lizosomske peptidaze, udeležene predvsem pri končni razgradnji proteinov. Čeprav ta ugotovitev do določene mere še vedno drži, so novejšje raziskave privedle do spoznanja, da se lahko katepsini premestijo tudi na druge lokacije v celici ali celo izločijo iz celice, na teh novih lokacijah, pa tudi v lizosomih, pa so lahko udeleženi v številnih drugih fizioloških in patofizioloških procesih. (2, 3)

### **2.2 Katepsin X**

V skupini katepsinov zaseda nekoliko posebno mesto katepsin X. Za razliko od nekaterih drugih katepsinov (na primer B, C, H in L), ki se izražajo v večini tkiv, je izražanje katepsina X v fizioloških razmerah omejeno na celice imunskega sistema, predvsem monocite, mikroglijo, makrofage in dendritične celice. (4, 5) V patoloških razmerah so večje količine katepsina X med drugim našli v tumorjih prostate in želodca ter v možganih pacientov z Alzheimerjevo boleznijo. (5-8)

Po strukturi se od ostalih katepsinov razlikuje po zelo kratki proregiji, ki ne izkazuje strukturne podobnosti z ostalimi člani družine C1, in značilni „mini zanki“, ki jo tvorijo

trije vrinjeni aminokislinski ostanki. (9, 10) Mini zanka določa tudi delovanje katepsina X. Katepsin X deluje kot karboksipeptidaza, ki preferenčno odcepi eno aminokislino, za razliko od večine ostalih katepsinov pa ne izkazuje endopeptidazne aktivnosti. (10, 11) Prokatepsin X ne izkazuje proteolizne aktivnosti, zato je za njegovo aktivacijo potrebna predhodna odstranitev njegove proregije; to proteolizno cepitev lahko katalizirajo druge lizosomske peptidaze, na primer katepsin L. (9)

### **2.2.1 Substrati katepsina X**

Katepsin X v splošnem izkazuje precej široko substratno specifičnost. Na mestu P2 (druga aminokislina substrata od mesta cepitve v smeri N-konca) so za vezavo na encim in hidrolizo najbolj ugodne aminokislino z velikimi hidrofobnimi stranskimi verigami, na mestu P1 (poleg mesta cepitve) pa so ugodne aminokislino z manjšimi stranskimi verigami, ki sterično ne ovirajo interakcije z encimom. Najmanjši vpliv na hitrost hidrolize ima aminokislina na mestu P1', ki se tekom hidrolize odcepi. Pomembna izjema pri tem je aminokislina prolin; njeno nahajanje na kateremkoli od teh treh mest izjemno upočasni ali celo ustavi hidrolizo substrata. Zaradi tako široke substratne specifičnosti je delovanje katepsina X odvisno predvsem od njegove lokacije ter njegove kolokalizacije s potencialnimi substrati. (12)

Zaradi svoje izključno karboksipeptidazne aktivnosti ima katepsin X verjetno manjši pomen pri obširni končni lizosomski razgradnji proteinov, zato pa predstavlja toliko zanimivejši predmet raziskav njegovo delovanje na specifične celične proteine in posledičen vpliv na njihovo funkcijo. (13). Med potrjenimi substrati za katepsin X so  $\gamma$ -enolaza, kemokin CXCL-12, bradikinin, kalidin, huntingtin, profilin 1 in  $\beta$ -veriga integrinskih receptorjev. (14)

### **2.2.2 Zaviralci katepsina X**

Za normalno delovanje organizma mora biti delovanje peptidaz natančno uravnano. Enega od načinov uravnavanja predstavljajo endogeni zaviralci peptidaz. Znani endogeni zaviralci cisteinskih katepsinov so cistatini in stefini. Nekaterih izmed njih (na primer cistatin C in stefin A) zavirajo tudi delovanje katepsina X s konstanto inhibicije v nanomolarnem območju, vendar pa njihovo delovanje ni specifično za katepsin X, saj se na nekatere druge katepsine vežejo z veliko večjo afiniteto. (15)

Razvoj eksogenih zaviralcev je privedel do monoklonskega protitelesa 2F12, ki je veliko bolj specifičen zaviralec katepsina X, vendar deluje pretežno le na encim zunaj

celice. (4, 16) Za delovanje znotraj celice bi bile kot zaviralci primernejše majhne molekule, vendar tudi na tem področju za zdaj še nimamo dovolj specifičnega zaviralca. Še najbližje temu cilju so trenutno ireverzibilni epoksisukcinilni zaviralci, med katerimi je najbolj specifičen AMS36. (17)

### **2.2.3 Vloga katepsina X v fizioloških in patofizioloških procesih**

Glede na širok nabor potrjenih substratov z različnimi funkcijami ni presenetljivo, da lahko katepsin X pomembno vpliva na različne celične procese. V možganih s cepitvijo  $\gamma$ -enolaze, pomembnega nevrotrofičnega dejavnika, prepreči njeno vezavo na  $\gamma_1$ -sintrofin in njeno nevrotrofično delovanje ter s tem prispeva k nastanku simptomov Alzheimerjeve bolezni. (14, 18-20) Preko cepitve tumorskega supresorja profilina 1 lahko deluje kot tumorski promotor. (13, 19, 20) Pomembna tarča katepsina X za adhezijo in migracijo tumorskih celic so tudi integrinski receptorji. Na nekatere izmed njih se preko motiva Arg-Gly-Asp veže preko prooblake, na  $\beta_2$ -integrinske receptorje pa aktiviran katepsin X vpliva preko cepitve  $\beta_2$ -podenote. (14)

Cepitev citoplazemskih repov  $\beta_2$ -integrinskih receptorjev vpliva na različne celice imunskega sistema. V makrofagih in dendritičnih celicah katepsin X tako aktivira  $\beta_2$ -integrinski receptor Mac-1, kar poveča njihovo celično adhezijo, fagocitozo, pa tudi aktivacijo limfocitov T. Katepsin X ima vlogo tudi pri zorjenju dendritičnih celic. (16, 21) Ob stiku s celicami, ki izražajo ICAM-1, ali z zunajceličnim matriksom, pride ob povečani aktivnosti katepsina X v limfocitih T do izrazitih morfoloških sprememb v smeri polarizirane oblike, ekstremnega podaljšanja uropodov in tvorbe nanocevk. (22, 23) Prav tako se bistveno poveča hitrost migracije, kar je bilo dokazano tako v dvodimenzionalnih kot tridimenzionalnih modelih. (24) Izkazalo se je, da je za te učinke odgovorna interakcija katepsina X z LFA-1. (23, 24)

## **2.3 LFA-1**

Z limfocitno funkcijo povezan antigen 1 (LFA-1) je glavna adhezijska molekula na limfocitih. Spada v družino integrinov, transmembranskih receptorjev, ki sodelujejo pri celični adheziji. Vsi integrini so heterodimeri, sestavljeni iz  $\alpha$ - in  $\beta$ -podenote. (25) Pri sesalcih je poznanih osemnajst različnih  $\alpha$ - in osem različnih  $\beta$ -podenot, ki skupaj tvorijo štiriindvajset različnih kombinacij. (25, 26) LFA-1 spada v poddružino integrinov  $\beta_2$ , ki je specifična za levkocite. Obsega štiri predstavnike s skupno  $\beta$ -podenoto in različnimi  $\alpha$ -podenotami:  $\alpha_D\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_X\beta_2$  in  $\alpha_L\beta_2$  (LFA-1). (27)

### 2.3.1 Struktura LFA-1

Tako  $\alpha$ - kot  $\beta$ -podenota integrinov sta sestavljeni iz velike (80 do 150 kDa) zunajcelične domene, transmembranske  $\alpha$ -vijačnice in kratkega citoplazemskega repa. (25) Vsi  $\beta_2$ -integrini imajo v svoji  $\alpha$ -podenoti domeno I, ki vsebuje vezavno mesto za ligande in je del tako imenovane „glave“, ki obsega zunajcelične dele obeh podenot, najbolj oddaljene od membrane. Glede na orientacijo te domene lahko  $\beta_2$ -integrini zavzamejo zvito ali iztegnjeno konformacijo; pri prvi je domena I usmerjena proti celični membrani, kar onemogoča dostop ligandom, pri drugi pa gleda stran od membrane, zato je vezava ligandov mogoča. (28, 29) Glede na položaj sosednjih domen obstajata dve različni iztegnjeni konformaciji, zaprta in odprta, ki ustrezata srednji in visoki afiniteti. (30)

Konformacije se razlikujejo tudi po medsebojnem položaju citoplazemskih repov, ki se v zviti in zaprti iztegnjeni konformaciji nahajata drug zraven drugega, pri odprti iztegnjeni pa sta bolj odmaknjena. (13) Citoplazemska repa obeh podenot sta kljub svoji majhnosti ključna za normalne funkcije integrinov, saj vsebujeta značilna aminokislinska zaporedja, pomembna za njihovo uravnavanje. Zaporedja citoplazemski repov  $\beta$ -podenot so si med seboj bolj podobna kot zaporedja  $\alpha$ -podenot, njihova funkcija pa je prav tako bolj raziskana. (13, 31) Znano je na primer, da je rep  $\beta_2$ -podenote LFA-1 vpliva na vezavo zunajceličnih ligandov in omogoča prehod v aktivno konformacijo pod vplivom forbolnih estrov, prav tako se brez njega integrinski receptorji ne morejo organizirati v gruče na površini celice. (32, 33) Ker citoplazemski rep  $\beta_2$ -podenote sam po sebi nima nobene encimske aktivnosti (kar velja tudi za  $\alpha$ -podenoto), je za njegovo vlogo v zgoraj opisanih procesih v prvi vrsti odgovorna vezava citoplazemskih pomožnih (adaptorskih) proteinov, ki se vežejo na značilna aminokislinska zaporedja v repu. (13, 34)

### 2.3.2 Funkcija LFA-1

Kot ostali integrini je tudi LFA-1 adhezijska molekula, ki z vezavo zunajceličnih ligandov omogoča celici, da se pritrudi na druge celice ali komponente zunajceličnega matriksa. Pri tej vezavi pride do konformacijskih sprememb, ki vplivajo na vezavo pomožnih proteinov na citoplazemska repa. Po drugi strani pa je za vezavo ligandov potrebna predhodna vezava določenih pomožnih proteinov, ki sprožijo prehod iz zvite v iztegnjeno konformacijo. To dvosmerno delovanje je posebnost integrinskih receptorjev, ki lahko prenašajo signale tako v celico kot iz nje; iz celice navzven se prenese informacija o aktivaciji integrinov in

spremembi njihove afinitete, v celico pa informacija o vezavi zunajceličnih ligandov na aktivirane integrine. (25, 27)

LFA-1 se izraža izključno na celicah imunskega sistema. Še posebej pomemben je za limfocite T, na katerih je glavna adhezijska molekula, ki omogoča njihovo nadzorovano adhezijo in deadhezijo, zato je udeležen pri vseh procesih, kjer je le-ta potrebna. LFA-1 je pri prehodu limfocitov T iz kapilar v tkiva odgovoren za njihovo dokončno ustavitev kotaljenja ob steni kapilare, trdno adhezijo na površino endotelija ter sledeče razprostiranje in premikanje po njem. Prav tako je LFA-1 udeležen pri samem prehodu limfocitov T preko endotelija. (27)

Drug pomemben proces, v katerega je tesno vpleten LFA-1, je predstavitev antigenov, pri katerem se aktivirane molekule LFA-1 na limfocitu T vežejo na molekule ICAM-1 na antigen predstavitveni celici. Nastali kompleksi se nato razporedijo v obroč, sredi katerega se nahajajo T-celični receptorji, povezani s kompleksom MHC-antigen na antigen predstavitveni celici, nastalo strukturo pa imenujemo imunska sinapsa. (35, 36) Tesna in stabilna povezava celic preko imunske sinapse T-celičnim receptorjem dovolj dolgo časa omogoča bližnji stik z antigenom, da lahko s svojim signaliziranjem v kombinaciji s kostimulatornimi receptorji polno aktivirajo limfocit T. (37, 38) Tvorba imunske sinapse je nujno potrebna za polno aktivacijo limfocitov T; v njeni odsotnosti stimulacija T-celičnega receptorja privede do anergije. Nekatere raziskave nakazujejo, da bi lahko bila vloga LFA-1 pri predstavitvi antigenov še večja; vezava ICAM-1 na LFA-1 naj bi poleg stimulacije T-celičnega receptorja privedla do polne aktivacije limfocitov T tudi v odsotnosti drugih kostimulatornih molekul. (36, 37)

## **2.4 ICAM-1 in drugi zunajcelični ligandi LFA-1**

Glavni ligandi za LFA-1 so medcelične adhezijske molekule (ICAM) na drugih celicah, čeprav se LFA-1 lahko veže tudi nekatere druge proteine, kot sta na primer E-selektin in kolagen tipa I. (13) Medcelične adhezijske molekule so strukturno podobni transmembranski proteini, ki spadajo v naddružino imunoglobulinov. Med njimi je za LFA-1 daleč najpomembnejši ligand ICAM-1. (39, 40) Njegov izvencelični del obsega 453 pretežno hidrofobnih aminokislin in zavzema obliko ukrivljene palice. Tvori ga pet imunoglobulinskih domen, v glavnem sestavljenih iz  $\beta$ -struktur, ki jih stabilizirajo disulfidne vezi. (41, 42) Zunajcelični del ICAM-1 je preko ene same hidrofobne transmembranske regije povezan s kratkim citoplazemskim repom, sestavljenim iz 28

aminokislilin. (41) Celoten neglikozilirani protein ima molekularno maso 60 kDa, ki po glikozilaciji naraste na 80 do 114 kDa. (42)

Vezavno mesto za LFA-1 se nahaja na prvi (od membrane najbolj oddaljeni) imunoglobulinski domeni. Med ligande za ICAM-1 spadajo še integrinski receptor Mac-1 ( $\alpha_M\beta_2$ ), fibrinogen, rinovirusi in s *Plasmodium falciparum* okuženi eritrociti. (46) Izražanje ICAM-1 je za razliko od LFA-1, ki je omejen na levkocite, precej bolj razširjeno, čeprav se konstitutivno izraža le na nekaterih tipih celic. Najpomembnejše med njimi so dendritične celice, makrofagi in limfociti, manjše količine pa so prisotne tudi na žilnem endoteliju. (43) Izražanje ICAM-1 povečajo vnetni citokini in nekateri drugi mediatorji, ki lahko inducirajo njegovo izražanje tudi na tistih celicah, na katerih se ne izraža konstitutivno. Izražanje na endotelijskih celicah na primer bistveno povečajo TNF- $\alpha$ , interleukin 1 in lipopolisaharid, njegovo izražanje na keratinocitih pa najbolj učinkovito inducira INF- $\gamma$ , medtem ko imajo ostali mediatorji veliko manjši ali nični učinek. (44-46) Ker ICAM-1 omogoča pritrnitev imunskih celic, je njegovo nadzorovano izražanje pravzaprav eden od številnih mehanizmov uravnavanja vnetnih procesov. (47)

## 2.5 Uravnavanje afinitete LFA-1

Kot že opisano, lahko LFA-1 zavzame tri različne konformacije: zvito, zaprto iztegnjeno in odprto iztegnjeno, ki ustrezajo nizki, srednji in visoki afiniteti do ligandov. (28-30) Na površini celic, na primer limfocitov T, obstaja ravnotežje med temi tremi konformacijami, ki je v mirovanju močno pomaknjeno k zviti konformaciji. (27, 48) Pod vplivom nekaterih signalov iz okolja, kot so na primer vezava kompleksa MHC-antigen na T-celični receptor ali aktivacija receptorjev za kemokine, pride do premika ravnotežja k iztegnjenima konformacijama, ki sta sposobni vezave ligandov. (27, 34) Ta proces, ki vključuje prenos signala iz celice, imenujemo aktivacija LFA-1, in je ključen za nadzorovano adhezijo limfocitov T pri tvorbi imunske sinapse z antigen predstavitvenimi celicami in migraciji limfocitov T preko stene kapilar v tkiva. (27, 34)

Prav tako pomembno je za normalno delovanje limfocitov T ravnotežje med zaprto in odprto iztegnjeno konformacijo LFA-1. Premik tega ravnotežja v eno ali drugo smer imenujemo modulacija afinitete LFA-1 in naj bi potekal po predhodni aktivaciji LFA-1. (13) Modulacija afinitete je denimo pomembna pri migraciji limfocitov T, med katero na različnih delih celice najdemo molekule LFA-1 z različno afiniteto. (49, 50)

### **2.5.1 Aktivacija LFA-1**

Na molekularnem nivoju ima osrednjo vlogo pri aktivaciji LFA-1 citoplazemski pomožni protein talin, čeprav so pri tem procesu udeleženi tudi nekateri drugi pomožni proteini, na primer kindlin-3. (34, 51) Talin je sestavljen iz okrog 50 kDa velike glave z vezavno domeno za integrine in 220 kDa velike paličaste regije, na kateri se nahajajo vezavna mesta za aktin in nekatere druge pomožne proteine. (52) Talin se v mirovanju nahaja v neaktivni zviti konformaciji, pri kateri sta glava in paličasta regija povezani preko nekovalentnih interakcij, kar onemogoča dostop do vezavnega mesta za integrine. Ob prisotnosti aktivirajočih signalov iz okolja pride do aktivacije različnih znotrajceličnih signalnih poti, ki v končni fazi preko proteolizne cepitve repne domene privedejo do prekinitve njene vezave na glavo talina. S tem se sprostijo vezavna mesta na glavi talina, ki se tako lahko veže na citoplazemski rep  $\beta$ -podenote LFA-1. (51) Ta vezava povzroči konformacijske spremembe, ki se preko transmembranskih domen prenesejo na izvencelične domene podenot LFA-1, kar privede do njihovega prehoda v aktivno iztegnjeno konformacijo. (52)

### **2.5.2 Modulacija afinitete LFA-1**

Mehanizem modulacije afinitete LFA-1 je nekoliko slabše raziskan, pri njem pa so prav tako udeleženi nekateri citoplazemski pomožni proteini. Njihova vezava na citoplazemska repa aktiviranega LFA-1 naj bi tako preferenčno stabilizirala eno ali drugo iztegnjeno konformacijo, odvisno od posameznih pomožnih proteinov in zaporednja njihove vezave. (13) Znano je na primer, da vezava  $\alpha$ -aktinina sovпада s srednjo afiniteto LFA-1, medtem ko je vezava talina najbolj značilna za konformacijo z visoko afiniteto, čeprav se talin veže tudi na konformacijo s srednjo afiniteto. (49, 50) Vezavna mesta za posamezne pomožne proteine se med seboj delno prekrivajo, zato pogosto tekmujejo za vezavo. Uravnavanje vezave pomožnih proteinov je pomemben način uravnavanja afinitete LFA-1, vendar so njegovi mehanizmi zaenkrat še razmeroma slabo raziskani. (13)

### **2.5.3 Vloga katepsina X pri modulaciji afinitete LFA-1**

Ena izmed možnosti uravnavanja vezave pomožnih proteinov je proteolizna cepitev citoplazemskih repov LFA-1. Kalpain, od kalcija odvisna peptidaza, lahko na primer cepi podenoti integrinov  $\beta_2$  in  $\beta_3$ , kar onemogoči vezavo kinaze Src. (53, 54) Citoplazemski rep  $\beta_2$ -podenote je tudi substrat katepsina X, kar potrjuje njegova postopna cepitev sintetičnega peptida z enakim aminokislinskim zaporedjem. Katepsin X pri tem postopno odcepi prve

štiri C-končne aminokisljine, nato pa se razgradnja ustavi, ko se na mestu P2 nahaja prolin. (15, 21, 22) Da ta razgradnja poteka tudi *in vivo*, dokazuje odkritje skrajšane oblike  $\beta_2$ -podenote LFA-1 pri visokoločljivostni elektroforezi lizatov celic Jurkat, ki je ni bilo mogoče zaznati po inhibiciji katepsina X. (55) Dodatno to ugotovitev podpira tudi kolokalizacija katepsina X in LFA-1 v migrirajočih limfocitih T, ki je najbolj izrazita na vodilnem delu celice in uropodu. (23)

Posledica te proteolizne cepitve je spremenjena afiniteta citoplazemskega repa  $\beta_2$ -podenote LFA-1 za talin in  $\alpha$ -aktinin. Afiniteta za vezavo talina narašča s postopno odstranitvijo aminokisljin in doseže maksimum po odstranitvi četrte C-končne aminokisljine, pri čemer je sprememba afinitete predvsem posledica močnejše vezave talina na od membrane oddaljenejšo vezavno mesto. (55) Afiniteta citoplazemskega repa  $\beta_2$ -podenote za vezavo  $\alpha$ -aktinina je po drugi strani največja po odstranitvi tretje C-končne aminokisljine, po odstranitvi četrte pa se zmanjša. (56) Katepsin X lahko s svojim delovanjem tako vpliva na vezavo teh dveh pomožnih proteinov in razmerje med njima ter posledično na spremenjeno razmerje med konformacijama s srednjo oziroma visoko afiniteto. (13)

## 2.6 Vloga LFA-1 v patogenezi luskavice

Luskavica oziroma psoriaza je kronična imunsko posredovana bolezen, za katero je značilen pojav eritematoznih lezij na površini kože. Vzrok za njen nastanek do danes še ni natančno pojasnjen, vemo pa, da je zanj odgovorna kombinacija dednih dejavnikov in dejavnikov okolja. Čeprav se simptomi bolezni izrazijo na koži (in v določenih primerih na sklepih), so v njen razvoj tesno vpletene tudi celice imunskega sistema. Najpomembnejšo vlogo imajo pri tem dendritične celice, ki začnejo imunski odgovor, in limfociti T, ki z izločanjem citokinov v koži povzročijo nastanek tipičnih simptomov in tako predstavljajo glavne efektorske celice pri luskavici. (57)

Glede na osrednjo vlogo limfocitov T v patogenezi luskavice zato ni presenetljivo, da je tudi LFA-1 kot njihova glavna adhezijska molekula vpleten v številne ključne korake njenega razvoja, začevši s prvotno predstavitvijo psoriatičnih avtoantigenov (na primer katelicidina) naivnim limfocitom T. (57, 58) Posledici uspešne predstavitve antigena zanj specifičnim klonom limfocitov T sta njihova aktivacija in proliferacija, za vključitev v psoriatični vnetni proces v koži pa morajo aktivirani limfociti T najprej po krvi pripotovati do kapilar v koži in nato preko endotelija kapilar preiti v kožno tkivo. V ta prehod preko žilne stene, ki zaradi večjega izražanja ICAM-1 na endotelijskih celicah bistveno lažje



poteka v vnetih tkivih, je, kot že rečeno, na več stopnjah tesno vključen LFA-1. (27, 44, 46)

Po prehodu preko žilne stene poteče reaktivacija limfocitov T, ko pridejo le-ti ponovno v stik z avtoantigeni. Vloga LFA-1 pri reaktivaciji je podobna kot pri prvotni aktivaciji, saj gre v osnovi tudi tu za predstavitev antigenov. (58) Eno glavnih razlik predstavlja potencialna udeležba keratinocitov kot antigen predstavitev celic v vnetnih razmerah. Že nekaj časa je znano, da  $\text{INF-}\gamma$  inducira izražanje ICAM-1 na keratinocitih, kar omogoča adhezijo limfocitov T preko LFA-1. (45) Prav tako je znano, da pod vplivom  $\text{INF-}\gamma$  keratinociti začno izražati MHC razreda II in proteine, potrebne za nalaganje antigenov nanj. (59, 60) Čeprav keratinociti ne izražajo drugih kostimulativnih molekul, ki so običajno udeležene v predstavitvi antigenov, je raziskovalcem s keratinociti, predhodno izpostavljenimi  $\text{INF-}\gamma$  in nato modelnemu antigenu, uspelo aktivirati zanj specifične limfocite T  $\text{CD4}^+$ . Vlogo kostimulativnih molekul naj bi pri tem prevzela interakcija ICAM-1 z LFA-1. (61) Adhezija limfocitov na keratinocite ima lahko poleg aktivacije limfocitov  $\text{CD4}^+$  tudi druge posledice, npr. aktivacijo limfocitov  $\text{CD8}^+$  in posledično lizo keratinocitov. (58) Glede na dokazano sposobnost prenašanja signalov preko ICAM-1 v endotelijskih celicah ne moremo izključiti niti učinkov na keratinocite kot posledice neposrednega signaliziranja preko ICAM-1. (62)

