

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TIMOTEJ ŽVANUT

**ZAVIRANJE KATEPSINA X Z ENDOGENIMI ZAVIRALCI
CISTEINSKIH PEPTIDAZ**

MAGISTRSKA NALOGA

**Inhibition of cathepsin X by endogenous cysteine peptidase
inhibitors**

MASTER'S THESIS

Ljubljana 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. Urše Pečar Fonović, univ.dipl.biol.

ZAHVALA

Iskreno in najlepše se zahvaljujem predvsem mentorici doc. dr. Urši Pečar Fonović, univ.dipl.biol. za vso izkazano strokovno pomoč in prijazne nasvete tako pri samem laboratorijskem delu kot tudi pri pisanju naloge. Zahvaljujem se ji za veliko pripravljenost in dostopnost ter seveda za veliko mero potrpežljivosti.

Zahvaljujem se tudi dr. Marku Novincu s FKKT, Katedre za biokemijo, za prispevane tiropine, in dr. Milici Perišić z IJS (Odsek za biotehnologijo) za oba cistatina F.

Hvala tudi vsem drugim sodelavcem Katedre za farmacevtsko biologijo za pomoč in vse nasvete.

Zahvaljujem se prav vsem, ki so mi stali ob strani in mi kakorkoli pomagali na študijski poti, še posebej domači družini za veliko podporo, pomoč in spodbudne besede.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Urše Pečar Fonović, univ.dipl.biol.

Timotej Žvanut

KAZALO VSEBINE

I.	POVZETEK	I
II.	ABSTRACT	III
III.	OKRAJŠAVE	V
1.	UVOD	1
1.1	PEPTIDAZE	1
1.2	KATEPSINI/CISTEINSKI KATEPSINI	1
1.2.1	Delitev, osnovne značilnosti in zgradba	1
1.2.2	Lokalizacija, funkcija in regulacija aktivnosti	3
1.3	KATEPSIN X	4
1.3.1	Osnovne značilnosti katepsina X, njegova razširjenost in zgradba	4
1.3.2	Fiziološka vloga katepsina X	5
1.4	VLOGA KATEPSINA X PRI PATOGENEZI RAKA	6
1.5	ZAVIRALCI KATEPSINA X	9
1.5.1	Endogeni zaviralci katepsinov	9
1.5.2	Eksogeni zaviralci katepsina X	12
2.	NAMEN DELA	13
3.	MATERIALI IN METODE	14
3.1	MATERIALI	14
3.1.1	Reagenti in kemikalije	14
3.1.2	Laboratorijski instrumenti in oprema	16
3.1.3	Standardi in protitelesa	18
3.1.4	Pufri in puferski sistemi	18
3.1.5	Celična linija U937	20
3.1.6	Gojišča	20
3.1.7	Geli	21
3.2	METODE	22
3.2.1	Encimska kinetika	22

3.2.2	Postopki rokovanja s celično linijo U937	27
3.2.3	Diferenciacija celic	28
3.2.4	Priprava lizatov nediferenciranih celic	28
3.2.5	Priprava lizatov diferenciranih celic	29
3.2.6	Določevanje celotne koncentracije proteinov	29
3.2.7	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE)	30
3.2.8	Prenos western in odstranjevanje vezanih protiteles	31
3.2.9	Statistična analiza in obdelava podatkov	33
4.	REZULTATI	34
4.1	Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku cistatina C	34
4.2	Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku stefinov A in B	36
4.3	Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku cistatina F	39
4.4	Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku kokošjega cistatina	40
4.5	Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku tiropinov (zaviralcev s tiroglobulinsko domeno tipa 1)	42
4.6	Diferenciacija celične linije U937 in določitev celotne koncentracije proteinov v celičnem lizatu	43
4.7	Katepsin X v lizatih	45
4.7.1	Določanje aktivnosti katepsina X v lizatih nediferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev	45
4.7.2	Določanje aktivnosti katepsina X v lizatih diferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev	45
4.8	Katepsin L v lizatih	46
4.8.1	Določanje aktivnosti katepsina L v lizatih nediferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev	46
4.8.2	Določanje aktivnosti katepsina L v lizatih diferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev	47

4.9	Določanje prisotnosti katepsina L v lizatih nediferenciranih in diferenciranih celic U937	49
5.	RAZPRAVA	51
6.	SKLEPI	59
7.	LITERATURA	60