## **2.7 LFA-1 kot terapevtska tarča**

Zaradi ključne vloge pri vključevanju limfocitov T v vnetni proces v koži je zaviranje funkcije LFA-1 zelo zanimiv pristop za zdravljenje luskavice. Ne le da zaviranje procesa na več stopnjah lahko obeta večji učinek, temveč lahko glede na patofiziologijo psoriatičnega vnetja pričakujemo celo sinergizem. Zmanjšanje števila limfocitov T v koži zaradi zaviranja njihovega prehoda preko kapilar pomeni manj intenzivno vnetje in manjše količine  $\text{INF-}\gamma$  ter  $\text{TNF-}\alpha$  in zato manjše izražanje ICAM-1; manj ICAM-1 na endotelijskih celicah in keratinocitih pa pomeni otežen prehod limfocitov v kožo in njihovo reaktivacijo. (57, 62)

### **2.7.1.1 Efalizumab**

Eden od pristopov zaviranja delovanja LFA-1 je preprečevanje njegove vezave na ICAM-1 s protitelesi, ki se specifično vežejo na eno od podenot LFA-1. Primer takšnega protitelesa je efalizumab, humanizirano monoklonsko protitelo razreda  $\text{IgG}_1$ , usmerjeno proti  $\alpha$ -podenoti LFA-1. Rezultati raziskav so potrdili, da *in vitro* zavira tako aktivacijo

limfocitov T kot njihovo migracijo preko modelnega endotelija in adhezijo na keratinocite. Zaviranje prehoda limfocitov T v tkiva je bilo izrazito tudi v kliničnih študijah, kjer so opazili precejšnje povečanje števila limfocitov T v periferni krvi ob znatnem zmanjšanju števila infiltriranih limfocitov v koži pacientov po zdravljenju. Poleg tega je že v roku 1 do 3 dni po prvem odmerku prišlo do zmanjšanega izražanja LFA-1 na limfocitih T. Zmanjšalo se je tudi izražanje ICAM-1 na keratinocitih, kar kaže na manjše izločanje citokinov v koži, prav tako pa so se normalizirali tudi kazalci proliferacije in diferenciacije keratinocitov. (58)

Vsi ti učinki na celični in tkivni ravni se odražajo tudi v dobri učinkovitosti efalizumaba pri zdravljenju zmerne do težke luskavice, zato je bil leta 2003 tudi odobren za to indikacijo. Po podatkih iz kliničnih študij je bil ugoden tudi njegov varnostni profil, saj v primerjavi s kontrolno skupino ni bilo zaznati povečane pojavnosti oportunističnih okužb ali rakavih obolenj, ki so pogosto problem zdravljenja z zdravili, ki zavirajo delovanje imunskega sistema. (58, 63) Kljub temu so efalizumab leta 2009 umaknili s trga zaradi pojava treh primerov potrjene in enega primera domnevne progresivne multicentrične levkoencefalopatije pri zdravljenju z efalizumabom. Ker gre za praviloma smrtno bolezen s preživetjem od nekaj tednov do nekaj mesecev, ki se pri pacientih brez zavrtega delovanja imunskega sistema pojavlja izjemno redko, in ker pacienti niso prejeli nobenega drugega imunosupresivnega zdravljenja, lahko vzrok za njen razvoj iščemo samo v delovanju efalizumaba in njegovem (morda prekomernem) zaviranju delovanja limfocitov T. (63)

#### **2.7.1.2 Zaviranje katepsina X kot terapevtska strategija pri luskavici**

Ena od lastnosti efalizumaba, ki bi lahko potencialno pripomogla k pretiranemu zaviranju imunskega odziva in razvoju progresivne multicentrične levkoencefalopatije, je njegova vezava na obe aktivni konformaciji LFA-1 (s srednjo in visoko afiniteto). Specifično zaviranje prehoda v konformacijo z visoko afiniteto preko zaviranja delovanja katepsina X z njegovimi specifičnimi zaviralci bi zato lahko bila zanimiva strategija za zdravljenje luskavice, čeprav vloga katepsina v psoriatičnih procesih še ni bila neposredno preučevana. (13)

### 3. Načrt dela

Da bi potrdili vlogo katepsina X kot terapevtske tarče za zdravljenje luskavice, bomo postavili celični model interakcije limfocitov T CD4+ s keratinociti, v katerem bomo preučevali vpliv katepsina X. Kot modelne keratinocite bomo uporabili kontinuirano celično linijo NCTC2544, kot modelne limfocite T pa kontinuirano celično linijo Jurkat z običajnim genotipom („wild-type“) in celično linijo Jurkat s stabilnim nadizražanjem katepsina X.

V prvem delu bomo določili ustrezne pogoje za nadaljnje eksperimente. S testom viabilnosti celic bomo preverili, kako zamenjava standardnega gojišča za celice NCTC2544 z gojiščem za celice Jurkat ali njuno zmesjo vpliva na preživetje celic NCTC2544 in na ta način izključili vpliv gojišča. S podobnim eksperimentom bomo predhodno ovrednotili tudi vpliv AMS36. S testom viabilnosti celic bomo nato preverili še vpliv kondicioniranih gojišč na preživetje oziroma proliferacijo modelnih keratinocitov, temu pa bo sledilo še preverjanje vpliva obeh limfocitnih linij na keratinocite v kokulturi.

V nadaljevanju bomo s fluorescenčno mikroskopijo določili lokalizacijo katepsina X in LFA-1 v celicah ter njuno morebitno kolokalizacijo v področju medceličnih stikov. S testom adhezije celic bomo preverili tudi, kako aktivnost katepsina X vpliva na adhezijo modelnih keratinocitov na podlago. Modelne keratinocite bomo izpostavili kondicioniranim gojiščem obeh limfocitnih linij, s čimer bomo preverili vpliv aktivnosti katepsina X preko dejavnikov, izločenih v gojišče. V nadaljevanju bomo pripravili kokulture modelnih keratinocitov z obema limfocitnima celičnima linijama, kar nam bo omogočilo opazovanje neposrednih interakcij celic preko površinskih molekul in vpliva katepsina X nanje. Za potrditev vpliva katepsina X bomo v določenih eksperimentih njegovo aktivnost zavrli z njegovim specifičnim inhibitorjem AMS 36.

## 4. Metode in materiali

### 4.1 Materiali

#### 4.1.1 Kemikalije in reagenti

**Preglednica I: Uporabljene kemikalije.**

<b>Kemikalija</b>	<b>Kakovost in koncentracija</b>	<b>Proizvajalec</b>
etanol	96 %, denaturiran	Stella TECH®
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O		Sigma - Aldrich®
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O		Merck®
NaCl		Sigma®
NaHCO <sub>3</sub>		Riedel - de Haën®
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		Merck®
NaN <sub>3</sub>		Merck®
natrijev acetat	brezvodni	Fluka®
KCl		Sigma - Aldrich®
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		Merck®
HCl	≥ 37 %, Ph. Eur.	Sigma - Aldrich®
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	95-97 %	Fluka®
citronska kislina		Fluka®
EDTA dinatrijeva sol dihidrat		Sigma - Aldrich®
DMSO		Sigma - Aldrich®
HEPES		Sigma - Aldrich®
Triton X-100		Serva®
Tween 20		Sigma - Aldrich®
L-cistein		Sigma - Aldrich®
formalin	10 % pufrana raztopina	Sigma - Aldrich®
L-glutamin	200 mM sterilna raztopina	Sigma - Aldrich®
nigrozin		Sigma - Aldrich®
raztopina penicilina in streptomicina	10000 enot/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina	Sigma- Aldrich®

## Preglednica II: Uporabljeni reagenti.

Reagent	Kakovost in koncentracija	Proizvajalec
Abz-FEK(Dnp)-OH	8,9 mM	sintetiziran na Katedri za farmacevtsko kemijo UL FFA po (11)
AMS36	10 mM raztopina v DMSO	sintetiziran na Katedri za farmacevtsko kemijo UL FFA po (17)
komplet reagentov za metodo DC merjenja koncentracije proteinov		Bio - Rad®
TMB		Sigma - Aldrich®
reagent proti bledenju ProLong® Gold		Molecular Probes®

### 4.1.2 Celična gojišča

## Preglednica III: Uporabljena celična gojišča.

Gojišče	Proizvajalec
Advanced RPMI 1640 Medium	Gibco®
MEM Eagle	Sigma - Aldrich®

### 4.1.3 Proteini

## Preglednica IV: Uporabljeni proteini.

Protein	Kakovost in koncentracija	Proizvajalec
goveji fetalni serum		Gibco®
tripsin - EDTA	0,5 M tripsin – EDTA (10×)	Gibco®
interferon $\gamma$	humani rekombinantni, 1 mg/mL	Invitrogen®
goveji serumski albumin	$\geq 98$ % čistost	Sigma - Aldrich®
katepsin X	humani rekombinantni, pripravljen v <i>P. pastoris</i>	pripravljen na Katedri za farmacevtsko biologijo UL FFA po (64)
fibronektin	humani, 1 mg/mL	BD Biosciences®

#### 4.1.4 Protitelesa

**Preglednica V: Uporabljena protitelesa.**

Protitelesa	Vrsta	Koncentracija	Proizvajalec
protitelesa proti katepsinu X	kozja poliklonska	0,5 mg/mL	R & D Systems®
protitelesa 5C1-3B10-2F7 proti katepsinu X	mišja monoklonska		pripravljena na Katedri za farmacevtsko biologijo UL FFA po (4)
protitelesa 5C1-3B10-2F7 proti katepsinu X, konjugirana s hrenovo peroksidazo	mišja monoklonska; konjugat		pripravljena na Katedri za farmacevtsko biologijo UL FFA po (4)
protitelesa proti integrinski verigi $\alpha_L$ (N-18)	kozja poliklonska, IgG	200 $\mu$ g/mL	Santa Cruz Biotechnology®
protitelesa proti ICAM-1	mišja monoklonska	1 mg/mL	Abcam®
protitelesa proti kozjim protitelesom IgG, konjugirana s fluorokromom Alexa Fluor® 555	oslova poliklonska; konjugat	2 mg/mL	Invitrogen®

#### 4.1.5 Celične linije

Uporabljene celične linije NCTC2544 in Jurkat smo pridobili iz celične banke ATCC. Celična linija Jurkat s stabilno nadizraženim katepsinom X (Jurkat-catX) je bila pripravljena na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani po (24).

## 4.2 Priprava gojišč in pufrov

### 4.2.1 Priprava gojišča za celice Jurkat in celice Jurkat-catX

Za pripravo 100 mL gojišča kRPMI za celice Jurkat smo uporabili:

**Preglednica VI: Sestavine gojišča kRPMI.**

Sestavina	Koncentracija	Volumen
Advanced RPMI 1640 Medium		88 mL
goveji fetalni serum	10,00 %	10 mL
200 mM raztopina L-glutamina	1,00 %	1 mL

Priprava je potekala v biološko varni komori z laminarnim pretokom zraka pod aseptičnimi pogoji. Pripravljeno gojišče smo shranili pri 2-8 °C. Pred uporabo smo gojišče v vodni kopeli ogreli na 37 °C. Enako gojišče smo uporabljali tako za celice Jurkat kot celice Jurkat-catX.

#### 4.2.2 Priprava gojišča za celice NCTC2544

Osnovno gojišče MEM smo pripravili iz gojišča MEM Eagle v obliki praška, tako da smo 9,6 g praška raztopili v 1000 mL prečiščene vode in raztopino sterilno prefiltrirali. Tako pripravljeno osnovno gojišče smo shranili pri 2-8 °C in ga prav tako pred uporabo vedno segreli na 37 °C v vodni kopeli.

Za pripravo 100 mL gojišča kMEM za celice NCTC2544 smo uporabili:

#### Preglednica VII: Sestavine gojišča kMEM.

Sestavina	Koncentracija	Volumen
osnovno gojišče MEM		88 mL
goveji fetalni serum	10,00 %	10 mL
raztopina L-glutamina	200 mM	1 mL
raztopina penicilina in streptomicina	10000 enot/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina	1 mL

#### 4.2.3 Priprava sterilnega izotoničnega fosfatnega pufru s pH=7,4 (1×PBS)

Za pripravo izotoničnega fosfatnega pufru PBS s pH=7,4 smo najprej pripravili desetkratni koncentrat pufru (10×PBS). Za 1000 mL smo zatehtali:

#### Preglednica VIII: Sestavine 10×PBS.

Sestavina	Koncentracija	Masa
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O		18 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		2,4 g
NaCl		80 g
KCl		2,0 g

Zatehtane soli smo kvantitativno prenesli v bučko in dodali destilirano vodo do končnega volumna 1000 mL. Za pripravo delovne koncentracije pufru (1×PBS) smo z merilnim

valjem odmerili 50 mL koncentriranega pufra in mu dodali 450 mL destilirane vode. Pripravljeno raztopino smo s pomočjo vodne črpalke sterilno filtrirali skozi mikrobiološki filter. Pripravljen pufer smo shranili pri 2-8 °C.

#### 4.2.4 Priprava sterilne raztopine 0,02 % EDTA v PBS

Za pripravo 500 mL 0,02 % EDTA v PBS smo 500 mL pufra 1×PBS dodali 537 µL predhodno pripravljene 0,5 M raztopine EDTA s pH=8,0. Raztopino smo premešali in s pomočjo vodne črpalke sterilno filtrirali. Pripravljen pufer smo shranili pri 2-8 °C.

#### 4.2.5 Priprava lizirnega pufra

Za pripravo 1000 mL lizirnega pufra smo zatehtali:

##### Preglednica IX: Sestavine lizirnega pufra.

Sestavina	Koncentracija	Masa
natrijev acetat		4,10 g
NaCl		5,84 g
Triton X-100		2,50 g
EDTA		0,29 g

Sestavine smo kvantitativno prenesli v bučko in dodali destilirano vodo do končnega volumna 1000 mL. Tako dobljenemu pufru smo pH uravnali na 5,5 z dodatkom koncentrirane HCl. Pripravljen pufer smo shranili pri 2-8 °C.

#### 4.2.6 Priprava pufrov za encimsko-immunski test

##### 4.2.6.1 Pufer A za vezavo protiteles na mikrotitrsko ploščo

Za 1000 mL pufra smo zatehtali:

##### Preglednica X: Sestavine pufra A.

Sestavina	Koncentracija	Masa
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		1,6 g
NaHCO <sub>3</sub>		2,9 g
NaN <sub>3</sub>		0,2 g

Sestavine smo kvantitativno prenesli v bučko in dopolnili z destilirano vodo do končnega



volumna. Pripravljenemu pufu smo izmerili pH in ga uravnali na 9,6 z nekaj kapljicami koncentrirane raztopine HCl. Pripravljen pufer smo shranili pri 2-8 °C.

#### 4.2.6.2 Pufer B za spiranje mikrotitrne plošče

Za pripravo 1000 mL pufra smo zatehtali:

##### Preglednica XI: Sestavine pufra B.

Sestavina	Koncentracija	Masa
NaCl		8,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O		1,34 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O		0,44 g
Tween 20		0,5 g

Sestavine smo kvantitativno prenesli v bučko, dopolnili z destilirano vodo do končnega volumna 1000 mL in uravnali pH na vrednost 7,2.

#### 4.2.6.3 Pufer C za blokado prostih vezavnih mest na mikrotitrski plošči

Zatehtali smo 2 g govejega serumskega albumina (BSA) in ga raztopili v 100 mL pufra B.

Tako pripravljen pufer smo shranili pri -20 °C in pred uporabo odmrznili.

#### 4.2.6.4 Substratni pufer

Za pripravo 0,2 M raztopine Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> smo raztopili 8,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O v 250 mL destilirane vode. Za pripravo 0,1 M raztopine citronske kisline smo raztopili 10,5 g citronske kisline monohidrata v 500 mL destilirane vode.

Za pripravo substratnega pufra smo nato zmešali:

##### Preglednica XII: Sestavine substratnega pufra.

Sestavina	Koncentracija	Volumen
raztopina Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 M	188,5 mL
raztopina citronske kisline	0,1 M	121,5 mL
destilirana voda		250 mL

Pripravljen pufer smo shranili pri 2-8 °C.

#### 4.2.6.5 Raztopina za prekinitev encimske reakcije

Za pripravo 2 M raztopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> smo razredčili 11,0 mL 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> z destilirano vodo do končnega volumna 100 mL.

#### 4.2.7 Priprava pufrov za test aktivnosti katepsina X

##### 4.2.7.1 Osnovni pufer

Za pripravo 500 mL pufra smo zatehtali:

##### Preglednica XIII: Sestavine osnovnega pufra.

Sestavina	Koncentracija	Masa
natrijev acetat		3,48 g
polietilenglikol 800		0,5 g

Sestavine smo kvantitativno prenesli v bučko in jo z destilirano vodo dopolnili do oznake. Pripravljenemu pufru smo izmerili pH in ga s koncentrirano HCl uravnali na vrednost 5,5. Pripravljen pufer smo shranili pri 2-8 °C.

##### 4.2.7.2 Aktivacijski pufer

Za pripravo 50 mL pufra smo uporabili:

##### Preglednica XIV: Sestavine aktivacijskega pufra.

Sestavina	Koncentracija	Količina
osnovni pufer		50,0 mL
L-cistein		30,29 mg
EDTA		27,9 mg

Zatehtana L-cistein ter EDTA smo prenesli v centrifugirko in ju raztopili v 50 mL osnovnega pufra. Tako pripravljen aktivacijski pufer smo shranili pri 2-8 °C do 14 dni.

### 4.3 Celične kulture

#### 4.3.1 Odmrzovanje celic

Kriovialo s celicami smo ob uporabi zaščitnih očal in rokavic vzeli iz Dewarjeve posode s tekočim dušikom in jo 2 minuti segrevali v vodni kopeli s temperaturo 37 °C. Vsebini krioviale smo nato dodali 1 mL ustreznega gojišča in nastalo suspenzijo celic v celoti prenesli v centrifugirko s 4 mL gojišča. Sledilo je centrifugiranje pri 1200 obratih na minuto, 5 minut. Po končanem centrifugiranju smo takoj odlili supernatant, sedimentirane

celice pa s pipeto resuspendirali v 1 mL gojišča. Nastalo suspenzijo celic smo v celoti prenesli v sterilno plastično posodico za gojenje celic z ustreznim gojiščem.

#### **4.3.2 Gojenje celic**

Celice Jurkat smo gojili v obliki suspenzijske celične kulture v sterilni plastični posodici T-25 za gojenje celic, postavljeni v celični inkubator s temperaturo 37 °C in atmosfero s 5 % CO<sub>2</sub>. Ko so celice v suspenziji dosegle gostoto celic 6-8×10<sup>5</sup> celic/mL, smo jih redčili v svežem gojišču s postopkom subkultivacije, ki smo ga praviloma izvedli vsaka 2 dni.

Celice NCTC2544 smo gojili v obliki adhezijske kulture v sterilnih plastični posodici T-75, postavljeni v celični inkubator, in jim na dva dni zamenjali gojišče. Postopek subkultivacije smo izvedli, ko so celice prerasle več kot 80 % površine posodice oziroma kadar so celice potrebovali za izvedbo eksperimentov.

##### **4.3.2.1 Subkultivacija celic**

Celično kulturo Jurkat smo prenesli v sterilno centrifugirko. Sledilo je centrifugiranje pri 1200 obratih na minuto, 5 minut. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, celice resuspendirali v 1 mL svežega gojišča in odvzeli vzorec celične suspenzije za štetje celic. Ustrezen volumen celične suspenzije smo nato prenesli v posodico za gojenje celic s 5 mL svežega gojišča, tako da smo dosegli ustrezno redčenje (praviloma 1:4 do 1:8).

Iz posodice s celično kulturo NCTC2544 smo najprej s pipeto odstranili staro gojišče. Celice smo nato previdno sprali s 5 mL 0,02 % raztopine EDTA v PBS. V posodico smo odpipetirali 5 mL 0,02 % raztopine EDTA v PBS s tripsinom (1 %), in jo 5 minut inkubirali v celičnem inkubatorju. Posodico smo pretresli pod mikroskopom preverili, ali so se celice v celoti odlepili. Vsebinsko posodico smo s pipeto prenesli v centrifugirko s 3 mL svežega gojišča. Sledilo je centrifugiranje pri 2000 obratih na minuto, 5 minut. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant, posedene celice pa resuspendirali v 1 mL svežega gojišča in odvzeli vzorec za štetje celic. Ustrezen volumen celične suspenzije (praviloma 125 µL) smo prenesli v posodico T-75 z 8 mL svežega gojišča, preostanek pa porabili za ostale eksperimente ali zavrgli.

##### **4.3.3 Zamrzovanje celic**

Postopek zamrzovanja celic smo uporabili za ohranjanje celične banke laboratorija in za shranjevanje celic za nadaljnjo uporabo med obdobji, kadar njihovo kontinuirano gojenje ni bilo mogoče ali smiselno.

Za zamrzovanje celic smo izhajali iz postopka subkultivacije. Po centrifugiranju celične suspenzije smo celice namesto v običajnem svežem gojišču resuspendirali v 1 mL

ustreznega gojišča z 10 % DMSO kot krioprotektantom in jih takoj prenesli v označeno kriovialo. Kriovialo smo nato takoj prenesli na -70 °C, kjer se je postopno ohlajala, naslednji dan pa smo jo prenesli v Dewarjevo posodo s tekočim dušikom, namenjeno shranjevanju celic.

#### **4.3.4 Štetje celic**

Celice smo prešteli s hemocitometrom pod obrnjenim svetlobnim mikroskopom. Vzorcem celične suspenzije (100 µL) smo pred štetjem dodali 100 µL raztopine nigrozina in 10 µL mešanice nanесли na stekelce z Bürker-Türkovo komoro. Prešteli smo žive (neobarvane) celice znotraj označenega območja mreže. Postopek štetja smo ponovili vsaj trikrat, nato pa iz povprečnega števila prešteti celic z upoštevanjem redčenja izračunali število celic v 1 mL oziroma število celic v prvotni celični suspenziji.

#### **4.3.5 Priprava celičnih lizatov**

Ko so celice dosegle ustrezno gostoto, smo izvedli postopek subkultivacije kot običajno. Po centrifugiranju smo odlili supernatant. Sedimentirane celice smo resuspendirali v 1 mL fosfatnega pufru (PBS), jim dodali 4 mL PBS in ponovno centrifugirali. Po drugem centrifugiranju smo ponovno odlili supernatant in sedimentiranim celicam dodali ustrezen volumen (okrog 100 do 200 µL, odvisno od količine sedimentiranih celic) lizirnega pufru, sedimentirane celice resuspendirali in prenesli v mikrocentrifugirko, ki smo jo čez noč zamrznili pri -80 °C.

Naslednji dan smo vsebino mikrocentrifugirke odtajali na ledu in jo v ultrazvočni kopeli izpostavili ultrazvoku (trikrat po 6 sekund). Sledilo je centrifugiranje pri 4 °C in maksimalnem številu obratov na minuto, 15 minut. Po centrifugiranju smo prenesli supernatant v čisto mikrocentrifugirko, iz te pa v ločeno mikrocentrifugirko prenesli še 20 µL alikvot, namenjen merjenju koncentracije proteinov. Mikrocentrifugirki smo zamrznili pri -80 °C.

#### **4.3.6 Priprava kondicioniranih gojišč**

V sterilno plastično posodico T-25 smo nacepili celice Jurkat v običajni koncentraciji ( $\sim 2 \times 10^5$  celic/mL). Po 24 oziroma 48 urah smo izvedli običajen postopek subkultivacije, le da po centrifugiranju supernatanta (gojišča) nismo zavrgli, ampak smo ga prenesli v novo centrifugirko in ga ponovno centrifugirali pri 2000 obratih/minuto. Po drugem centrifugiranju smo supernatant previdno prenesli v novo centrifugirko in ga do uporabe shranili pri -80 °C.

### **4.3.7 Indukcija izražanja receptorja ICAM-1 na celicah NCTC2544**

Za indukcijo izražanja receptorja smo celice NCTC2544 nacepili v plastično posodico T-75 za gojenje celic. 24 ur pred izvedbo poskusa smo celicam zamenjali gojišče s svežim, v katerega smo dodali INF- $\gamma$  v koncentraciji 200 U/mL.

### **4.4 Testi viabilnosti celic**

Za preučevanje citotoksičnosti različnih dejavnikov in njihovega vpliva na proliferacijo celic NCTC2544 smo uporabili test viabilnosti celic CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (v nadaljevanju test MTS) proizvajalca Promega, ki temelji na redukciji reagenta MTS do formazanskega produkta v prisotnosti mitohondrijskih reduktaz in kofaktorjev NADH ali NADPH.

Resuspendiranim celicam iz postopka subkultivacije smo določili številčno koncentracijo in jih ustežno redčili do koncentracije  $4 \times 10^4$  celic/mL,  $2,5 \times 10^4$  celic/mL in  $1,25 \times 10^4$  celic/mL. Po 100  $\mu$ L tako pripravljenih celičnih suspenzij smo napipetirali v sterilne plošče s 96 vdolbinicami. Za vsako koncentracijo smo uporabili svojo ploščo, saj smo meritev izvedli v treh časovnih točkah (24 h, 48 h in 72 h). Plošče smo inkubirali v celičnem inkubatorju.

Optimalne koncentracije za različne časovne točke smo predhodno empirično določili v ločenem poskusu, kjer smo na ploščo s 96 vdolbinicami nacepili celice v različnih koncentracijah in jih po 48 h, 72 h in 96 h preverili pod mikroskopom.

Celicam NCTC2544 smo po 24-urni inkubaciji gojišče zamenjali z različnimi testnimi gojišči. Po 100  $\mu$ L vsakega uporabljenega gojišča smo na plošče napipetirali v 3 vdolbinice s celicami. Za slepo kontrolo smo vsako uporabljeno gojišče napipetirali še v dve prazni vdolbinici. V vdolbinice na robu plošče smo napipetirali po 200  $\mu$ L sterilne destilirane vode. Plošče smo nato vrnili v inkubator in jih inkubirali 24 h (plošča z izhodiščno koncentracijo  $4 \times 10^4$  celic/mL), 48 h (plošča z izhodiščno koncentracijo  $2,5 \times 10^4$  celic/mL) oziroma 72 h (plošča z izhodiščno koncentracijo  $1,2 \times 10^4$  celic/mL).

Pri rokovanju z reagentom MTS smo ves čas skrbeli za zaščito pred svetlobo. V vsako vdolbinico smo odpipetirali 15  $\mu$ L reagenta MTS. Ploščo smo nato v inkubatorju inkubirali vsaj 30 minut oziroma do razvoja opaznega dovolj intenzivnega vijoličnega obarvanja. Po inkubaciji smo s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč izmerili absorbanco pri 492 nm. Od povprečja signalov za posamezno gojišče smo odšteli povprečje signalov ustrezne slepe raztopine in rezultate podali primerjalno glede na celice NCTC2544 v njihovem običajnem gojišču.

#### 4.4.1 Test viabilnosti celic NCTC2544 v kokulturah

Za preučevanje viabilnosti celic NCTC2544 v kokulturi z obema limfocitnima celičnima linijama smo poskus prilagodili tako, da smo kot testno gojišče pri poglavju 4.4 uporabili suspenziji celic Jurkat in celic Jurkat-catX v zmesi gojišč kMEM in kRPMI v razmerju 1:1. Uporabljeni suspenziji sta imeli koncentracijo  $8 \times 10^4$  celic/mL (za 24 h) oziroma  $2 \times 10^4$  celic/mL (za 72 h). Ustrezni celični suspenziji smo na ploščo v trojniku napipetirali tudi kot slepi kontroli.

#### 4.5 Priprava preparatov za konfokalno mikroskopijo

48 ur pred pripravo preparatov smo v vdolbinice plošče s 24 vdolbinicami položili okroglo krovno stekelce za priraščanje celic. V vdolbinice smo nato nacepili po 500  $\mu$ L celic NCTC2544 s koncentracijo  $6 \times 10^3$  celic/mL. Po 24 urah inkubacije smo celicam zamenjali gojišče z enakim volumnom testnega gojišča oziroma (pri preparatih s kokulturami) ustrezne celične suspenzije celic Jurkat ali Jurkat-catX. Delali smo v dvojniku.

Za preparate, pri katerih smo označili LFA-1 in katapsin X, smo uporabili:

#### Preglednica XV: Uporabljena gojišča in celične suspenzije (LFA-1 in katapsin X).

Testno gojišče/celična suspenzija			Dodatek
Celice	Število celic	Gojišče	
/	/	kMEM	
Jurkat	$6 \times 10^3$ celic/vdolbinico	kMEM:kRPMI=1:1	
Jurkat	$6 \times 10^3$ celic/vdolbinico	kMEM:kRPMI=1:1	10 $\mu$ M AMS36
Jurkat-catX	$6 \times 10^3$ celic/vdolbinico	kMEM:kRPMI=1:1	
Jurkat-catX	$6 \times 10^3$ celic/vdolbinico	kMEM:kRPMI=1:1	10 $\mu$ M AMS36

Za preparate, pri katerih smo označili LFA-1 in ICAM-1, smo uporabili:

#### Preglednica XVI: Uporabljena gojišča in celične suspenzije (LFA-1 in ICAM-1).

Testno gojišče/celična suspenzija			Dodatek
Celice	Število celic	Gojišče	
/	/	kMEM	
/	/	kMEM	200U/mL INF- $\gamma$
Jurkat	$6 \times 10^3$ celic/vdolbinico	kMEM:kRPMI=1:1	
Jurkat	$6 \times 10^3$ celic/vdolbinico	kMEM:kRPMI=1:1	200U/mL INF- $\gamma$
Jurkat-catX	$6 \times 10^3$ celic/vdolbinico	kMEM:kRPMI=1:1	
Jurkat-catX	$6 \times 10^3$ celic/vdolbinico	kMEM:kRPMI=1:1	200U/mL INF- $\gamma$

Po 24 urah inkubacije smo pri sobni temperaturi izvedli postopek priprave preparatov za fluorescenčno mikroskopijo. Najprej smo odstranili gojišče in krovna stekelca nežno sprali z 1 mL pufra PBS. Po spiranju smo celice fiksirali na krovna stekelca s 500  $\mu$ L 10 % raztopine formalina. Po fiksaciji, ki je trajala 30 do 45 minut, smo vdolbinice ponovno sprali z 1 mL PBS.

Sledila je permeabilizacija celic s 500  $\mu$ L 0,5 % Tweena 20 v PBS in inkubacijo 10 minut, nato pa smo stekelca sprali z 1 mL PBS. Sledila je blokada prostih vezavnih mest s 500  $\mu$ L 3 % raztopine govejega serumskega albumina (BSA) v PBS. Inkubacija je trajala 30 minut. Po blokadi smo blokirno raztopino odstranili in v vdolbinice napipetirali 200  $\mu$ L ustrezno redčene raztopine primarnih protiteles in inkubirali 2 uri. Po inkubaciji smo vdolbinice sprali s PBS, tako da smo v roku 5 minut v vsaki vdolbinici trikrat zamenjali PBS.

Primarna protitelesa smo do ustrezne koncentracije redčili s 3 % BSA v PBS. Zaradi omejitev metode smo v sklopu enega eksperimenta naenkrat označili po dva proteina (LFA-1/katepsin X ali LFA-1/ICAM-1). Uporabili smo naslednja protitelesa:

**Preglednica XVII: Uporabljeni primarna protitelesa.**

Označen protein	Protitelo	Končna koncentracija
katepsin X	mišja monoklonska proti katepsinu X	10 $\mu$ g/mL
LFA-1	kozja poliklonska proti $\alpha_L$ integrinski verigi (N-18)	0,85 $\mu$ g/mL
ICAM-1	mišja monoklonska proti ICAM-1	10 $\mu$ g/mL

Po zadnji menjavi smo s pipeto odstranili PBS iz vdolbinic in vanje dodali 200  $\mu$ L raztopine obeh fluorescenčno označenih sekundarnih protiteles (konjugatov), ki smo jih predhodno razredčili s 3 % BSA v PBS v razmerju 1:1000. Uporabili smo naslednje konjugate:

**Preglednica XVIII: Uporabljeni sekundarna protitelesa (konjugati).**

Konjugat Protitelesa	Fluorokrom	Končna koncentracija
oslova proti mišjim protitelesom	Alexa Fluor 488	2 $\mu$ g/mL

Po dodatku sekundarnih protiteles smo ploščo inkubirali 2 uri. Po končani inkubaciji smo vdolbinice znova sprali s PBS. Krovna stekelca smo nato prenesli na filter papir, kjer so se posušila. Na objektno stekelce smo kanili kapljico reagenta za zaščito proti bledenju in posušena objektna stekelca s celično stranjo navzdol poveznili čeznjo ter odstranili

morebitne prisotne zračne mehurčke. Tako pripravljene preparate smo shranili pri 4 °C. Naslednji dan smo rob krovnega stekelca oblepili s prozornim lakom za nohte in preparate, zaščitene pred svetlobo, shranili pri 4 °C.

#### **4.6 Konfokalna mikroskopija**

Pripravljene preparate smo opazovali s konfokalnim fluorescenčnim mikroskopom proizvajalca Zeiss. Uporabili smo vzbujevalna laserja z valovnimi dolžinama 488 nm in 555 nm. Posneli smo več slik naključno izbranih področij vsakega preparata pod enakimi pogoji slikanja. Opazovali smo intenziteto in lokalizacijo fluorescence v celicah ter njihovo morfologijo. V posameznih celicah smo iskali kolokalizacijo proteinov katepsin X in LFA-1 ter kolokalizacijo proteinov LFA-1 in ICAM-1.

#### **4.7 Test adhezije celic**

Adhezijo celic NCTC2544 pod različnimi pogoji smo določali s pomočjo celičnega analizatorja v realnem času xCELLigence<sup>®</sup> System (Real-Time Cell Analyzer Dual Plate (RTCA DP) Instrument) proizvajalca ACEA Biosciences<sup>®</sup>.

Na dno vdolbinic plošče E smo, kadar je bilo to potrebno, najprej adsorbirali fibronektin. Nato smo vdolbinice sprali s PBS in vanje napipetirali po 100 µL ustreznih gojišč, vstavili ploščo v aparaturu in po 15 minutah izmerili signal ozadja. V vdolbinice smo nato dodali po 100 µL ustrezne celične suspenzije. Vse uporabljene kombinacije celic in gojišč smo nanесли v dvojniku. V prostor okrog vdolbinic smo napipetirali sterilno destilirano vodo in ploščo vstavili nazaj v aparaturu. Po 10 minutah smo začeli z meritvami celičnega indeksa, ki predstavlja relativno spremembo električne impedance kot posledico sprememb v stanju celic, v našem primeru adhezije celic. Meritve celičnega indeksa so se med potekom eksperimenta (72 ur) izvajale vsakih 15 minut. Rezultate smo nato obdelali z ustrežno programsko opremo. Za izračun hitrosti adhezije smo uporabili podatke iz prvih 3 ur poskusa.

Za vzorce s celicami NCTC2544 smo uporabili naslednja testna gojišča in celične suspenzije:



**Preglednica XIX: Gojišča in celične suspenzije za vzorce s celicami NCTC2544.**

Gojišče brez celic		Celična suspenzija	
Osnovno gojišče	Dodatek	Celice	Gojišče
kMEM	/	NCTC2544	kMEM
kRPMI	/	NCTC2544	kRPMI
kMEM/kRPMI	/	NCTC2544	kMEM/kRPMI
kondicionirano Jurkat	/	NCTC2544	kondicionirano Jurkat
kondicionirano Jurkat-catX	/	NCTC2544	kondicionirano Jurkat-catX
kMEM:kRPMI=1:1	/	NCTC2544	kMEM:kRPMI=1:1
kMEM:kRPMI=1:1	4 µM katepsin X	NCTC2544	kMEM:kRPMI=1:1
kMEM:kRPMI=1:1	20 µM AMS36	NCTC2544	kMEM:kRPMI=1:1
kMEM:kRPMI=1:1	400 U/mL INF-γ	inducirane NCTC2544	kMEM:kRPMI=1:1

Za vzorce s kokulturami smo uporabili naslednja gojišča in celične suspenzije:

**Preglednica XX: Gojišča in celične suspenzije za vzorce s kokulturami.**

Gojišče brez celic		Celična suspenzija	
Osnovno gojišče	Dodatek	Celice	Gojišče
kMEM:kRPMI=1:1	/	NCTC2544 + Jurkat	kMEM:kRPMI=1:1
kMEM:kRPMI=1:1	4 µM katepsin X	NCTC2544 + Jurkat	kMEM:kRPMI=1:1
kMEM:kRPMI=1:1	20 µM AMS36	NCTC2544 + Jurkat	kMEM:kRPMI=1:1
kMEM:kRPMI=1:1	400 U/mL INF-γ	inducirane NCTC2544 + Jurkat	kMEM:kRPMI=1:1
kMEM:kRPMI=1:1	/	NCTC2544 + Jurkat-catX	kMEM:kRPMI=1:1
kMEM:kRPMI=1:1	4 µM katepsin X	NCTC2544 + Jurkat-catX	kMEM:kRPMI=1:1
kMEM:kRPMI=1:1	20 µM AMS36	NCTC2544 + Jurkat-catX	kMEM:kRPMI=1:1
kMEM:kRPMI=1:1	400 U/mL INF-γ	inducirane NCTC2544 + Jurkat-catX	kMEM:kRPMI=1:1

Koncentracija celic v suspenziji (tako NCTC2544 kot Jurkat) je bila  $5 \times 10^4$  celic/mL.

#### **4.8 Merjenje koncentracije proteinov v celičnih lizatih**

Koncentracijo proteinov v celičnih lizatih smo določali s kompletom kemikalij za metodo DC proizvajalca Bio-Rad®, ki temelji na Lowryjevi metodi določanja koncentracije proteinov. Meritev smo izvedli po navodilih proizvajalca na mikrotitrski plošči.

Pred meritvijo smo celične lizate odtalili na ledu in jih ustrezno razredčili z lizirnim pufrom. Reagente smo pred uporabo segreti v inkubatorju pri 37 °C. Kot standard smo uporabili goveji serumski albumin (BSA). Izhajali smo iz vodne raztopine BSA s koncentracijo 10 mg/mL, iz katere smo v mikrocentrifugirkah pripravili po 25 µL raztopin standardov s koncentracijami 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL in 1,5 mg/mL, ki so služile za umeritveno krivuljo. Kot slepo raztopino smo uporabili lizirni pufer.

Pred meritvijo smo pripravili ustrezen volumen reagenta A', tako da smo na 1 mL reagenta A (alkalne raztopine bakrovega tartrata) dodali 20 µL reagenta S (raztopine surfaktanta). Na mikrotitrsko ploščo smo v ločene vdolbinice napipetirali po 5 µL vsake od raztopin standardov različnih koncentracij, slepe raztopine in vzorcev v vseh treh razredčitvah. Vsako od teh raztopin smo napipetirali v dvojniku (v dve ločeni vdolbinici). V vse vdolbinice smo nato z avtomatsko pipeto napipetirali še 25 µL reagenta A' in 200 µL reagenta B (razredčenega Folinovega reagenta). Mikrotitrsko ploščo smo nato stresali 5 sekund in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo izmerili absorbanco pri 750 nm s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč. Koncentracijo proteinov v razredčenih vzorcih smo izračunali iz umeritvene krivulje, iz te pa nato izračunali koncentracijo proteinov v prvotnih vzorcih. Pri izračunu slednje smo uporabili podatke za vzorec tiste razredčitve, katere absorbanca je ležala znotraj območja umeritvene krivulje.

#### **4.9 Merjenje koncentracije katepsina X v celičnih lizatih**

Na mikrotitrski plošči smo dan pred izvedbo meritve v vdolbinice odpipetirali 50 µL raztopine kozjih poliklonskih protiteles proti katepsinu X, predhodno razredčenih s pufrom A do končne koncentracije 2,5 µg/mL. Ploščo smo nato prekrili s samolepilnim trakom in jo čez noč inkubirali pri 4 °C.

Naslednji dan smo ploščo trikrat sprali s pufrom B in jo otresli na papirnato brisačo. Za vsa spiranja smo uporabili napravo za avtomatsko spiranje mikrotitrskih plošč. V tako izpraznjene vdolbinice smo nato napipetirali 130 µL pufr C in ploščo inkubirali 1 h pri sobni temperaturi.

Med inkubacijo smo pripravili redčitveno lestvico standarda, vzorce in slepo kontrolo. Kot standard smo uporabili rekombinantni katepsin X, pripravljen v *P. pastoris* po (64). Osnovno raztopino standarda smo v dveh korakih razredčili s pufrom C do koncentracije 65 ng/mL, nato pa iz slednje raztopine z zaporednim redčenjem s pufrom C v razmerju 1:1 pripravili serijo sedmih standardnih raztopin s koncentracijami od 65 do 1,01 ng/mL. Vzorce celičnih lizatov smo s pufrom C razredčili do končne koncentracije celokupnih proteinov 200 µg/mL, kot slepo kontrolo pa smo uporabili sam pufer C.

Po končani inkubaciji smo iz vdolbinic odstranili blokirni pufer in ploščo otresli na papirnato brisačo. Na ploščo smo v ločene vdolbinice v dvojniku napipetirali po 100 µL raztopine standardov, slepe kontrole in pripravljenih vzorcev. Ploščo smo ponovno pokrili s samolepilnim trakom in inkubirali 2 uri pri 37 °C.

Po končani inkubaciji smo ploščo ponovno trikrat sprali s pufrom B in otresli na papirnato brisačo. V vsako vdolbinico smo nato dodali 100 µL konjugata protiteles 5C1-3B10-2F7 proti katepsinu X s hrenovo peroksidazo, ki smo ga predhodno razredčili s pufrom C v razmerju 1:2500. Ploščo smo nato ponovno pokrili s samolepilnim trakom in jo inkubirali 2 uri pri 37 °C.

Po končani inkubaciji smo ploščo trikrat sprali s pufrom B in jo otresli na papirnato brisačo. V vsako luknjico smo nato z avtomatsko pipeto napipetirali 200 µL substrata TMB, predhodno redčenega s substratnim pufrom v razmerju 1:1, in ploščo v temi inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Ob izteku časovnega intervala smo reakcijo prekinili z dodatkom 50 µL 2 M raztopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ki smo jo dodali v vsako vdolbinico. Absorbanco pri 450 nm smo izmerili s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč, koncentracijo katepsina X pa izračunali iz umeritvene krivulje. Rezultat smo podali na celokupno količino proteinov v vzorcu.

#### **4.10 Merjenje aktivnosti katepsina X v celičnih lizatih**

Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih smo merili z metodo kinetične meritve porasta fluorescence kot posledice cepitve fluorogenega peptidnega substrata Abz-FEK(Dnp)-OH, specifičnega za katepsin X.

Kot standard smo uporabili rekombinantni katepsin X, ki smo ga z aktivacijskim pufrom redčili do koncentracije 30 nmol/mL (250 µL). Kot slepo raztopino smo uporabili sam aktivacijski pufer. Celične lizate smo odtalili na ledu in jih v mikrocentrifugirki razredčili z aktivacijskim pufrom, da smo dobili 250 µL vzorca s koncentracijo proteinov 0,2 mg/mL.

Tako pripravljene vzorce smo skupaj s pripravljeno raztopino standarda in slepo raztopino 10 minut inkubirali na vodni kopeli pri 37 °C, da je potekla aktivacija. Po aktivaciji smo na črno mikrotitrsko ploščo v ločene vdolbinice napipetirali dvakrat po 95 µL pripravljenih raztopin. V vsako luknjico smo predhodno z avtomatsko pipeto napipetirali 5 µL raztopine substrata Abz-FEK(Dnp)-OH, ki smo ga predhodno razredčili z osnovnim pufrom do koncentracije 100 µM. Takoj po dodatku vzorcev smo ploščo vstavili v čitalec mikrotitrskih plošč in začeli s kinetičnimi meritvami fluorescence pri 420 nm, pri čemer je ekscitacija potekala pri 320 nm. Celotna meritev je potekala pri 37 °C.

Kot merilo aktivnosti katepsina X smo uporabili povprečno hitrost naraščanja fluorescence na linearnem delu krivulje intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa. Kot oceno smo nato iz podatkov standarda izračunali tudi koncentracijo aktivnega katepsina X v vzorcu, predvsem pa je poskus služil kvalitativni oceni aktivnosti katepsina X v celičnih lizatih in primerjavi rezultatov med različnimi celičnimi linijami.

#### **4.11 Statistična obdelava podatkov**

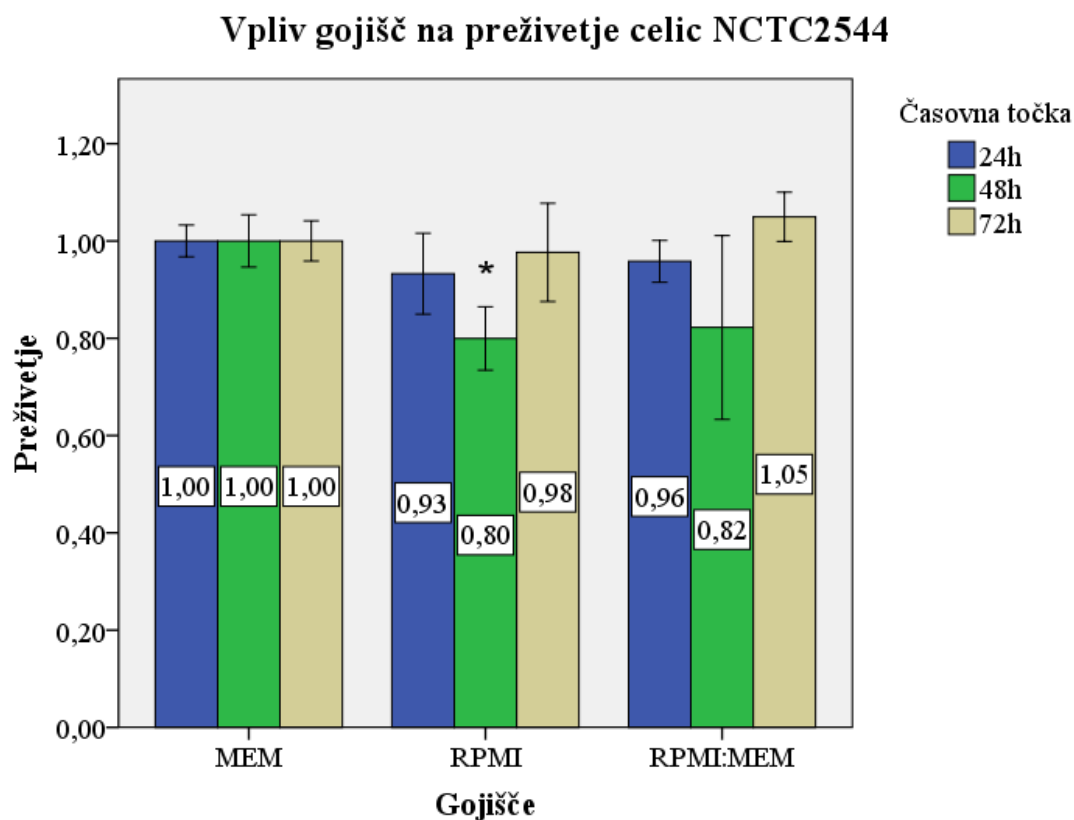
Statistično obdelavo podatkov smo izvedli s programoma Excel® (Microsoft) in SPSS (IBM). Za testiranje statistične značilnosti razlik med dvema vzorcema smo uporabili Studentov t-test, za primerjave več kot dveh vzorcev pa enofaktorsko analizo variance. Pri slednji smo za izbiro testa post-hoc predhodno naredili Levenov test enakosti varianc; v primeru, da so se variance vzorcev statistično značilno razlikovale, smo uporabili Games-Howellov test, sicer pa smo uporabili Bonferronijev test. Za mejo statistične značilnosti smo privzeli vrednost  $\alpha=0,05$ .

## 5. Rezultati

### 5.1 Testi preživetja celic

#### 5.1.1 Vpliv različnih gojišč na preživetje celic NCTC2544

Pri testiranju viabilnosti celic NCTC2544 smo najprej preverili vpliv zamenjave njihovega običajnega gojišča (kMEM) s kRPMI ter njuno zmesjo v razmerju 1:1. Normalizirane rezultate prikazuje slika 1.



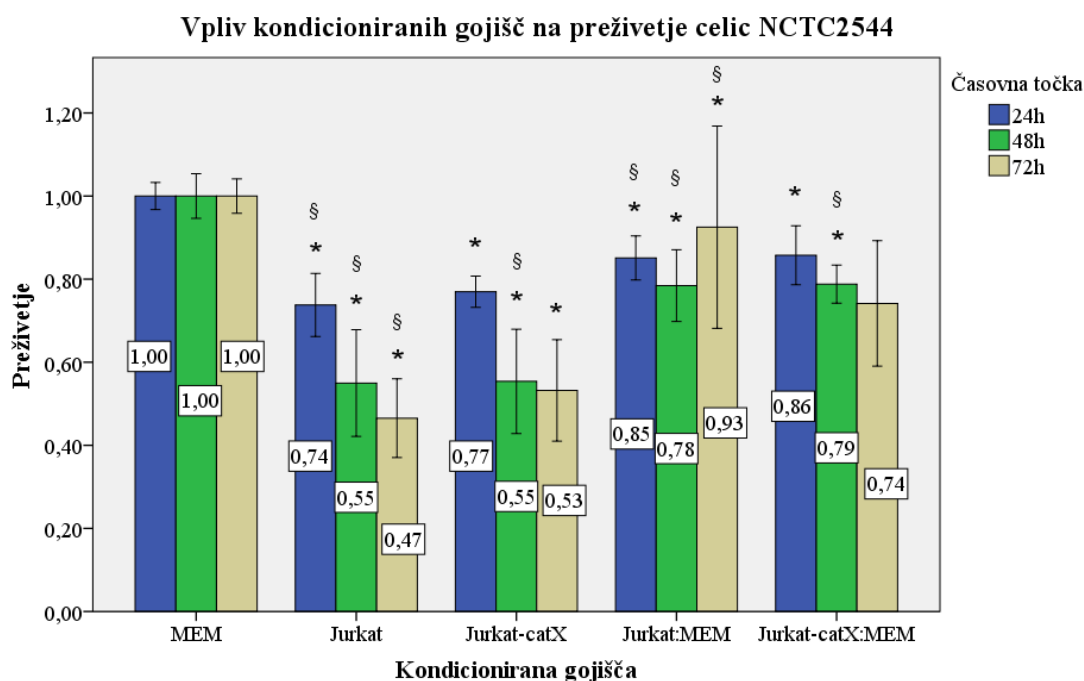
**Slika 1: Vpliv gojišč na preživetje celic NCTC2544.** Rezultati so normalizirani na preživetje v gojišču kMEM v isti časovni točki. Navpične črte na stolpcih prikazujejo 95 % interval zaupanja. Znak \* označuje statistično značilno razliko ( $p < 0,05$ ) med preživetjem v danem gojišču in kontrolo (kMEM). Prikazano je povprečje treh poskusov. MEM – kompletno MEM gojišče; RPMI – kompletno RPMI gojišče; RPMI:MEM – zmes kompletnega MEM in kompletnega RPMI gojišča v razmerju 1:1.

Preživetje v gojišču kRPMI je bilo v primerjavi s kMEM nekoliko slabše, vendar je bila razlika statistično značilna le po 48 urah, ko je bila opažena tudi največja razlika v preživetju. Vpliv zmesi gojišč kMEM in kRPMI na preživetje je bil podoben, le da zaradi večje variabilnosti ni bilo statistično značilnih razlik niti po 48 urah, preživetje po 72 urah pa je bilo celo nekoliko večje.

### 5.1.2 Vpliv kondicioniranih gojišč na preživetje celic NCTC2544

Preživetje celic NCTC2544 v kondicioniranih gojiščih obeh T-limfocitnih celičnih linij prikazuje slika 2. Preživetje v kondicioniranih gojiščih je bilo v praktično vseh primerih statistično značilno slabše v primerjavi s kontrolnim gojiščem, prav tako pa je bil opazen tudi določen trend upadanja preživetja v kasnejših časovnih točkah. Izjemo pri obeh opažanjih predstavlja zmes kondicioniranega gojišča celic Jurkat-catX in gojišča kMEM, pri kateri je prišlo do večje variabilnosti med meritvami.

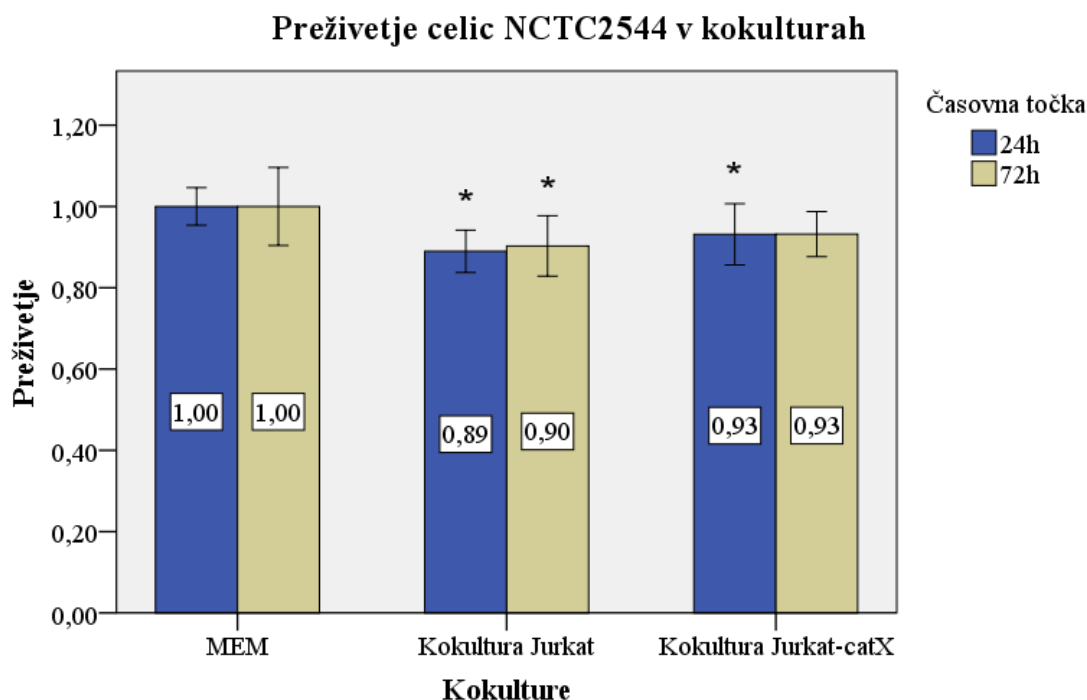
Tudi sicer je bilo preživetje v mešanih gojiščih v štirih od šestih primerov statistično značilno večje kot v pripadajočih čistih kondicioniranih gojiščih v isti časovni točki, opazili pa smo tudi manj izrazito upadanje preživetja s trajanjem eksperimenta. Razlike med preživetjem v kondicioniranih gojiščih celic Jurkat in celic Jurkat s povečanim izražanjem katepsina X so bile majhne in statistično neznačilne, enako pa velja tudi za njune zmesi z gojiščem kMEM.



**Slika 2: Vpliv kondicioniranih gojišč na preživetje celic NCTC2544.** Preživetja so normalizirana na preživetje v kontrolnem gojišču kMEM v isti časovni točki. Navpične črte na stolpcih predstavljajo 95 % interval zaupanja. Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v primerjavi s kontrolnim gojiščem so označene z \*, statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v preživetju med kondicioniranim gojiščem in njegovo zmesjo s kMEM pa s §. Prikazani so povprečni rezultati dveh eksperimentov. Jurkat – kondicionirano gojišče celic Jurkat; Jurkat-catX – kondicionirano gojišče celic Jurkat-catX; Jurkat:MEM in Jurkat-catX:MEM – zmes ustreznega kondicioniranega gojišča z gojiščem kMEM v razmerju 1:1.

### 5.1.3 Vpliv kokultur s celicami Jurkat in Jurkat-catX na preživetje celic NCTC2544

Preživetja celic NCTC2544 v kokulturah s celicami Jurkat in celicami Jurkat-catX prikazuje slika 3. Preživetje celic NCTC2544 je bilo v obeh kokulturah nekoliko slabše v primerjavi s kontrolo, pri čemer je bila razlika pri kokulturi s celicami Jurkat statistično značilna v obeh časovnih točkah, pri kokulturi s celicami Jurkat-catX pa le po 24 h. Razlike med obema kokulturama niso bile statistično značilne.

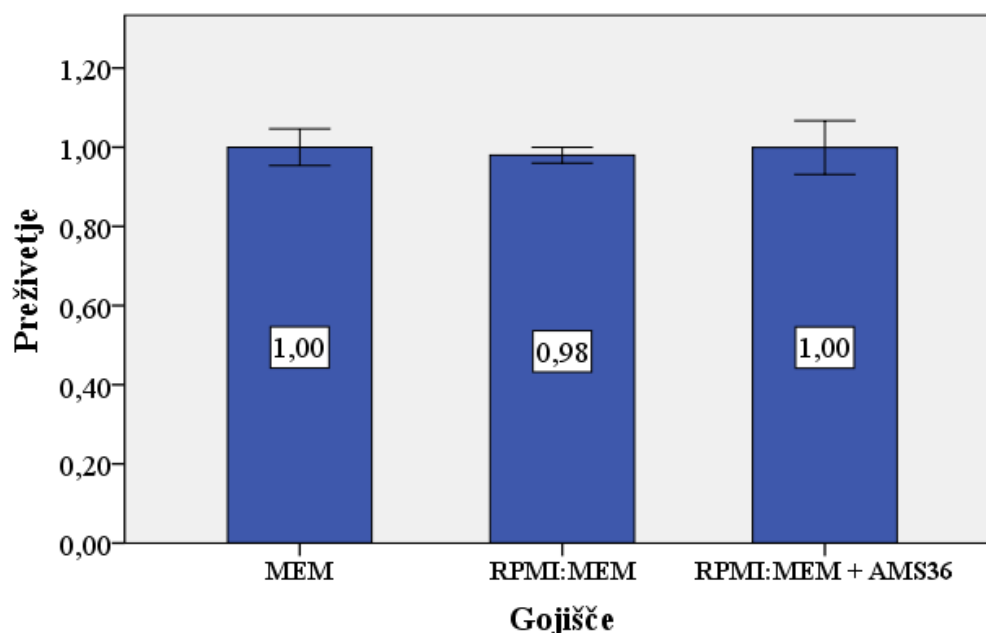


**Slika 3: Preživetje celic NCTC2544 v kokulturah.** Preživetja celic NCTC2544 so normalizirana na preživetje v kulturi samih celic NCTC2544 v gojišču kMEM v isti časovni točki. Navpične črte na stolpcih predstavljajo 95 % interval zaupanja. Statistično značilne razlike med preživetjem v kokulturi in kontrolo so označene z \*. MEM – kultura celic NCTC2544 v gojišču kMEM; Kokultura Jurkat – kokultura celic NCTC2544 s celicami Jurkat; Kokultura Jurkat-catX – kokultura celic NCTC2544 s celicami Jurkat-catX

### 5.1.4 Vpliv AMS36 na preživetje celic NCTC2544

Vpliv AMS36 na preživetje celic NCTC2544 po 24 urah prikazuje slika 4. Dodatek AMS36 v zmes gojišč kMEM in kRPMI v razmerju 1:1 ni privedel do statistično značilnih sprememb v preživetju ne v primerjavi z enakim gojiščem brez inhibitorja niti v primerjavi s kontrolnim gojiščem kMEM.

### Vpliv AMS36 na preživetje celic NCTC2544

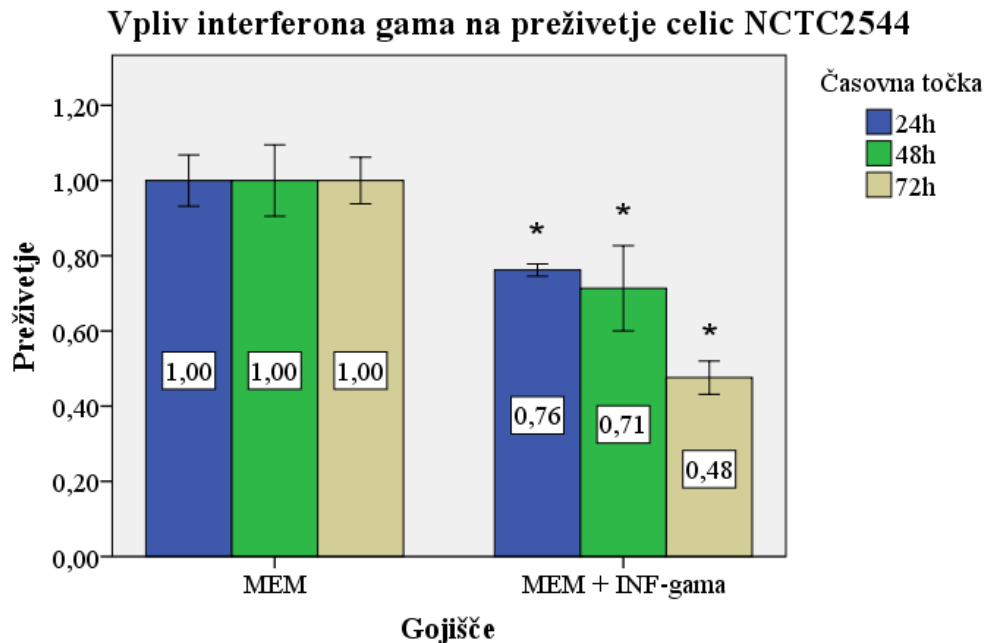


**Slika 4: Vpliv AMS36 na preživetje celic NCTC2544.** Prikazana preživetja celic so normalizirana na kontrolno gojišče kMEM. Navpične črte na stolpcih predstavljajo 95 % interval zaupanja. MEM – gojišče kMEM; RPMI:MEM – zmes gojišč kMEM in kRPMI v razmerju 1:1.

#### 5.1.5 Vpliv interferona $\gamma$ na preživetje celic NCTC2544

Preživetje celic NCTC2544 v gojišču kMEM z dodanim interferonom  $\gamma$  in brez njega prikazuje slika 5. Dodatek interferona  $\gamma$  je privedel do statistično značilnega zmanjšanja preživetja celic NCTC2544 v primerjavi s kontrolo v vseh časovnih točkah. Znižanje preživetja je bilo najbolj izrazito po 72 urah, ko je v primerjavi s kontrolo upadlo za več kot polovico. Ti rezultati so skladni z opažanji iz drugih poskusov, denimo testa adhezije, kjer po več kot 72 urah na testni ploščici v luknjicah z INF- $\gamma$  praktično ni bilo več mogoče opaziti živih celic.





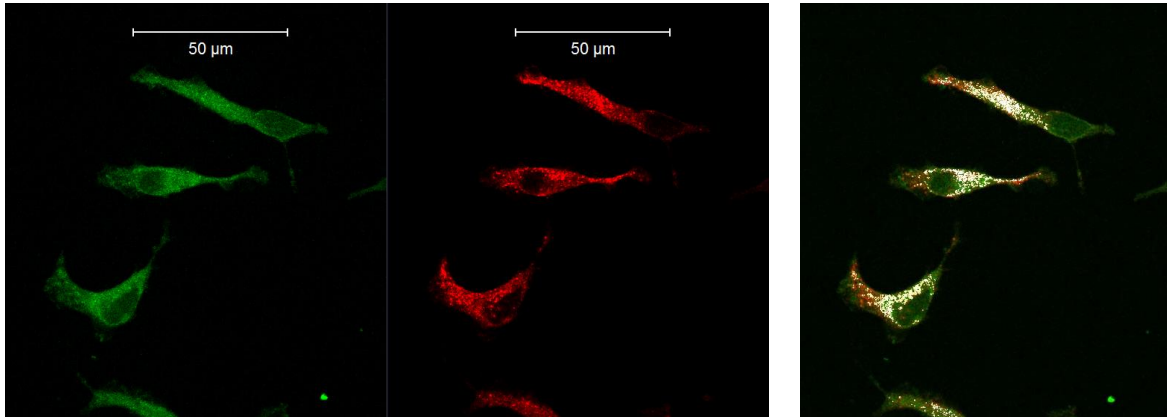
**Slika 5: Vpliv interferona  $\gamma$  na preživetje celic NCTC2544.** Prikazana so preživetja celic NCTC2544, normalizirana glede na kontrolno gojišče v isti časovni točki. Navpične črte na stolpcih predstavljajo 95 % interval zaupanja. Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v primerjavi s kontrolo so označene z \*. MEM – kompletno MEM gojišče.

## 5.2 Konfokalna mikroskopija

### 5.2.1 LFA-1 in katepsin X

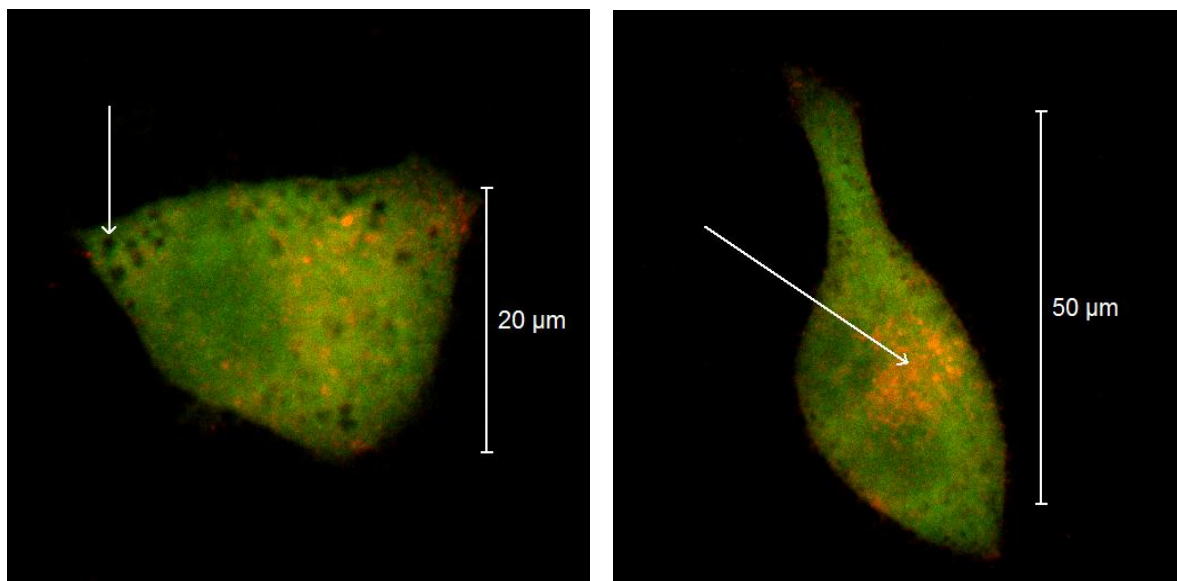
#### 5.2.1.1 Kultura NCTC2544

Razporeditev katepsina X in LFA-1 v celicah NCTC2544 v običajnih pogojih prikazuje slika 6. Oba proteina sta bila dobro vidna po bolj ali manj celotni celici z občutnim upadom fluorescence v področju jedra, ki je bil bolj izrazit pri LFA-1 kot pri katepsinu X. Poleg tega je bilo obarvanje LFA-1 nekoliko bolj znato in manj enakomerno, z večjo koncentracijo bolj intenzivno obarvanih zrn v nekaterih delih citoplazme v primerjavi z ostalimi. Ne glede na to ni bilo videti, da bi se kateri od označenih proteinov koncentriral v bližini celične membrane ali v območju celičnih stikov, sta se pa oba proteina v veliki meri nahajala na istih mestih v celici in tako izkazovala razmeroma visoko stopnjo kolokalizacije.



**Slika 6: Kultura celic NCTC2544.** Prvi dve sliki prikazujeta razporeditev katepsina X (zelena) in LFA-1 (rdeča) v celicah NCTC2544. Rdeča daljica prikazuje merilo (50 µm). Tretja slika prikazuje združeno sliko; bela barva označuje območja z visoko intenziteto obeh fluorescenc (kolokalizacijo).

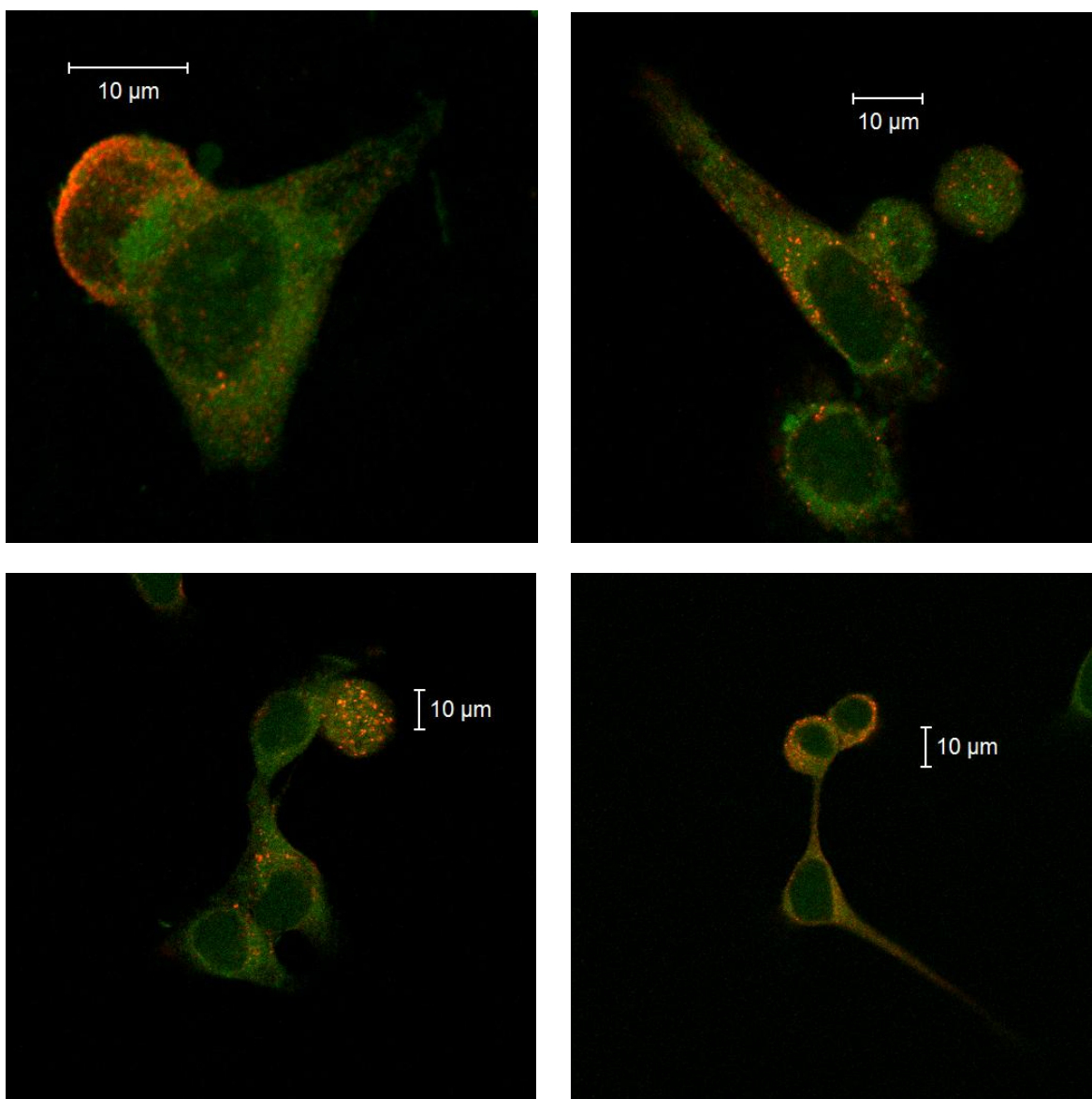
Ob dodatku AMS36 je vzorec porazdelitve obeh proteinov po celici v splošnem ostal enak, opazili pa smo bolj izrazita (citoplazemska) področja brez obeh proteinov in bolj izrazita območja z več LFA-1, kot prikazuje slika 7.



**Slika 7: Celice NCTC2544 v pristonosti AMS36.** Zelena barva označuje fluorescenco katepsina X, rdeča pa LFA-1. Sliki prikazujeta dva primera celic NCTC2544 v gojišču z dodanim AMS36. Puščici označujeta področja brez katepsina X in LFA-1 (leva slika) in področje z višjo intenziteto fluorescence LFA-1 (desna slika).

### 5.2.1.2 Kokultura celic NCTC2544 in celic Jurkat/Jurkat-catX

Porazdelitev LFA-1 in katepsina X v celicah NCTC2544 se v nobeni od kokultur ni bistveno razlikovala od porazdelitve v monokulturi pri običajnih pogojih. Prav tako nanjo nista imela jasnega vpliva niti uporabljena limfocitna linija (Jurkat ali Jurkat-catX) niti dodatek AMS36, opaziti pa je bilo mogoče precejšnje razlike med posameznimi celicami v istem preparatu, npr. v enakomernosti obarvanja LFA-1 in morfologiji celic.



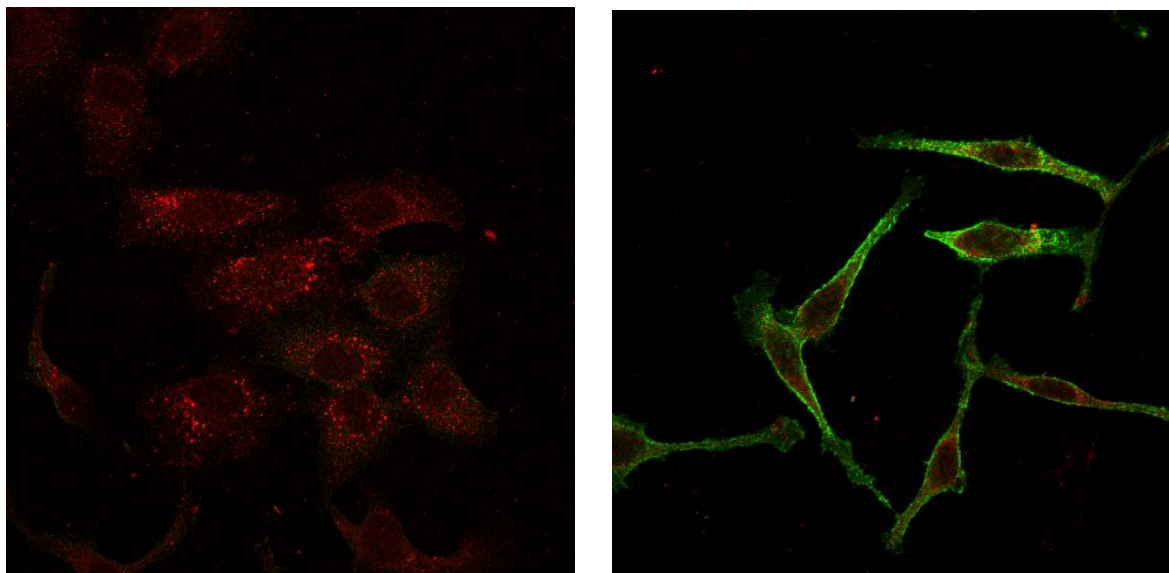
**Slika 8: Celični stiki med celicami NCTC2544 in Jurkat/Jurkat-catX v kokulturah.** Zelena barva predstavlja katepsin X, rdeča pa LFA-1. Rdeče daljice prikazujejo merilo (10 µm). Zgoraj levo: kokultura s celicami Jurkat; zgoraj desno: kokultura s celicami Jurkat z dodanim AMS36; spodaj desno: kokultura s celicami Jurkat-catX; spodaj levo: kokultura s celicami Jurkat-catX z dodanim AMS36.

Celic Jurkat in Jurkat-catX je bilo v preparatih zelo malo, njihova nedvoumna identifikacija pa ponekod otežena zaradi prisotnosti celic NCTC2544 sferične morfologije v nekaterih preparatih. Celice Jurkat in Jurkat-catX v stiku s celicami NCTC2544 prikazuje slika 8. Celice obeh limfocitnih linij so z nekaterimi izjemami imele več vidnega LFA-1 in približno enako katepsina X v primerjavi s celicami NCTC2544. V nobenem od preparatov nismo opazili izrazitega koncentriranja katerega od proteinov v območju celičnih stikov, njuna kolokalizacija pa je bila podobna kot pri celicah NCTC2544.

## 5.2.2 LFA-1 in ICAM-1

### 5.2.2.1 Kultura celic NCTC2544

Prisotnost ter razporeditev LFA-1 in ICAM-1 v kulturi celic NCTC2544 prikazuje slika 9. Brez dodanega  $\text{INF-}\gamma$  so celice NCTC2544 izražale zelo majhne količine ICAM-1, ki jih je bilo komaj še mogoče zaznati pod enakimi pogoji snemanja kot za inducirane preparate. Ob uporabi višje intenzitete laserja je postala njihova fluorescenca dobro vidna, v obeh primerih pa je bila njegova razporeditev po celici enaka. Pri bolj sploščenih celicah (ki so prevladovale) je bil ICAM-1 relativno enakomerno razporejen po celici v obliki drobnih zrn, obarvanje pa je bilo le nekoliko bolj izrazito ob robu celice. Pri celicah bolj vretenaste morfologije je bilo obarvanje ob robu intenzivnejše v primerjavi z notranjostjo.



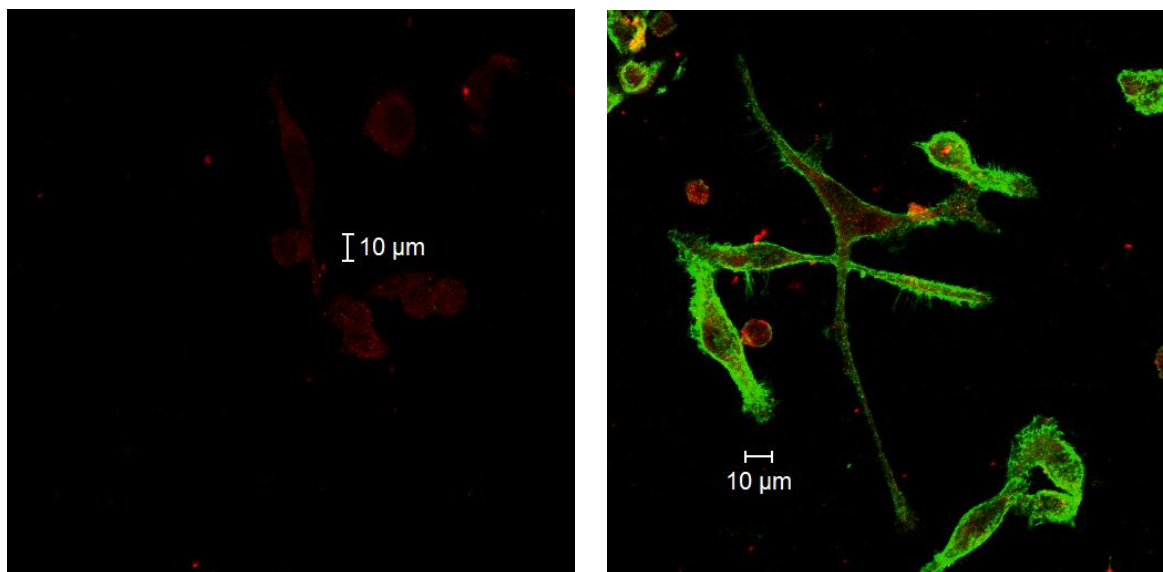
**Slika 9: Kultura celic NCTC2544 v odsotnosti (levo) in prisotnosti  $\text{INF-}\gamma$  (desno).** Sliki sta bili posneti pri enakih pogojih (intenziteti laserjev in ojačitvi). Zelena fluorescenca označuje prisotnost ICAM-1, rdeča fluorescenca pa LFA-1. Zelena fluorescenca je na levi sliki zrnata in opazna predvsem na robovih celic.

Pri celicah NCTC2544, tretiranih z  $\text{INF-}\gamma$ , je bila intenziteta fluorescence ICAM-1 bistveno višja. Najbolj izrazita je bila ob robu celic, dobro pa je bila vidna tudi v notranjosti. Večina celic je bila vretenaste morfologije, odvisno od goriščne ravnine pa je bilo (zaradi intenzivne fluorescence) mogoče ob robu celic opaziti številne drobne izrastke.

Količina in razporeditev LFA-1 v celicah NCTC2544 je bila podobna kot v prejšnjih eksperimentih in se ni opazno razlikovala med preparati.

#### 5.2.2.2 Kokultura celic NCTC2544 in celic Jurkat/Jurkat-caX

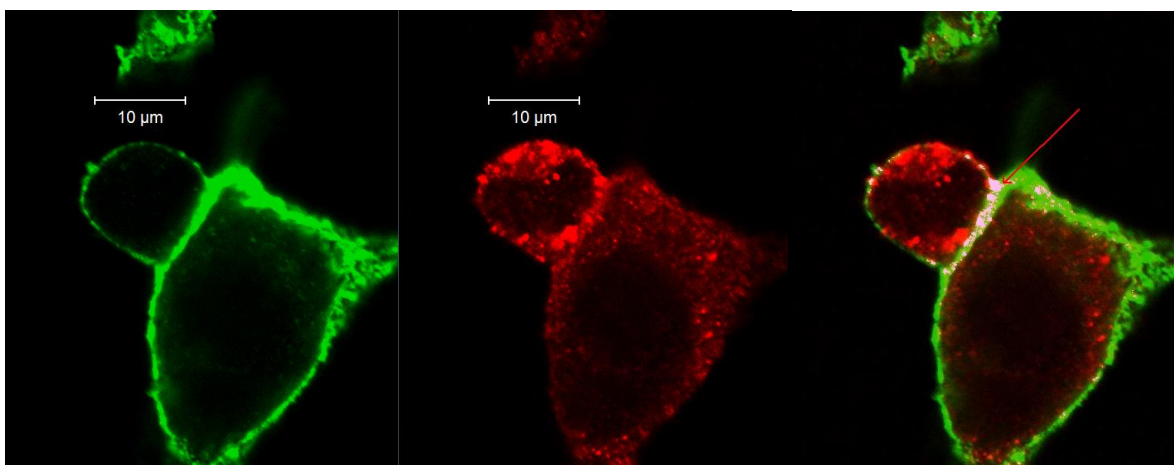
Razporeditev LFA-1 in ICAM-1 v kokulturi celic NCTC2544 in celic Jurkat prikazuje slika 10. Izražanje ICAM-1 na celicah NCTC2544 je bilo v obeh kokulturah zelo podobno kot v monokulturi: komaj zaznavno v odsotnosti  $\text{INF-}\gamma$  in bistveno večje ob njegovem dodatku. Podobni sta bili tudi razporeditev ICAM-1 in morfologija celic, čeprav je bil pri kokulturah prisoten večji delež vretenastih celic tudi brez dodatka  $\text{INF-}\gamma$ . Raven izražanja LFA-1 v celicah NCTC2544 se tudi pri kokulturah ni opazno spremenila ob dodatku  $\text{INF-}\gamma$ . Enaka opažanja smo zasledili tudi pri kokulturi s celicami Jurkat-catX.



**Slika 10: Kokultura celic NCTC2544 in Jurkat v odsotnosti (levo) in v prisotnosti  $\text{INF-}\gamma$  (desno).** Sliki sta bili posneti pri enakih pogojih (intenziteti laserjev in ojačitvi). Zelena fluorescenca označuje prisotnost ICAM-1, rdeča fluorescenca pa LFA-1. Majhne ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) okrogle celice so celice Jurkat, preostanek pa predstavljajo NCTC2544.

Izražanje označenih proteinov je bilo nekoliko drugačno pri celicah Jurkat. Izražanje ICAM-1 je bilo tudi tu v običajnih pogojih komaj zaznavno, njegovo povečanje ob dodatku  $\text{INF-}\gamma$  pa je bilo občutno manjše kot pri celicah NCTC2544 in omejeno na rob celice. Pri izražanju LFA-1 ni bilo opaznih sprememb. Pri kokulturi s celicami Jurkat-catX zaradi pomanjkanja celic, ki bi jih lahko nedvoumno identificirali kot Jurkat-catX, v preparatih

tega trenda nismo mogli potrditi. Kolokalizacijo LFA-1 in ICAM-1 je bilo zaradi prenizkih intenzitet fluorescence nemogoče oceniti, ob dodatku  $\text{INF-}\gamma$  pa je bila v področjih celičnih stikov med celicami Jurkat in NCTC2544 izrazita, kot prikazuje slika 11.

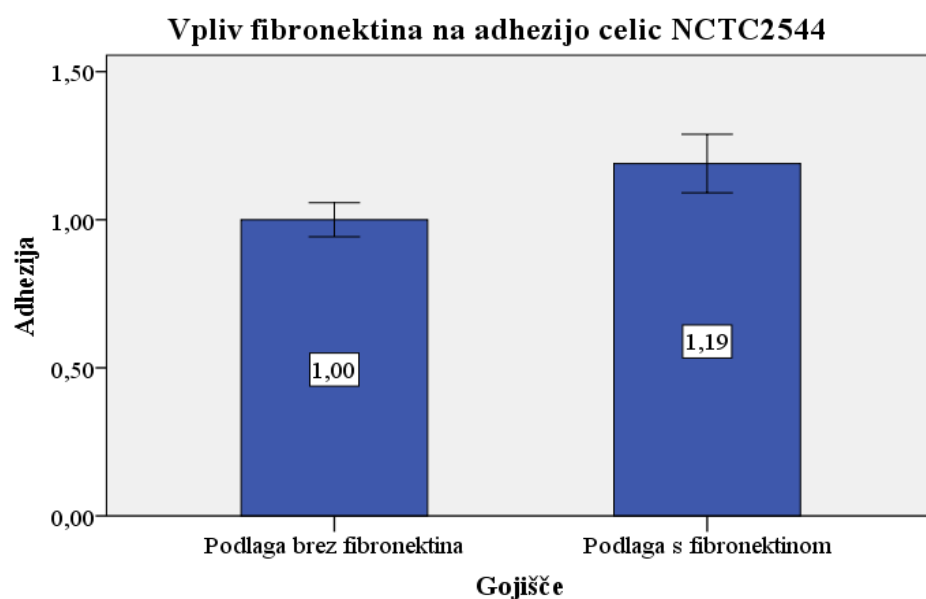


**Slika 11: Kolokalizacija LFA-1 in ICAM-1 v kokulturi celic NCTC2544 in Jurkat.** Zelena barva prikazuje fluorescenco ICAM-1, rdeča pa LFA-1. Z belo barvo so označena področja, kjer je intenziteta obeh fluorescenc visoka. Puščica označuje območje največje kolokalizacije v področju celičnega stika.

## 5.3 Testi adhezije celic

### 5.3.1 Vpliv fibronektina na adhezijo celic

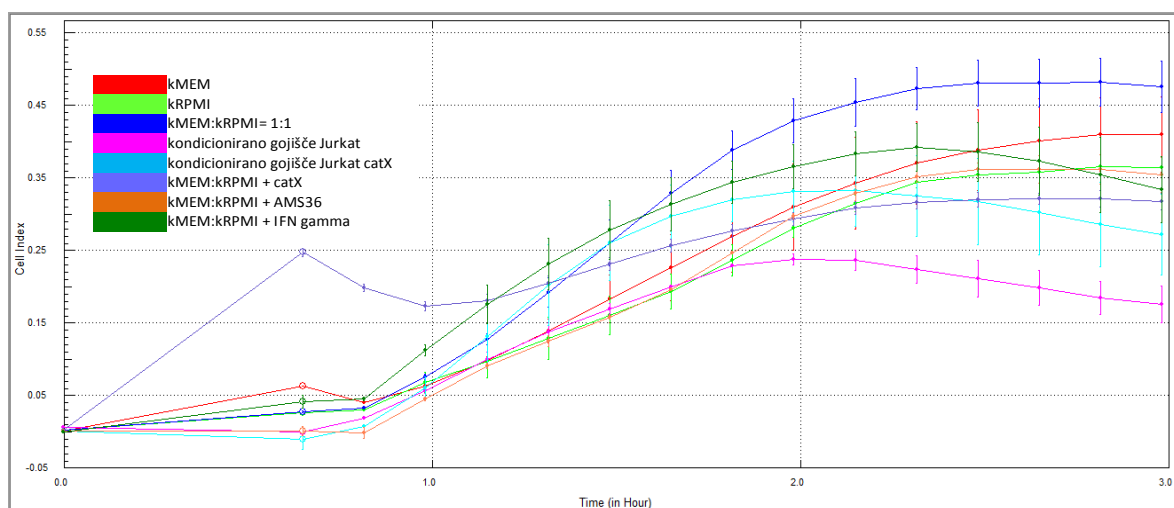
Adhezijo celic NCTC2544 na podlago (polistirensko plastiko) brez fibronektina in podlago s fibronektinom prikazuje slika 12. Adhezija na podlagi s fibronektinom je bila skoraj 20 % večja v primerjavi s podlago brez, vendar razlika med njima ni bila statistično značilna.



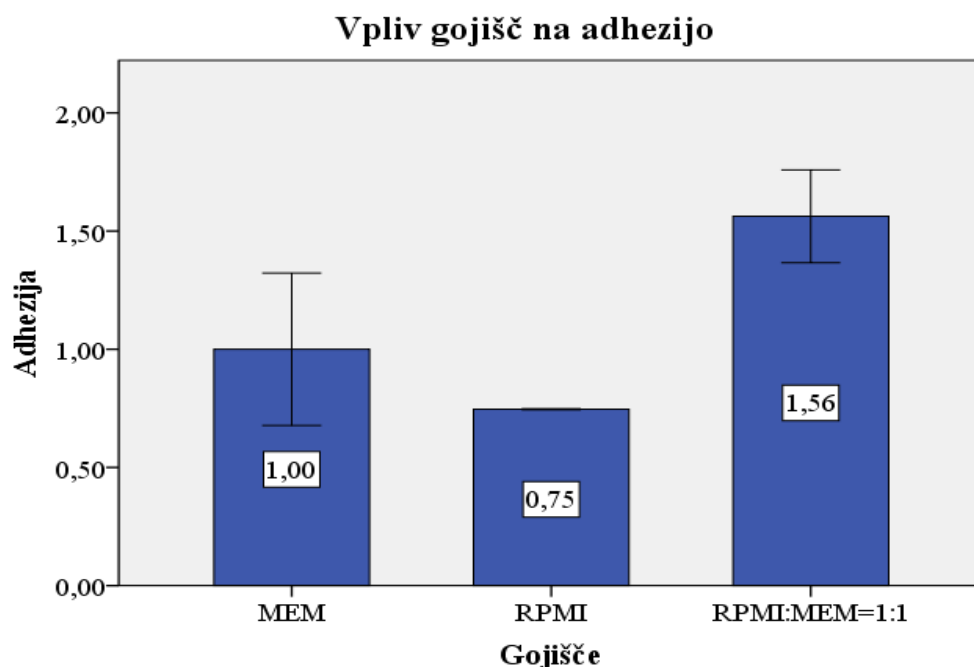
**Slika 12: Vpliv fibronektina na adhezijo celic NCTC2544.** Prikazani rezultati so normalizirani na podlago brez fibronektina. Navpične črte na stolpcih prikazujejo standardno deviacijo. Razlika med vzorcema ni bila statistično značilna ( $p > 0,05$ ).

### 5.3.2 Vpliv gojišča na adhezijo celic NCTC2544

Vpliv osnovnega gojišča na adhezije celic NCTC2544 prikazujeta sliki 13 in 14. Adhezija v kompletnem RPMI gojišču je bila okrog 25 % manjša, v zmesi kompletnega gojišča RPMI s kompletnim MEM gojiščem pa za več kot polovico večja v primerjavi s kontrolnim gojiščem (kMEM). Zaradi precejšnje variabilnosti med biološkimi ponovitvami razlike v adheziji niso bile statistično značilne.



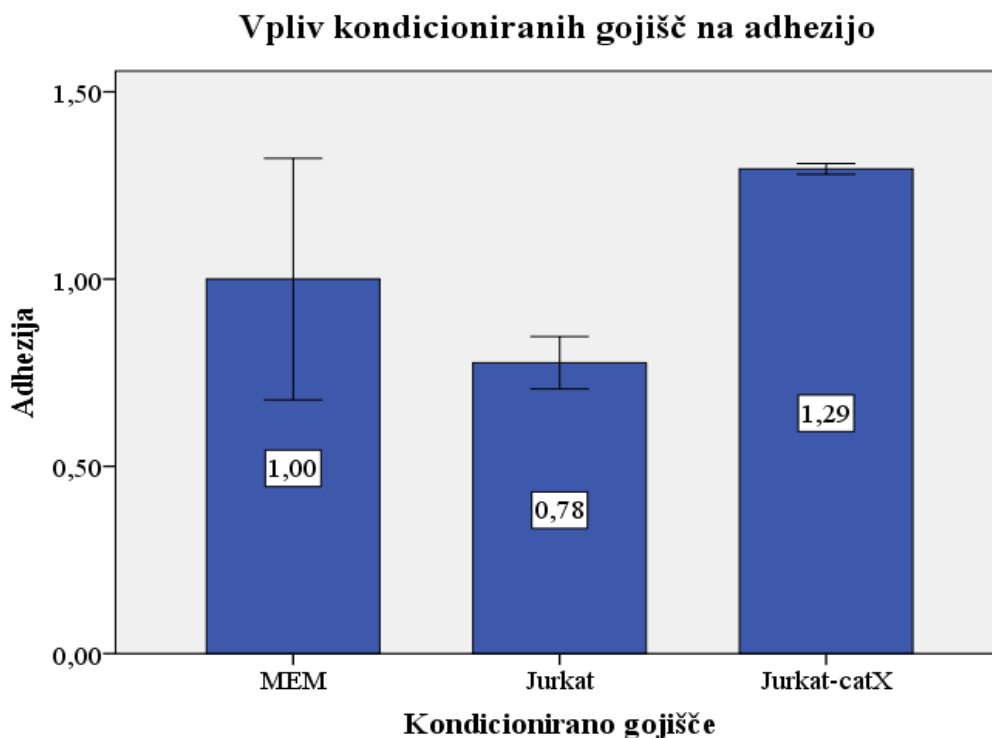
**Slika 13: Potek adhezije celic NCTC2544 v različnih gojiščih.** Graf prikazuje potek celičnega indeksa kot merila adhezije celic v prvih treh urah poskusa. Točke na grafu prikazujejo povprečje dveh bioloških ponovitev, navpične črte na grafu pa razliko med njima.



**Slika 14: Vpliv gojišč na adhezijo celic NCTC2544.** Rezultati so normalizirani na adhezijo v kontrolnem gojišču. Navpične črte na stolpcih prikazujejo standardne deviacije. Razlike med vzorci niso bile statistično značilne ( $p > 0,05$ ). MEM – kMEM; RPMI – kRPMI; RPMI:MEM=1:1 – zmes kMEM in kRPMI v razmerju 1:1.

### 5.3.3 Vpliv kondicioniranih gojišč na adhezijo

Vpliv kondicioniranih gojišč na adhezijo celic NCTC2544 prikazuje slika 15. Adhezija celic NCTC2544 v kondicioniranem gojišču celic Jurkat je bila manjša, v kondicioniranem gojišču celic Jurkat s povečanim izražanjem katepsina X pa nekoliko večja od adhezije v kontrolnem gojišču. Razlike med posameznimi gojišči niso bile statistično značilne.



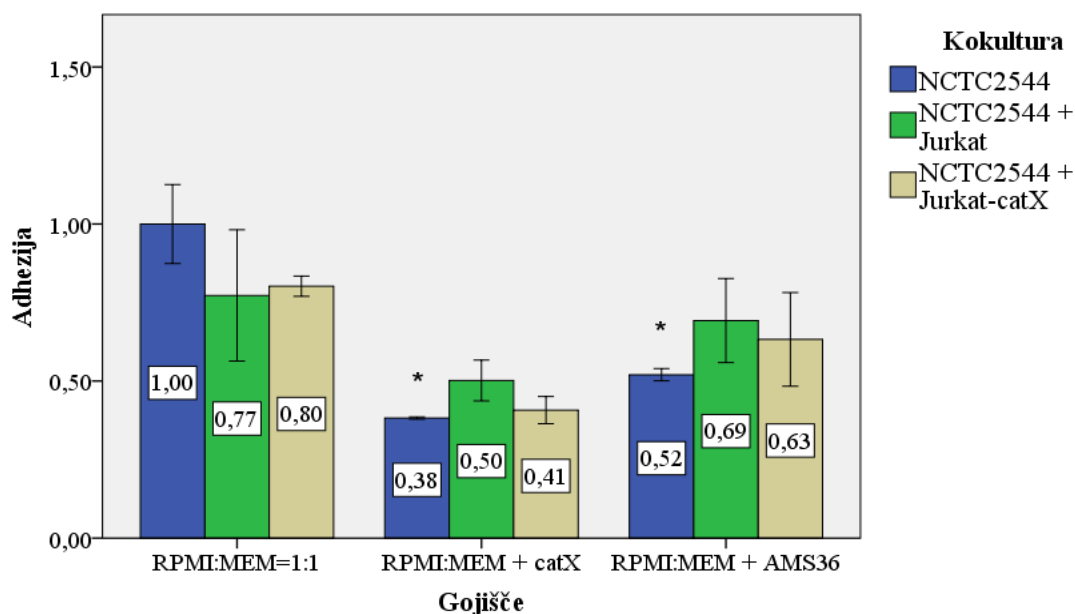
**Slika 15: Vpliv kondicioniranih gojišč na adhezijo celic NCTC2544.** Rezultati so normalizirani na adhezijo v kontrolnem gojišču. Navpične črte na stolpcih predstavljajo standarne deviacije. Razlike med vzorci niso bile statistično značilne ( $p > 0,05$ ). MEM – gojišče kMEM; Jurkat – kondicionirano gojišče celic Jurkat; Jurkat-catX – kondicionirano gojišče celic Jurkat s povečanim izražanjem katepsina X.

### 5.3.4 Adhezija celic NCTC2544 v kokulturah

Adhezijo celic NCTC2544 v kokulturah s celičnima linijama Jurkat in Jurkat-catX prikazuje slika 16. Adhezija v obeh kokulturah je bila okrog 20 % nižja kot pri samih celicah NCTC2544 v enakem gojišču, vendar razlika ni bila statistično značilna ( $p > 0,05$ ). Razlike v adheziji med kokulturama so bile zanemarljive in niso bile statistično značilne.



### Vpliv kokultur in katepsina X na adhezijo celic NCTC2544



**Slika 16: Adhezija celic NCTC2544 v kokulturah in vpliv katepsina X.** Rezultati so normalizirani na adhezijo v kulturi celic NCTC2544 v zmesi gojišč kMEM in kRPMI v razmerju 1:1. Navpične črte na stolpcih prikazujejo standardne deviacije. Statistično značilne ( $p < 0,05$ ) razlike v primerjavi s kontrolnim gojiščem so označene z \*.

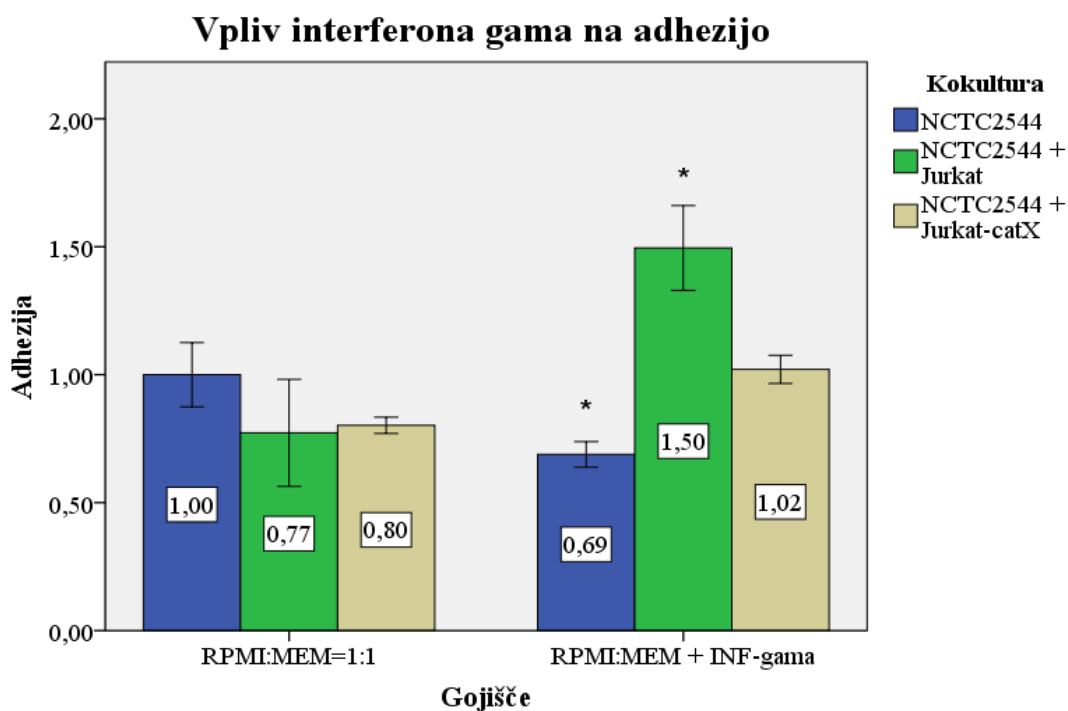
#### 5.3.5 Vpliv dodanega katepsina X in AMS36 na adhezijo

Vpliv dodatka katepsina X in njegovega specifičnega inhibitorja AMS36 na adhezijo prikazuje slika 16. Dodatek eksogenega katepsina X v gojišče je pri kulturi celic NCTC2544 privedel do izrazitega, več kot 60 % zmanjšanja adhezije, ki je bilo statistično značilno. Podoben trend zmanjšanja adhezije smo opazili tudi pri obeh kokulturah, le da je bilo zmanjšanje ob dodatku katepsina X precej manjše (v prvi vrsti zaradi manjše adhezije v kokulturah brez dodanega katepsina X) in ni bilo statistično značilno. Izmerjena adhezija je bila sicer nekoliko višja pri kokulturi s celicami Jurkat kot pri kokulturi s celicami Jurkat-catX, vendar razlika ni bila statistično značilna.

Dodatek AMS36 v gojišče je prav tako v splošnem privedel do zmanjšanja adhezije. V primeru celic NCTC2544 je bila slednja ob dodatku AMS36 v primerjavi s kontrolo za približno polovico manjša, razlika pa je bila statistično značilna. V obeh kokulturah je bila adhezija v gojišču z dodanim AMS36 nekoliko večja kot pri samih celicah NCTC2544, vendar še vedno nižja kot pri kokulturah v običajnem gojišču, čeprav razlike v nobenem od teh primerov niso bile statistično značilne. Adhezija je bila tudi ob dodanem AMS36 zelo podobna v obeh kokulturah; razlike med njima niso bile statistično značilne.

### 5.3.6 Vpliv interferona $\gamma$ na adhezijo

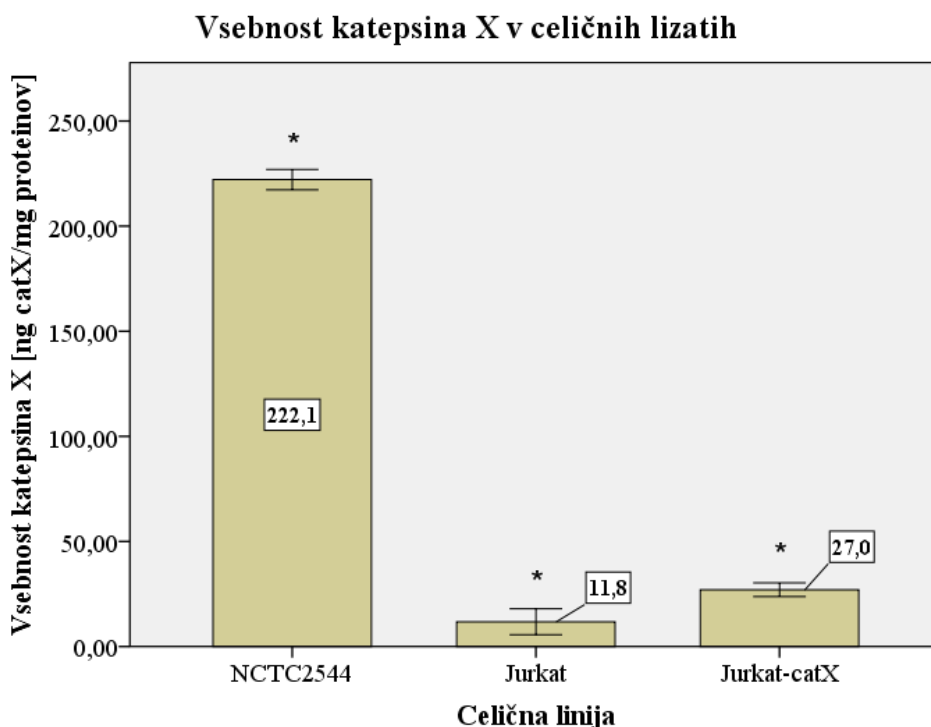
Vpliv interferona  $\gamma$  na adhezijo prikazuje slika 17. Pri kulturi celic NCTC2544 je dodatek interferona  $\gamma$  v gojišče privedel do zmanjšanja adhezije za okrog 30 % v primerjavi z gojiščem brez interferona  $\gamma$ , ki pa ni bilo statistično značilno. Pri kokulturah je bil učinek ravno obraten, saj smo ob dodatku interferona  $\gamma$  pri obeh kokulturah izmerili večjo adhezijo v primerjavi z gojiščem brez njega. Povečanje adhezije je bilo večje pri kokulturi s celicami Jurkat, vendar razlika pri nobeni kokulturi ni bila statistično značilna. Prav tako nismo ugotovili statistično značilnih razlik med obema kokulturama z dodanim interferonom  $\gamma$ , zato pa je bila med kulturami z dodanim interferonom  $\gamma$  adhezija pri kokulturi s celicami Jurkat statistično značilno večja v primerjavi z monokulturo celic NCTC2544.



**Slika 17: Vpliv interferona  $\gamma$  na hitrost adhezije celic NCTC2544.** Rezultati so normalizirani na adhezijo celic NCTC2544 v zmesi gojišč kMEM in kRPMI v razmerju 1:1. Navpične črte na stolpcih prikazujejo standardne deviacije. Statistično značilna ( $p < 0,05$ ) razlika med vzorcema je označena z \*.

## 5.4 Vsebnost katepsina X v celičnih lizatih

Vsebnost katepsina X v lizatih celičnih linij NCTC2544, Jurkat in Jurkat-catX prikazuje slika 18. Največ katepsina X (na mg celokupnih proteinov v lizatu) je vseboval lizat celic NCTC2544, sledil je lizat celic Jurkat-catX, najmanj katepsina X pa je vseboval lizat celic Jurkat. Vsebnost katepsina X v vsakem od lizatov se je statistično značilno razlikovala od vsebnosti v drugih dveh lizatih.

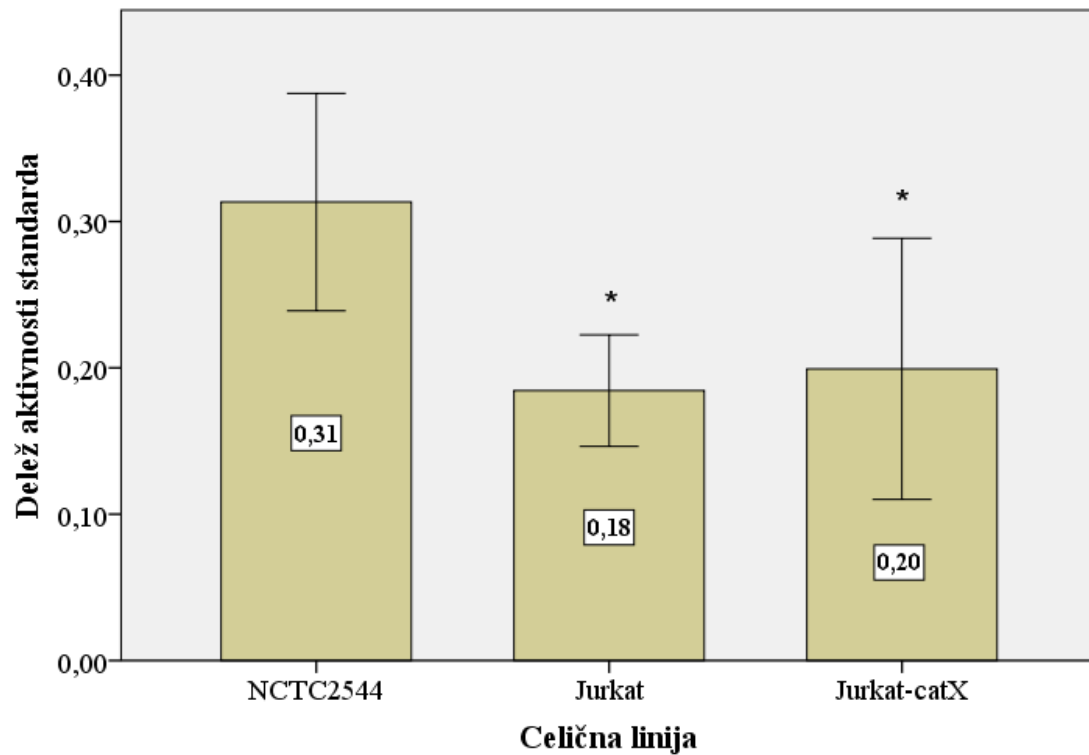


**Slika 18: Vsebnost katepsina X v celičnih lizatih.** Vsebnost je podana na mg celokupnih proteinov v lizatu. Navpične črte na stolpcih prikazujejo 95 % interval zaupanja. Statistično značilne ( $p < 0,05$ ) so bile razlike med vsemi vzorci, kar je označeno z \*. Prikazano je povprečje dveh poskusov.

## 5.5 Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih

Izmerjeno aktivnost katepsina X, izraženo kot delež aktivnosti standarda, prikazuje slika 19. Najvišjo aktivnost katepsina X je imel lizat celic NCTC2544; njegova aktivnost je bila statistično značilno večja od aktivnosti katepsina X v drugih dveh lizatih, kjer je bila za okrog tretjino nižja. Razlika v aktivnosti katepsina X med lizatoma celic Jurkat in celic Jurkat s povečanim izražanjem katepsina X je bila zelo majhna in ni bila statistično značilna.

### Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih



**Slika 19: Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih.** Prikazane aktivnosti so podane kot delež aktivnosti standarda aktivnega katepsina X. Navpične črte na stolpcih prikazujejo 95 % interval zaupanja. Statistično značilne ( $p < 0,05$ ) razlike v aktivnosti med lizatom celic NCTC2544 in lizatoma celic Jurkat ter Jurkat-catX so označene z \*. Prikazano je povprečje dveh poskusov.

## 6. Razprava

Osnovo naše raziskave je predstavljalo opazovanje interakcije med celicami NCTC2544 in celicami Jurkat, bodisi preko neposrednega stika v kokulturah bodisi preko kondicioniranih gojišč. Ker smo za obe celični liniji uporabljali različno gojišče (kMEM in kRPMI), je izvedba poskusov zahtevala izpostavitve celic NCTC2544 gojišču, ki se razlikuje od njihovega običajnega gojišča. Ker v literaturi nismo našli podobnih raziskav, smo morali najprej ovrednotiti vpliv posameznih gojišč in določiti najprimernejše gojišče za nadaljnje poskuse.

Osnovni parameter pri tem je bilo preživetje celic NCTC2544, ki smo ga s testom viabilnosti izmerili posredno preko njihove metabolne aktivnosti; razmerje med absorbanca kontrolne in vzorca je tako ustrezalo razmerju med številom metabolno aktivnih celic v kontrolnem gojišču in vzorcu. Zaradi razmeroma hitre delitve celic NCTC2544 v običajnih pogojih je lahko manjše število metabolno aktivnih celic v primerjavi s kontrolo posledica citotoksičnega delovanja prisotnih dejavnikov (v smislu povzročitve apoptoze ali nekroze) ali pa zgolj zmanjšanja hitrosti proliferacije v testnem gojišču; možna je seveda tudi kombinacija obeh pojavov. Nasprotno bi večje izmerjeno preživetje v primerjavi s kontrolo lahko pomenilo ugodnejše pogoje za delitev celic ali prisotnost dejavnikov, ki dodatno spodbujajo poliferacijo celic.

S testom viabilnosti celic smo najprej preverili, kako na celice NCTC2544 vpliva zamenjava gojišča kMEM z gojiščem kRPMI ali njuno zmesjo v razmerju 1:1. Rezultati so pokazali, da ima zamenjava osnovnega gojišča le razmeroma majhen vpliv na preživetje, ki je bil po 24 h in 72 h praktično zanemarljiv. Zanimivo je, da je bilo pri obeh gojiščih preživetje najslabše v vmesni časovni točki (48 h). Zaradi uporabe povprečja treh poskusov in relativno majhnega odstopanja med meritvami (vsaj v primerjavi z drugimi časovnimi točkami) je bilo pri gojišču kRPMI manjše izmerjeno preživetje najverjetneje odraz nekoliko slabših pogojev za rast celic NCTC2544 v tem gojišču. Pri zmesi gojišč kMEM in kRPMI o tem zaradi velikih odstopanj med meritvami ne moremo zanesljivo sklepati.

Na podlagi rezultatov lahko tako zaključimo, da celice NCTC2544 v testiranih gojiščih preživijo dovolj dobro za izvedbo vseh nadaljnjih poskusov, biti pa moramo pazljivi pri interpretaciji rezultatov po 48-urni inkubaciji. Na podlagi rezultatov smo kot gojišče za pripravo kokultur v nadaljnjih poskusih izbrali mešanico gojišč kMEM in kRPMI v razmerju 1:1.

Naslednji korak je predstavljalo določanje preživetja celic NCTC2544 v kondicioniranih gojiščih obeh limfocitnih linij. Rezultati so pokazali, da je preživetje celic NCTC2544 v teh gojiščih občutno manjše kot v gojišču kMEM. Ker gre za gojišča, v katerih so predhodno 24 h rastle celice Jurkat oziroma Jurkat-catX, je eden od možnih vzrokov za to upad koncentracije potrebnih hranil v gojišču kRPMI, ki (sploh po 48-urni inkubaciji) že samo po sebi za celice NCTC2544 ni enakovredno gojišču kMEM. V splošnem sta za sesalske celične kulture najpomembnejši hranili, katerih koncentracija predstavlja omejujoč dejavnik za rast celic, glukoza in glutamin. (65-67)

Pomemben vpliv na proliferacijo imata tudi njuna metabolita, ki v dovolj visokih koncentracijah zavirata rast celic: laktat, ki izvira iz nepopolne oksidacije glukoze, in še posebej amoniak, ki nastaja pri metabolizmu glutamina. (68, 69) Poleg tega celice Jurkat v gojišče izločajo številne proteine; možno je, da kateri od njih na celice NCTC2544 delujejo citotoksično oziroma zavirajo njihovo proliferacijo. (70)

Vsi ti dejavniki imajo verjetno določeno vlogo pri zmanjšanju preživetja oziroma proliferacije v kondicioniranih gojiščih, vendar je vpliv v gojišče izločenih dejavnikov in metabolitov verjetno pomembnejši, kar nakazuje zmanjšanje preživetja v mešanih gojiščih, kjer smo kondicioniranim gojiščem dodali sveže gojišče kMEM. Vpliv mešanih gojišč je bil sicer precej manjši, razlike v primerjavi s samimi kondicioniranimi gojišči pa še posebej izrazite po 48 h in 72 h, iz česar lahko sklepamo, da dodatek ključnih hranil in zmanjšanje koncentracije metabolitov pomembno izboljšata preživetje.

Zanimivo je, da ni bilo praktično nobenih statistično značilnih razlik med kondicioniranimi gojiščema celic Jurkat in Jurkat-catX, prav tako pa tudi med njunima zmesema z gojiščem kMEM. Povprečno preživetje se je še najbolj razlikovalo po 72 h, vendar so zaradi velike variabilnosti med meritvami verjetnejši razlog za to slučajne razlike v številu celic na začetku eksperimenta kot pa razlika v učinku gojišč; v prid temu govorijo tudi večje razlike pri zmeseh kot pri čistih gojiščih. Glede na rezultate lahko tako zaključimo, da se profila v gojišče izločenih dejavnikov celic Jurkat in Jurkat-catX nista bistveno razlikovala.

Preživetje celic NCTC2544 v kokulturah s celicami Jurkat je bilo manjše v primerjavi z gojiščem kMEM, a večje od preživetja v njegovi zmesi s kondicioniranim gojiščem; enako velja za kokulturo s celicami Jurkat-catX. Zaradi nekoliko nižjih začetnih številčnih koncentracij celic Jurkat v primerjavi s pripravo kokultur in uporabe svežega gojišča so bile celice NCTC2544 pri tem poskusu v povprečju izpostavljene nižjim koncentracijam dejavnikov in metabolitov, ki so jih v gojišče izločale celice obeh limfocitnih linij.

Izmerjeno preživetje se tako v veliki meri sklada s pričakovanim in nakazuje, da je vpliv neposredne interakcije celic NCTC2544 s celicami Jurkat v zelo majhen. Preživetje celic NCTC2544 je bilo v obeh kokulturah praktično enako, iz česar lahko sklepamo, da med celicami Jurkat in Jurkat-catX ni bilo pomembnejših razlik v relevantnih izločenih dejavnikih in morebitnih interakcijah s celicami NCTC2544, ki bi se odražale v spremenjenem številu metabolno aktivnih celic.

Dodatek AMS36 po 24-urni inkubaciji ni zaznavno vplival na preživetje celic NCTC2544. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je njegova citotoksičnost v uporabljeni koncentraciji dovolj majhna za izvedbo nadaljnjih poskusov. Obenem lahko tudi sklepamo, da vpliv AMS36 na rezultate teh poskusov ni posledica nespecifične citotoksičnosti, temveč posledica njegovega specifičnega delovanja kot zaviralca katepsina X. (17)

Glede na izmerjeno 25 odstotkov manjše preživetje v primerjavi s kontrolo je imel interferon  $\gamma$  v uporabljeni koncentraciji opazen vpliv že po 24 h, v kasnejših časovnih točkah pa je bil ta učinek še bolj izrazit. Njegov vpliv je bil opazen tudi v drugih poskusih (denimo testu adhezije celic), kjer po več kot 72 h v gojiščih z dodanim  $\text{INF-}\gamma$  praktično ni bilo več mogoče najti živih celic. Naša opažanja se dobro ujemajo s podatki iz literature, kjer so poročali o povečani apoptozi keratinocitov v prisotnosti  $\text{INF-}\gamma$ , ki je bila še posebej izrazita po 48 h. (71) Vzrok zanjo je indukcija izražanja liganda Fas pod vplivom  $\text{INF-}\gamma$  na keratinocitih, ki sicer konstitutivno izražajo njegov receptor Fas, njuna povezava pa sproži proces apoptoze. (71-73) Zaradi potrjenega citotoksičnega delovanja  $\text{INF-}\gamma$  smo zato pri nadaljnjih poskusih uporabili čim krajše še ustrezne čase inkubacije v gojiščih z  $\text{INF-}\gamma$ , njegov učinek pa upoštevali pri interpretaciji njihovih rezultatov.

Detekcija LFA-1 in katepsina X s konfokalno mikroskopijo v celicah NCTC2544 pomeni, da sta bila oba proteina v celicah prisotna v znatnih količinah. Zanimivo je, da sta se oba proteina nahajala praktično po celotni celici (z izjemo jedra), najverjetneje v veziklih, na kar nakazuje njuno bolj ali manj zrnato obarvanje. Glede na to, da je LFA-1 membranski protein, bi pričakovali, da se bo v večji meri nahajal v področju celične membrane, česar pa v veliki večini primerov nismo zasledili. Razlog za detekcijo LFA-1 v notranjosti celice lahko iščemo v recikliranju membranskih proteinov s površine celice v njeno notranjost in nazaj. Znano je, da ta proces poteka tudi z LFA-1. (74) Prav tako nismo opazili nabiranja označenih proteinov v področju celičnih stikov, kar nakazuje, da LFA-1 najverjetneje nima pomembnejše vloge pri interakcijah med samimi celicami NCTC2544. V splošnem sta LFA-1 in katepsin X izkazovala visoko stopnjo kolokalizacije, kar pomeni, da lahko tudi v

celicah NCTC2544 prihaja do cepitve LFA-1, če se katepsin X, ki ga izražajo, nahaja v ustrezno aktivni obliki.

Glede na to možnost cepitve se ponuja vprašanje, kakšen vpliv ima na celice NCTC2544 zaviranje delovanja katepsina X. Fotografije preparatov z dodanim AMS36 nakazujejo, da se vzorec razporeditve označenih proteinov večinoma ohrani, z dvema izjemama. Za opažena področja brez katepsina X je težko najti razlago, ki bi vključevala zaviranje katepsina X; najverjetneje so ta področja vsaj delno odraz bolj sploščene morfologije in posledično manjše debeline opazovanih celic. Izrazitejše koncentriranje zrn z višjo intenziteto fluorescence LFA-1 v določenem predelu celice bi teoretično lahko bilo posledica spremenjene aktivnosti katepsina X, saj cepitev C-končnih aminokislin LFA-1 vpliva na vezavo talina in  $\alpha$ -aktinina; spremenjena vezava teh ali drugih citoplazemskih pomožnih proteinov bi lahko vplivala na združevanje LFA-1 v gruče. (13, 34) Prav tako pa je tudi tu možno, da gre zgolj za artefakt, ki je nastal med pripravo preparatov.

Vzorec razporeditve LFA-1 in katepsina X v celicah NCTC2544 je v primerjavi s kulturo samih NCTC2544 ostal bolj ali manj nespremenjen tudi v obeh kokulturah, kar nakazuje, da morebitne interakcije z nobeno od limfocitnih linij nanj niso imele bistvenega vpliva. Prav tako je bil tu nezaznaven vpliv AMS36, kar pod vprašaj postavlja njegov učinek v monokulturi. Glede na fotografije celice Jurkat in Jurkat-catX bi lahko sklepali, da sta bila razmerje med katepsinom X in LFA-1 ter njuna razporeditev nekoliko drugačna kot pri celicah NCTC2544, vendar tudi tu ne moremo potrditi, da bi se oba proteina preferenčno nahajala v območjih celičnih stikov s celicami NCTC2544. Morebitnih razlik med celicami Jurkat in Jurkat-catX pri tem nismo mogli potrditi.

Sklepanje trdnih zaključkov pri tem občutno otežuje majhno število celic Jurkat in Jurkat-catX v preparatih. Pri pripravi preparatov s kokulturami smo uporabili običajen postopek za adhezijske celične kulture, ker so nas v prvi vrsti zanimale celice Jurkat, ki so se adherirale na celice NCTC2544. Pregled preparatov pod svetlobnim mikroskopom med postopkom priprave je potrdil naša pričakovanja, da bodo te celice ostale adherirane, vendar se v nadaljevanju postopka kljub previdnemu spiranju, kot kaže, niso dobro fiksirale na površino stekelca, zato jih je v končnem preparatu ostalo zelo malo.

Drug možen problem predstavlja identifikacija celic v preparatih. Ker nismo uporabili posebnih označevalcev za eno ali drugo celično linijo, smo celice v kokulturi lahko identificirali izključno na podlagi velikosti in morfologije. Majhne (s premerom okrog 10  $\mu$ m) sferične celice so bile celice Jurkat (ali Jurkat-catX), velike (> 20  $\mu$ m) in sploščene



ali vretenaste celice pa NCTC2544. Težavo lahko predstavljajo aktivirane celice Jurkat zaradi svoje bolj podolgovate morfologije in sferične celice NCTC2544. V obeh primerih bi velikost celice ostala dodaten kriterij za identifikacijo, ki pa v primeru sferičnih celic NCTC2544 ni popolnoma nedvoumen, saj smo med gojenjem celic Jurkat in Jurkat-catX pri mikroskopskem pregledu kulture občasno opazili tudi večje celice. Za razliko od aktiviranih celic Jurkat, ki jih v preparatih praktično ni bilo opaziti, so bile sferične celice s premerom okrog 20  $\mu\text{m}$  v kokulturah dovolj pogoste, da so še nekoliko otežile interpretacijo rezultatov. Glede na našete dejavnike zato ne moremo nedvoumno potrditi ali ovreči vloge katepsina X in LFA-1 pri neposredni interakciji celic Jurkat s celicami NCTC2544.

Rezultati kažejo, da so celice NCTC2544 v običajnih pogojih izražale zelo majhne, a vendar zaznavne količine ICAM-1. Vzorec razporeditve fluorescence po celici nakazuje, da se je večina ICAM-1 nahajala v področju celične membrane. Dodatek  $\text{INF-}\gamma$  v gojišče je bistveno povečal izražanje ICAM-1 na celicah NCTC2544, kar se sklada s podatki iz literature. (45) Glede na rezultate dodatek  $\text{INF-}\gamma$  ni vplival na izražanje in razporeditev LFA-1.

Fotografije preparatov s kokulturami kažejo, da celice NCTC2544 tudi ob prisotnosti celic Jurkat brez dodatka eksogenega  $\text{INF-}\gamma$  izražajo komaj zaznavne količine ICAM-1, enako kot v monokulturi. Iz tega lahko sklepamo, da celice Jurkat v danih pogojih ne izločajo dovolj  $\text{INF-}\gamma$  ali drugih dejavnikov, ki bi inducirali izražanje ICAM-1 na celicah NCTC2544. Po drugi strani pa lahko z nizkimi nivoji izražanja ICAM-1 na celicah NCTC2544 vsaj delno pojasnimo odsotnost zbiranja LFA-1 v celičnih stikih med celicami NCTC2544 in Jurkat v prejšnjih poskusih. Podobno lahko sklepamo tudi za kokulturo s celicami Jurkat-catX, kjer so bile celice NCTC2544 med inkubacijo prav tako izpostavljene limfocitom, čeprav smo jih nato pri mikroskopiji opazili zelo malo.

Porast izražanja ICAM-1 na celicah NCTC2544 ob dodatku  $\text{INF-}\gamma$  je ostal enak tudi v kokulturah, zato prisotnost limfocitov zelo verjetno ni imela pomembnejšega vpliva na ta proces. Zanimivo je, da je bilo ob dodatku  $\text{INF-}\gamma$  v preparatih kokultur v nekaterih primerih opaziti tudi manj izrazit, a vendar opazen porast izražanja ICAM-1 tudi na celicah Jurkat, kar se ujema z rezultati podobnih objavljenih raziskav na (spominskih) limfocitih T. (75) Kolokalizacija LFA-1 in ICAM-1 v celičnih stikih med celicami Jurkat in NCTC2544 potrjuje, da interakcija med njimi v prisotnosti  $\text{INF-}\gamma$  poteka tudi preko povezave med tema dvema proteinoma, kar je v skladu z objavljenimi podatki o adheziji limfocitov T na

keratinocite. (46) Kljub temu ohranitev sferične morfologije in razmeroma enakomerne razporeditve LFA-1 ne govorita v prid spremembam v celicah Jurkat kot posledicam interakcije s celicami NCTC2544.

Takšne spremembe bi sicer bolj pričakovali pri celicah Jurkat-catX, ki so v poskusih drugih avtorjev že izkazale spontane morfološke spremembe ob stiku z ICAM-1. (24) Žal zaradi že opisanih težav pri pripravi preparatov s kokulturami ni bilo mogoče pridobiti ustreznega števila celic Jurkat-catX, zato njihove interakcije s celicami NCTC2544 v prisotnosti INF- $\gamma$  nismo mogli ustrezno vizualizirati. Vseeno pa odsotnost večjega števila celic Jurkat-catX v preparatih bolj govori v prid predpostavki, da do takšnih sprememb ni prišlo niti pri celicah Jurkat-catX, saj bi ob morfoloških spremembah moralo priti tudi do močne adhezije na celice NCTC2544, kar bi pomenilo, da bi celice Jurkat-catX bolj verjetno ostale v preparatu.

Glede na rezultate konfokalne mikroskopije tako ne moremo potrditi ali ovreči vpliva katepsina X na interakcijo celic Jurkat s celicami NCTC2544 preko LFA-1/ICAM-1. Ne glede na to pa rezultati potrjujejo, da je zanjo potreben dodatek INF- $\gamma$ , ki smo ga zato uporabili pri nadaljnjih eksperimentih. Ker je INF- $\gamma$  tudi sicer prisoten v vneti koži pri luskavici, njegov dodatek ne spremeni bistveno relevantnosti eksperimentalnega modela. (57)

Za meritev adhezije celic NCTC2544 smo se odločili na podlagi spremenjene morfologije celic NCTC2544 v kondicioniranih gojiščih, ki smo jih opazili pri testih viabilnosti, kjer so celice rasle pri večji gostoti kot pri pripravi preparatov za konfokalno mikroskopijo. Kot merilo adhezije smo uporabili naklon začetnega dela krivulje, da bi se izognili vplivu različnega preživetja v testnih gojiščih. Zaradi omejenih sredstev smo izvedli majhno število bioloških ponovitev, kar je bil razlog za precej nizko moč uporabljenih statističnih testov. Posledica tega je bila precej otežena interpretacija rezultatov, saj smo le pri redkih vzorcih uspeli dokazati statistično značilnost razlik v izmerjeni adheziji.

Uspešna izvedba testa adhezije zahteva dovolj dobro adhezijo testiranih celic na površino testne ploščice. Da bi ovrednotili potrebo po uporabi dodatnega proteina, ki bi omogočil adhezijo celic, smo izmerili adhezijo celic NCTC2544 na površino testne ploščice, prevlečeno s fibronektinom, v primerjavi z adhezijo na plastično površino samo. Rezultati kažejo, da je bila adhezija na površino s fibronektinom sicer nekoliko večja, vendar so se celice tudi na površino brez fibronektina dobro pritrdile. Dobro adhezijo celic NCTC2544

na plastične površine posodic za gojenje celic in testnih ploščic smo opazili tudi pri predhodnem delu, zato smo se na podlagi rezultatov odločili za izvedbo nadaljnjih poskusov brez uporabe fibronektina, kar je precej poenostavilo njihovo izvedbo.

Za uspešno izvedbo in pravilno interpretacijo nadaljnjih poskusov je bilo tudi pri testih adhezije potrebno ovrednotiti morebiten vpliv zamenjave gojišča. Rezultati so pokazali precejšnje razlike v adheziji med gojiščem kMEM, gojiščem kRPMI in njuno zmesjo, ki pa zaradi majhnih vzorcev in precejšnje variabilnosti niso bile statistično značilne. Zanimivo je, da je bila adhezija v zmesi gojišč večja od adhezije v posameznih gojiščih kMEM in kRPMI. Ne glede na to pomembnejšega vpliva gojišča ne moremo izključiti, in čeprav je adhezija ob zamenjavi gojišča v vsakem primeru še vedno bila več kot zadovoljiva za izvedbo nadaljnjih poskusov, je ta vpliv potrebno ustrezno upoštevati pri interpretaciji njihovih rezultatov.

Rezultati kažejo na precejšnjo razliko v adheziji med kondicioniranim gojiščem celic Jurkat in Jurkat-catX, ki pa zaradi majhnega vzorca ni bila statistično značilna. Glede na to tako obstaja možnost, da dejavniki v kondicioniranem gojišču celic Jurkat-catX bolj spodbujajo adhezijo celic NCTC2544 v primerjavi s kondicioniranim gojiščem celic Jurkat (in gojiščem kMEM), vendar tega ne moremo z gotovostjo potrditi, še posebej, ker se kondicionirani gojišči nista pomembno razlikovali v nobenem od ostalih izvedenih poskusov.

Da bi se izognili morebitnim vplivom različnih gojišč, smo pri ugotavljanju vpliva prisotnosti celic Jurkat oziroma Jurkat-catX na adhezijo celic NCTC2544 kot kontrolo uporabili kulturo celic NCTC2544 v zmesi gojišč kMEM in kRPMI. Povprečna adhezija v obeh kokulturah je bila manjša v primerjavi s kontrolo, a razlika ni bila statistično značilna. Možna razlaga za manjšo adhezijo bi lahko bila večja zasedenost površinskih receptorjev na celicah NCTC2544 ob vezavi limfocitov. Ne glede na precejšnjo variabilnost v enem od vzorcev je bila adhezija v obeh kokulturah zelo podobna, zato vpliva izražanja katepsina X v limfocitih na adhezijo celic NCTC2544 ne moremo potrditi. To vzbuja tudi senco dvoma o dejanski razliki v izmerjeni adheziji v kondicioniranih gojiščih, vendar je zaradi različnega časa zadrževanja limfocitov v gojišču (24 h pri kondicioniranih gojiščih, okrog 3 h pri kokulturah) ne izključuje popolnoma.

V nadaljevanju smo želeli preveriti, kako na adhezijo vpliva dodatno povečana ali zmanjšana aktivnost katepsina X. V ta namen smo v gojišče kulture NCTC2544 in obeh

kokultur dodali eksogeni rekombinantni katepsin X oziroma njegov inhibitor AMS36. Znano je, da nekatere celice izločajo katepsin X, prav tako pa lahko v določenih primerih pride do njegove internalizacije. (76) Predpostavili smo, da bo do tega prišlo tudi v našem modelu, povečana koncentracija in posledično aktivnost katepsina X pa bo privedla do cepitve citoplazemskega repa LFA-1 in povečanja njegove afinitete, kot se to zgodi pri povečani aktivnosti endogenega katepsina X. (13) Posledično smo pričakovali močnejšo adhezijo, medtem ko naj bi bil učinek AMS36 obraten.

Rezultati so pokazali, da je bil učinek dodanega katepsina X ravno nasproten, saj je prišlo do upada adhezije. Najverjetneje je dodani katepsin X večinoma ostal zunaj celic, kjer je pod njegovim vplivom potekla delna razgradnja površinskih adhezijskih molekul s proteolizo. Zanimivo je, da se ne glede na statistične omejitve zaradi majhnih vzorcev zdi, da je bil vpliv katepsina X precej manjši v kokulturah. O razlogih za to je težko sklepati, možno pa je, da je zaradi prisotnosti celic Jurkat oziroma Jurkat-catX in njihovih površinskih molekul prišlo do tekmovanja za encim, kar bi pomenilo počasnejšo razgradnjo površinskih molekul celic NCTC2544.

Učinek AMS36 se je bolje ujema s pričakovanji, saj je ob njegovem dodatku dejansko prišlo do upada adhezije, ki bi ga pričakovali pri zaviranju cepitve LFA-1 in posledičnem zmanjšanju njegove afinitete. Tudi tu je bil upad bistveno bolj izrazit v monokulturi celic NCTC2544 kot v kokulturah, kar je s predlaganim modelom težko razložiti. Razlike med kokulturama s celicami Jurkat in celicami Jurkat-catX so bile zelo majhne tako pri dodatku katepsina X kot dodatku AMS36, zato vpliva aktivnosti katepsina X v celicah Jurkat ne moremo potrditi.

Da bi izmerili adhezijo v prisotnosti  $\text{INF-}\gamma$ , smo v poskusu poleg njegovega dodatka v gojišče za testne vzorce uporabili celice NCTC2544, ki so bile predhodno 24 h izpostavljene  $\text{INF-}\gamma$ , saj bi sicer bile z njim v stiku precej kratek čas, ki verjetno ne bi bil dovolj dolg, da bi se njegovi učinki na izražanje ICAM-1 polno izrazili. (45) Za kontrolne vzorce smo ohranili običajne celice NCTC2544.

V prisotnosti  $\text{INF-}\gamma$  se je adhezija celic NCTC2544 zmanjšala, v kokulturah pa povečala do te mere, da je bila v prisotnosti  $\text{INF-}\gamma$  v kokulturi s celicami Jurkat statistično značilno večja kot v monokulturi. Tako različnih učinkov  $\text{INF-}\gamma$  ne moremo razložiti zgolj z enostavnim učinkom  $\text{INF-}\gamma$  na zmanjšanje ali zvečanje aktivnosti, saj gre očitno za kompleksnejšo interakcijo, na katero moramo gledati z dveh strani. Po eni strani  $\text{INF-}\gamma$  na

adhezijo vpliva različno v prisotnosti in odsotnosti celic Jurkat in Jurkat-catX, po drugi strani pa ima prisotnost celic limfocitnih linij drugačen vpliv v prisotnosti INF- $\gamma$ . Najverjetnejša se tako zdi razlaga, da INF- $\gamma$  sam po sebi zmanjša adhezijo celic NCTC2544. Možen razlog za to bi lahko bilo tekmovanje z vezavo na druge celice NCTC2544 zaradi večjih količin ICAM-1 na njihovi površini, saj je glede na rezultate konfokalne mikroskopije tudi na celicah NCTC2544 prisotnega precej LFA-1. Lahko gre pri tem tudi za povsem drugačen mehanizem, pri čemer pa se pomembnejši vpliv citotoksičnosti INF- $\gamma$  ne zdi verjeten zaradi enakega začetnega števila celic NCTC2544 v vseh vzorcih in kratkega kontaktnega časa.

Vpliv celic Jurkat in Jurkat-catX na povečano adhezijo v prisotnosti INF- $\gamma$  bi lahko bil posledica interakcije limfocitov s celicami NCTC2544 preko LFA-1 in ICAM-1. Ker je ICAM-1 sposoben prenosa signalov, njegova vezava na ligande pa lahko med drugim privede do reorganizacije aktinskega citoskeleta, bi to lahko privedlo do opaženih razlik v hitrosti adhezije. (62, 77-79) Drug možen mehanizem za učinek limfocitov bi lahko predstavljali citokini in drugi mediatorji, izločeni kot posledica prisotnosti INF- $\gamma$ , vezave na celice NCTC2544 in morebitne aktivacije celic Jurkat, na katero nakazujejo izrazite morfološke spremembe celic Jurkat-catX ob stiku z ICAM-1 v poskusih drugih avtorjev. (23, 24)

Težavo pri tem predstavlja dejstvo, da bi zaradi večje aktivnosti katepsina X in posledično večje afinitete LFA-1 pričakovali, da bo učinek po obeh mehanizmih večji v primeru celic Jurkat-catX, česar pa rezultati niso potrdili. Glede na izmerjeno adhezijo v kokulturah bi namreč lahko kvečjemu skleпали, da je vpliv višje aktivnosti katepsina X na adhezijo zaviralen. Odprto ostaja tudi vprašanje, kako bi v odsotnosti drugih signalov prišlo do aktivacije LFA-1, še posebej pri celicah Jurkat. Če k temu dodamo še pomanjkanje zanesljivih podatkov o vezavi celic Jurkat-catX v prisotnosti INF- $\gamma$  iz konfokalne mikroskopije, je vpliv kokultur težko razložiti, čeprav je glede na rezultate nedvomno prisoten.

Da bi pojasnili pomanjkanje značilnih razlik med linijama Jurkat in Jurkat-catX, smo se odločili preveriti vsebnost in aktivnost katepsina X v lizatih vseh treh uporabljenih celičnih linij. Izmerjena visoka vsebnost katepsina X v lizatu celic NCTC2544 nas je precej presenetila. Glede na rezultate konfokalne mikroskopije smo pričakovali prisotnost znatnih količin katepsina X, nismo pa pričakovali tako izrazite razlike v primerjavi z obema

limfocitnima linijama, ki toliko bolj bode v oči, ker po objavljenih podatkih ni znano, da bi se katepsin X v pomembnejših količinah izražal v keratinocitih. (4) Glede na njegovo izražanje v nekaterih tumorjih lahko tako sklepamo, da je izražanje katepsina X pri celicah NCTC2544 ena od sprememb, do katerih je prišlo pri transformaciji v kontinuirano celično linijo. (7, 8)

Drug presenetljiv podatek predstavlja razlika med vsebnostjo katepsina X v lizatih celic Jurkat in Jurkat-catX. Čeprav so glede na rezultate celice Jurkat-catX izražale več kot dvakrat več katepsina X kot celice Jurkat, je bila razlika vseeno precej manjša od pričakovane 24-kratne. (24) Variabilnost med meritvami je bila dovolj nizka, da lahko z veliko gotovostjo trdimo, da ne gre zgolj za slučajno napako pri meritvah, zato moramo razloge iskati v celicah samih. Glede na to, da je od prvotne transfekcije celic Jurkat-catX minilo precej časa, v katerem so tekom našega in predhodnega dela bile večkrat subkultivirane, je lahko v tem času prišlo do postopnega zmanjšanja izražanja katepsina X v določenem deležu celic Jurkat-catX. Druga možnost, ki je kljub izjemni pazljivosti pri delu s celicami ne moremo povsem izključiti, je, da je tekom našega ali predhodnega dela s celicami prišlo do navzkrižne kontaminacije med celičnima linijama. Ne glede na vzrok za manjšo razliko v vsebnosti katepsina X pa rezultati kažejo na zelo verjetno anomalijo v uporabljenih celičnih linijah.

Glede na veliko razliko v vsebnosti katepsina X ni presenetljivo, da je bila tudi njegova aktivnost statistično značilno večja v lizatih celic NCTC2544 v primerjavi z obema limfocitnima linijama. Morda nekoliko bolj preseneča dejstvo, da je bila razlika v aktivnostih bistveno manjša od razlike v vsebnosti katepsina X, kar pomeni, da je katepsin X v celicah NCTC2544 v povprečju veliko manj aktiven v primerjavi s katepsinom X v celicah Jurkat. O vzrokih za to lahko zgolj ugibamo, kot možna razlaga pa se ponujata njegova pomanjkljiva aktivacija z drugimi peptidazami, zaradi katere bi večina katepsina X ostala v obliki neaktivnega prokatepsina X, ter spremenjena struktura zaradi mutacij gena ali napačnega zvitja. (9)

Kljub majhnemu deležu aktivnega katepsina X je njegova aktivnost v celicah NCTC2544 vendarle znatna, kakšna je njegova funkcija v njih, pa ni znano. Delno lahko nanjo sklepamo iz vpliva AMS36, ki je privedel do zmanjšane adhezije in določenih sprememb v razporeditvi LFA-1. Zanimivo je, da je v obeh primerih učinek AMS36 skoraj izginil v prisotnosti celic Jurkat in Jurkat-catX, kar nekoliko zamegli sliko, vseeno pa bi to lahko

pomenilo, da katepsin X tudi v celicah NCTC2544 med drugim uravnava afiniteto LFA-1.

Za aktivnost katepsina X v lizatih obeh limfocitnih linij smo glede na podatke iz literature pričakovali, da bo aktivnost katepsina X v lizatu celic Jurkat-catX okrog 2,3-krat večja od aktivnosti v lizatu celic Jurkat. (24) Glede na rezultate je bila morebitna razlika med linijama premajhna, da bi jo lahko statistično dokazali, kar potrjuje ugotovitev o anomaliji v celičnih linijah iz prejšnje točke. Izmerjena aktivnost katepsina X je pravzaprav še bolj relevanten podatek od njegove vsebnosti, ker bolj natančno odraža dejansko sposobnost prisotnega katepsina X za cepitev substratov. Ker smo meritev izvedli ob zaključku eksperimentalnega dela, ne moremo vedeti, kdaj točno je prišlo do izenačitve aktivnosti med limfocitnima linijama. Ne glede na to pa zanemarljiva razlika v aktivnosti katepsina X pojasni, zakaj pri veliki večini poskusov nismo zaznali pomembnejših razlik med celicami Jurkat in Jurkat-catX, ki bi se morale izraziti kot posledica višje aktivnosti katepsina X v eni izmed linij.

Pri tem se poraja zanimivo vprašanje, zakaj očitnih znakov povišane aktivnosti katepsina X na ravni posameznih celic nismo opazili pri nobeni od njiju. Če bi bila zmanjšana razlika v vsebnosti in aktivnosti katepsina X res samo posledica navzkrižne kontaminacije, bi pričakovali, da bodo v vzorcih kokultur z obema linijama prisotne celice Jurkat-catX, ki bodo ob stiku z ICAM-1 na celicah NCTC2544 izkazovale morfološke spremembe kot v poskusih drugih avtorjev, česar pa nismo opazili. (23, 24) Čeprav je možen vzrok za to majhno število limfocitov v preparatih, ta ugotovitev do neke mere podpira teorijo, da je prišlo do sprememb v aktivnosti katepsina X tudi na ravni posameznih celic, ki je bila kot kaže premajhna, da bi se njene posledice polno izrazile.

## 7. Zaključki

Z našim delom smo potrdili, da enako kot pri limfocitih T in primarnih keratinocitih v koži tudi interakcija med celicami Jurkat in celicami NCTC2544 v našem eksperimentalnem modelu poteka preko povezave receptorja LFA-1 z adhezijsko molekulo ICAM-1, vendar v pomembnejšem obsegu le ob predhodni izpostavitvi celic NCTC2544 eksogenemu interferonu  $\gamma$ . Same celice Jurkat ga v običajnih pogojih izločajo premalo, zato njihova prisotnost in adhezija na celice NCTC2544 ne vplivata pomembneje na njihovo proliferacijo, morfologijo in sposobnost adhezije na podlago, medtem ko v prisotnosti interferona  $\gamma$  celice Jurkat bistveno povečajo sposobnost adhezije celic NCTC2544.

Jasnega vpliva katepsina X na interakcijo celic Jurkat s celicami NCTC2544 nismo mogli potrditi pri nobenem od izvedenih poskusov. Kokulturi s celicami Jurkat in celicami Jurkat-catX se nista pomembno razlikovali ne v preživetju oziroma proliferaciji celic NCTC2544 in njihovi adheziji niti v razporeditvi LFA-1 in katepsina X po celicah ter njuni kolokalizaciji. Glavni razlog za to je bila najverjetneje premajhna razlika v aktivnosti katepsina X med uporabljenima limfocitnima linijama, kar smo kasneje tudi sami pokazali.

Nekoliko presenetljivo smo ugotovili, da tudi celice NCTC2544 izražajo razmeroma velike količine katepsina X, ki je vsaj delno tudi aktiven, zato ni izključeno, da ima tudi v tej celični liniji pomembno vlogo. Določen vpliv njegovega inhibitorja AMS36 na adhezijo in razporeditev katepsina X in LFA-1 po celici govori v prid tej možnosti, vendar bodo za dokončno razjasnitev njegove funkcije potrebne nadaljnje raziskave.

### 7.1 Omejitve raziskave in predlogi za nadaljnje raziskave

Glede na to, da nismo uspeli v celoti potrditi ali ovreči hipoteze o vplivu katepsina X, lahko naše raziskovalno delo morda najboljše označimo kot preliminarno raziskavo. Njene omejitve izhajajo predvsem iz uporabljenih metod in celičnih linij ter nekaterih težav, ki smo jih opazili pri delu z njimi. Njihova nadgradnja lahko predstavlja osnovo za nadaljnje delo na tem področju.

Uporabljeni testi preživetja zaradi razmeroma hitre delitve celic NCTC2544 denimo ne razlikujejo med citotoksičnimi učinki in zaviranjem proliferacije, zato bi lahko dodatne informacije o hitrosti proliferacije celic NCTC2544 dobili preko merjenja števila celičnih delitev s pretočno citometrijo. Majhni vzorci celic Jurkat in še posebej Jurkat-catX v



preparatih s kokulturami otežujejo pridobivanje jasne slike o dogajanju na celični ravni, zato bi preparate s kokulturami lahko poskusili pripraviti še po postopku za suspenzijske celice, ki vključuje vmesno centrifugiranje. Majhna moč statističnih testov je bila problematična tudi pri testih adhezije, kjer smo zaradi omejenih sredstev izvedli manj bioloških ponovitev. Pri nadaljnjem delu bi zato bilo smiselno uporabiti več bioloških ponovitev, pri tem pa se osredotočiti samo na nekatere najbolj relevantne vzorce, na primer vpliv obeh kokultur v prisotnosti INF- $\gamma$ . Z dodatkom INF- $\gamma$  bi bilo zanimivo ponoviti še nekatere druge poskuse, ki jih tekom našega dela nismo uspeli, na primer izmeriti hitrost proliferacije celic NCTC2544 v kokulturah s celicami Jurkat ob prisotnosti INF- $\gamma$ .

Največjo omejitev naše raziskave nedvomno predstavlja majhna razlika v aktivnosti katepsina X med obema limfocitnima linijama. Najbolje bi bilo zato pri nadaljnjem delu ponovno pridobiti celice Jurkat divjega tipa iz celične banke, celice Jurkat-catX pa ponovno pripraviti s postopkom transfekcije s plazmidom, ki nosi genski zapis za katepsin X. Izražanje katepsina X bi, čeprav naj bi bilo stabilno, tudi tekom dela s celicami bilo priporočljivo večkrat preveriti.

Precejšnjo neznanco predstavlja vloga katepsina X v celicah NCTC2544. Z uporabo kontrolnih poskusov z dodanim AMS36 smo lahko njegov vpliv na rezultate drugih poskusov omejili, vseeno pa bi se lahko temu vplivu najbolj zanesljivo izognili z uporabo drugih podobnih celičnih linij, kot je na primer linija HaCat, v primeru da te izražajo manj katepsina X. Tudi sicer pa bi v nadaljevanju bilo smiselno poskuse ponoviti še z uporabo primarnih keratinocitov, ker predstavljajo najbolj relevanten možen celični model za modeliranje procesov v kožnem tkivu.

## 8. Viri

1. Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*. 2016 Jan 4;44(D1):D343-50. PubMed PMID: 26527717. Pubmed Central PMCID: 4702814.
2. Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie*. 2008 Feb;90(2):194-207. PubMed PMID: 17825974.
3. Turk V, Kos J, Turk B. Cysteine cathepsins (proteases)--on the main stage of cancer? *Cancer cell*. 2004 May;5(5):409-10. PubMed PMID: 15144947.
4. Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Zavasnik Bergant V, Langerholc T, Turk B, et al. Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Experimental cell research*. 2005 May 15;306(1):103-13. PubMed PMID: 15878337.
5. Pisljar A, Kos J. Cysteine cathepsins in neurological disorders. *Molecular neurobiology*. 2014 Apr;49(2):1017-30. PubMed PMID: 24234234.
6. Wendt W, Zhu XR, Lubbert H, Stichel CC. Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Experimental neurology*. 2007 Apr;204(2):525-40. PubMed PMID: 17306794.
7. Nagler DK, Kruger S, Kellner A, Ziomek E, Menard R, Buhtz P, et al. Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *The Prostate*. 2004 Jul 1;60(2):109-19. PubMed PMID: 15162377.
8. Krueger S, Kalinski T, Hundertmark T, Wex T, Kuster D, Peitz U, et al. Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *The Journal of pathology*. 2005 Sep;207(1):32-42. PubMed PMID: 16025436.
9. Sivaraman J, Nagler DK, Zhang R, Menard R, Cygler M. Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *Journal of molecular biology*. 2000 Jan 28;295(4):939-51. PubMed PMID: 10656802.
10. Guncar G, Klemencic I, Turk B, Turk V, Karaoglanovic-Carmona A, Juliano L, et al. Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure*. 2000 Mar 15;8(3):305-13. PubMed PMID: 10745011.
11. Puzer L, Cotrin SS, Cezari MH, Hirata IY, Juliano MA, Stefe I, et al. Recombinant human cathepsin X is a carboxymonopeptidase only: a comparison with cathepsins B and L. *Biological chemistry*. 2005 Nov;386(11):1191-5. PubMed PMID: 16307485.
12. Puzer L, Cotrin SS, Alves MF, Egborge T, Araujo MS, Juliano MA, et al. Comparative substrate specificity analysis of recombinant human cathepsin V and cathepsin L. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2004 Oct 15;430(2):274-83. PubMed PMID: 15369827.
13. Jevnikar Z, Obermajer N, Kos J. LFA-1 fine-tuning by cathepsin X. *IUBMB life*. 2011 Sep;63(9):686-93. PubMed PMID: 21796748.
14. Kos J, Vizin T, Fonovic UP, Pisljar A. Intracellular signaling by cathepsin X: molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Seminars in cancer biology*. 2015 Apr;31:76-83. PubMed PMID: 24835450.
15. Klemencic I, Carmona AK, Cezari MH, Juliano MA, Juliano L, Guncar G, et al. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2000 Sep;267(17):5404-12. PubMed PMID: 10951198.

16. Obermajer N, Premzl A, Zavasnik Bergant T, Turk B, Kos J. Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Experimental cell research*. 2006 Aug 1;312(13):2515-27. PubMed PMID: 16774752.
17. Sadaghiani AM, Verhelst SH, Gocheva V, Hill K, Majerova E, Stinson S, et al. Design, synthesis, and evaluation of in vivo potency and selectivity of epoxysuccinyl-based inhibitors of papain-family cysteine proteases. *Chemistry & biology*. 2007 May;14(5):499-511. PubMed PMID: 17524981.
18. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonovic UP, Kos J. Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009 Aug-Sep;41(8-9):1685-96. PubMed PMID: 19433310.
19. Hafner A, Obermajer N, Kos J. gamma-1-syntrophin mediates trafficking of gamma-enolase towards the plasma membrane and enhances its neurotrophic activity. *Neuro-Signals*. 2010;18(4):246-58. PubMed PMID: 21358174.
20. Hafner A, Obermajer N, Kos J. gamma-Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. *The Biochemical journal*. 2012 Apr 15;443(2):439-50. PubMed PMID: 22257123.
21. Obermajer N, Svajger U, Bogyo M, Jeras M, Kos J. Maturation of dendritic cells depends on proteolytic cleavage by cathepsin X. *Journal of leukocyte biology*. 2008 Nov;84(5):1306-15. PubMed PMID: 18701767. Pubmed Central PMCID: 3252843.
22. Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Sadaghiani AM, Bogyo M, Kos J. Cathepsin X-mediated beta2 integrin activation results in nanotube outgrowth. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009 Mar;66(6):1126-34. PubMed PMID: 19194656.
23. Jevnikar Z, Obermajer N, Kos J. Cysteine protease-mediated cytoskeleton interactions with LFA-1 promote T-cell morphological changes. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2009 Nov;66(11):1030-40. PubMed PMID: 19670215.
24. Jevnikar Z, Obermajer N, Bogyo M, Kos J. The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *Journal of cell science*. 2008 Aug 15;121(Pt 16):2652-61. PubMed PMID: 18664495.
25. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):673-87. PubMed PMID: 12297042.
26. Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *Journal of immunology*. 2013 May 1;190(9):4451-7. PubMed PMID: 23606722.
27. Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacology & therapeutics*. 2015 Mar;147:123-35. PubMed PMID: 25448040. Pubmed Central PMCID: 4324083.
28. Xie C, Zhu J, Chen X, Mi L, Nishida N, Springer TA. Structure of an integrin with an alphaI domain, complement receptor type 4. *The EMBO journal*. 2010 Feb 3;29(3):666-79. PubMed PMID: 20033057. Pubmed Central PMCID: 2830704.
29. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology*. 2007;25:619-47. PubMed PMID: 17201681. Pubmed Central PMCID: 1952532.
30. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature reviews Immunology*. 2005 Jul;5(7):546-59. PubMed PMID: 15965491.
31. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992 Apr 3;69(1):11-25. PubMed PMID: 1555235.
32. Hibbs ML, Jakes S, Stacker SA, Wallace RW, Springer TA. The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 beta subunit: sites required for

- binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *The Journal of experimental medicine*. 1991 Nov 1;174(5):1227-38. PubMed PMID: 1682411. Pubmed Central PMCID: 2119009.
33. Lub M, van Vliet SJ, Oomen SP, Pieters RA, Robinson M, Figdor CG, et al. Cytoplasmic tails of beta 1, beta 2, and beta 7 integrins differentially regulate LFA-1 function in K562 cells. *Molecular biology of the cell*. 1997 Apr;8(4):719-28. PubMed PMID: 9247650. Pubmed Central PMCID: 276121.
34. Verma NK, Kelleher D. Adaptor regulation of LFA-1 signaling in T lymphocyte migration: Potential druggable targets for immunotherapies? *European journal of immunology*. 2014 Dec;44(12):3484-99. PubMed PMID: 25251823.
35. Springer TA, Dustin ML. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Current opinion in cell biology*. 2012 Feb;24(1):107-15. PubMed PMID: 22129583. Pubmed Central PMCID: 3294052.
36. Malissen B. Dancing the immunological two-step. *Science*. 1999 Jul 9;285(5425):207-8. PubMed PMID: 10428718.
37. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999 Jul 9;285(5425):221-7. PubMed PMID: 10398592.
38. Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, Liese J, Blair DA, Waite J, et al. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annual review of immunology*. 2010;28:79-105. PubMed PMID: 19968559. Pubmed Central PMCID: 2885351.
39. Smith A, Stanley P, Jones K, Svensson L, McDowall A, Hogg N. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunological reviews*. 2007 Aug;218:135-46. PubMed PMID: 17624950.
40. Mor A, Dustin ML, Philips MR. Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling. *Immunological reviews*. 2007 Aug;218:114-25. PubMed PMID: 17624948.
41. Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell*. 1990 Apr 20;61(2):243-54. PubMed PMID: 1970514.
42. van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *Journal of molecular medicine*. 1996 Jan;74(1):13-33. PubMed PMID: 8834767.
43. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *Journal of immunology*. 1986 Jul 1;137(1):245-54. PubMed PMID: 3086451.
44. Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *Journal of immunology*. 1986 Sep 15;137(6):1893-6. PubMed PMID: 3091693.
45. Dustin ML, Singer KH, Tuck DT, Springer TA. Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *The Journal of experimental medicine*. 1988 Apr 1;167(4):1323-40. PubMed PMID: 3128630. Pubmed Central PMCID: 2188928.
46. Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *The Journal of cell biology*. 1988 Jul;107(1):321-31. PubMed PMID: 3134364. Pubmed Central PMCID: 2115164.

47. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990 Aug 2;346(6283):425-34. PubMed PMID: 1974032.
48. Cairo CW, Mirchev R, Golan DE. Cytoskeletal regulation couples LFA-1 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity*. 2006 Aug;25(2):297-308. PubMed PMID: 16901728.
49. Stanley P, Smith A, McDowall A, Nicol A, Zicha D, Hogg N. Intermediate-affinity LFA-1 binds alpha-actinin-1 to control migration at the leading edge of the T cell. *The EMBO journal*. 2008 Jan 9;27(1):62-75. PubMed PMID: 18079697. Pubmed Central PMCID: 2147999.
50. Smith A, Carrasco YR, Stanley P, Kieffer N, Batista FD, Hogg N. A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *The Journal of cell biology*. 2005 Jul 4;170(1):141-51. PubMed PMID: 15983060. Pubmed Central PMCID: 2171377.
51. Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *Journal of cell science*. 2009 Jan 15;122(Pt 2):159-63. PubMed PMID: 19118207. Pubmed Central PMCID: 2714413.
52. Ginsberg MH. Integrin activation. *BMB reports*. 2014 Dec;47(12):655-9. PubMed PMID: 25388208. Pubmed Central PMCID: 4345508.
53. Xi X, Flevaris P, Stojanovic A, Chishti A, Phillips DR, Lam SC, et al. Tyrosine phosphorylation of the integrin beta 3 subunit regulates beta 3 cleavage by calpain. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Oct 6;281(40):29426-30. PubMed PMID: 16935858.
54. Pfaff M, Du X, Ginsberg MH. Calpain cleavage of integrin beta cytoplasmic domains. *FEBS letters*. 1999 Oct 22;460(1):17-22. PubMed PMID: 10571053.
55. Jevnikar Z, Obermajer N, Doljak B, Turk S, Gobec S, Svajger U, et al. Cathepsin X cleavage of the beta2 integrin regulates talin-binding and LFA-1 affinity in T cells. *Journal of leukocyte biology*. 2011 Jul;90(1):99-109. PubMed PMID: 21454358.
56. Jevnikar Z, Obermajer N, Pecar-Fonovic U, Karaoglanovic-Carmona A, Kos J. Cathepsin X cleaves the beta2 cytoplasmic tail of LFA-1 inducing the intermediate affinity form of LFA-1 and alpha-actinin-1 binding. *European journal of immunology*. 2009 Nov;39(11):3217-27. PubMed PMID: 19750481.
57. Boehncke W-H, Schön MP. Psoriasis. *The Lancet*. 2015;386(9997):983-94.
58. Jullien D, Prinz JC, Langley RG, Caro I, Dummer W, Joshi A, et al. T-cell modulation for the treatment of chronic plaque psoriasis with efalizumab (Raptiva): mechanisms of action. *Dermatology*. 2004;208(4):297-306. PubMed PMID: 15178911.
59. Basham TY, Nickoloff BJ, Merigan TC, Morhenn VB. Recombinant gamma interferon differentially regulates class II antigen expression and biosynthesis on cultured normal human keratinocytes. *Journal of interferon research*. 1985 Winter;5(1):23-32. PubMed PMID: 3921630.
60. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. Interferon-gamma-stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *The Journal of investigative dermatology*. 1998 Feb;110(2):138-42. PubMed PMID: 9457908.
61. Black AP, Ardern-Jones MR, Kasprovicz V, Bowness P, Jones L, Bailey AS, et al. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *European journal of immunology*. 2007 Jun;37(6):1485-93. PubMed PMID: 17506032.
62. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological reports : PR*. 2009 Jan-Feb;61(1):22-32. PubMed PMID: 19307690.
63. Seminara NM, Gelfand JM. Assessing long-term drug safety: lessons (re) learned from raptiva. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2010 Mar;29(1):16-9. PubMed

PMID: 20430303. Pubmed Central PMCID: 2864916.

64. Kos J, Pecar Fonovic U. Efficient removal of cathepsin L from active cathepsin X using immunoprecipitation technique. *Acta chimica slovenica*. 2009;letnik 56(številka 4):str. 987-8.

65. Donnelly M, Scheffler IE. Energy metabolism in respiration-deficient and wild type Chinese hamster fibroblasts in culture. *Journal of cellular physiology*. 1976 Sep;89(1):39-51. PubMed PMID: 8468.

66. Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *The Journal of biological chemistry*. 1979 Apr 25;254(8):2669-76. PubMed PMID: 429309.

67. Sharfstein ST, Tucker SN, Mancuso A, Blanch HW, Clark DS. Quantitative in vivo nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism. *Biotechnology and bioengineering*. 1994 May;43(11):1059-74. PubMed PMID: 18615517.

68. Hassell T, Gleave S, Butler M. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Applied biochemistry and biotechnology*. 1991 Jul;30(1):29-41. PubMed PMID: 1952924.

69. Schneider M, Marison IW, von Stockar U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of biotechnology*. 1996 May 15;46(3):161-85. PubMed PMID: 8672289.

70. Bonzon-Kulichenko E, Martinez-Martinez S, Trevisan-Herraz M, Navarro P, Redondo JM, Vazquez J. Quantitative in-depth analysis of the dynamic secretome of activated Jurkat T-cells. *Journal of proteomics*. 2011 Dec 21;75(2):561-71. PubMed PMID: 21920478.

71. Arnold R, Seifert M, Asadullah K, Volk HD. Crosstalk between keratinocytes and T lymphocytes via Fas/Fas ligand interaction: modulation by cytokines. *Journal of immunology*. 1999 Jun 15;162(12):7140-7. PubMed PMID: 10358159.

72. Matsue H, Kobayashi H, Hosokawa T, Akitaya T, Ohkawara A. Keratinocytes constitutively express the Fas antigen that mediates apoptosis in IFN gamma-treated cultured keratinocytes. *Archives of dermatological research*. 1995;287(3-4):315-20. PubMed PMID: 7541192.

73. Viard-Leveugle I, Gaide O, Jankovic D, Feldmeyer L, Kerl K, Pickard C, et al. TNF-alpha and IFN-gamma are potential inducers of Fas-mediated keratinocyte apoptosis through activation of inducible nitric oxide synthase in toxic epidermal necrolysis. *The Journal of investigative dermatology*. 2013 Feb;133(2):489-98. PubMed PMID: 22992806.

74. Stanley P, Tooze S, Hogg N. A role for Rap2 in recycling the extended conformation of LFA-1 during T cell migration. *Biology open*. 2012 Nov 15;1(11):1161-8. PubMed PMID: 23213397. Pubmed Central PMCID: 3507183.

75. Buckle AM, Hogg N. Human memory T cells express intercellular adhesion molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon-gamma. *European journal of immunology*. 1990 Feb;20(2):337-41. PubMed PMID: 1690133.

76. Nascimento FD, Rizzi CC, Nantes IL, Stefe I, Turk B, Carmona AK, et al. Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2005 Apr 15;436(2):323-32. PubMed PMID: 15797245.

77. Carpen O, Pallai P, Staunton DE, Springer TA. Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin. *The Journal of cell biology*. 1992 Sep;118(5):1223-34. PubMed PMID: 1355095. Pubmed Central PMCID: 2289592.

78. Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *The Journal of cell biology*.

2002 Jun 24;157(7):1233-45. PubMed PMID: 12082081. Pubmed Central PMCID: 2173557.

79. Gross CC, Brzostowski JA, Liu D, Long EO. Tethering of intercellular adhesion molecule on target cells is required for LFA-1-dependent NK cell adhesion and granule polarization. *Journal of immunology*. 2010 Sep 1;185(5):2918-26. PubMed PMID: 20675589. Pubmed Central PMCID: 3867939.