KAZALO SLIK

Slika 1:	Zvitje zrele oblike cisteinskih katepsinov	2
Slika 2:	Princip FRET	22
Slika 3:	Prenos western	33
Slika 4:	Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku naraščajočih koncentracij cistatina C	34
Slika 5:	Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku cistatina C ter regulaciji temperature meritve in predinkubacije	35
Slika 6:	Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku različnih serij cistatina C	35
Slika 7:	Graf aktivnosti katepsina B ob dodatku cistatina C	36
Slika 8:	Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku stefinov A in B (ločena inkubacija)	37
Slika 9:	Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku stefinov A in B (skupna predinkubacija)	38
Slika 10:	Graf aktivnosti katepsina L ob dodatku stefinov A in B	38
Slika 11:	Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku cistatina F	39
Slika 12:	Graf aktivnosti katepsina L ob dodatku obeh cistatinov F	40
Slika 13:	Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku kokošnjega cistatina	41
Slika 14:	Graf aktivnosti katepsina B ob dodatku kokošnjega cistatina	41
Slika 15:	Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku tiropinskih zaviralcev	42
Slika 16:	Graf aktivnosti katepsina L ob dodatku tiropinskih zaviralcev	43
Slika 17:	Morfološke razlike med nediferenciranimi in diferenciranimi celicami linije U937	43

Slika 18: Umeritvena krivulja pri določanju celotne koncentracije proteinov	44
Slika 19: Graf aktivnosti katepsina X v lizatih nediferenciranih celic ob dodatku izbranih zaviralcev	45
Slika 20: Graf aktivnosti katepsina X v lizatih diferenciranih celic ob dodatku izbranih zaviralcev	46
Slika 21: Profil aktivnosti katepsina L v lizatih nediferenciranih celic	47
Slika 22: Profil aktivnosti katepsina L v lizatu diferenciranih celic	48
Slika 23: Graf aktivnosti katepsina L v lizatih diferenciranih celic ob dodatku izbranih zaviralcev	48
Slika 24: Detekcija katepsina L s specifičnimi protitelesi z metodo prenos western	49
Slika 25: Detekcija β -aktina s specifičnimi protitelesi z metodo prenos western	50

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Reagenti in kemikalije	14
Preglednica II: Laboratorijski instrumenti in oprema	16
Preglednica III: Splošen postopek pri testiranju encimske kinetike	23
Preglednica IV: Kontrola posameznih zaviralcev	23
Preglednica V: Shema nanosa vseh potrebnih komponent za določanje celotne koncentracije proteinov	30
Preglednica VI: Celotna koncentracija proteinov	44
Preglednica VII: Primerjava treh različnih testiranj inhibicije katepsina X	52

KAZALO ENAČB

Enačba 1	28
-----------------------	----

I. POVZETEK

Katepsin X je lizosomska cisteinska peptidaza, ki opravlja v telesu pomembno fiziološko vlogo. Kadar je uravnavanje njegovega delovanja iztirjeno, pride do škodljivih učinkov na organizem. Povečano izražanje katepsina X povezujejo z nastankom in razvojem številnih patoloških procesov, predvsem raka in nevrodegenerativnih bolezni.

Pomemben mehanizem uravnavanja aktivnosti katepsinov je njihova endogena inhibicija, ki pa pri katepsinu X še ni čisto razjasnjena. Cistatini, ki veljajo za glavne endogene zaviralce katepsinov, so precej neselektivni, medtem ko so tiropini sicer slabše raziskani, a v nasprotju s prej omenjenimi so selektivnejši. O endogeni inhibiciji katepsina X sta bili v preteklosti izvedeni dve raziskavi, ki pa se med seboj v marsičem precej razlikujeta. Zato smo v magistrski nalogi želeli natančneje ovrednotiti endogene zaviralce cisteinskih peptidaz. Ker smo uporabili specifični substrat katepsina X in čistejši rekombinantni encim, bo doprinos našega dela še toliko bolj natančen.

Testirali smo večino potencialnih endogenih zaviralcev katepsina X in s pomočjo merjenja odzivov encimske kinetike ob razgradnji fluorogenega substrata ugotovili, da nobeden od izbranih zaviralcev ni zaviral rekombinantnega katepsina X.

Zaradi možnih razlik med rekombinantnim in nativnim encimom smo testirali še inhibicijo nativnega katepsina X v lizatih nediferenciranih celic U937, a smo tudi tu inhibicijo ovrgli. Kontrolo metode smo izvedli na rekombinantnih katepsinih B in L ter na nativnem katepsinu L. V lizatu nismo mogli izmeriti aktivnosti katepsina L, kar so ugotovili že v študiji [Atkins in sodelavci, 1995], kjer so zaznali povečano pojavnost aktivnega katepsina L v diferenciranih celicah U937. Da bi lahko izvedli kontrolo prejšnje metode, smo celice diferencirali in testirali večino prej omenjenih zaviralcev. Pri katepsinu X spet nismo zaznali inhibicije, medtem ko je bila ta pri katepsinu L prisotna.

Različno pojavnost katepsina L smo dokazali na dva načina (primerjava profilov aktivnosti katepsina L v obeh lizatih in izražanje katepsina L s prenosom western).

Sklepamo lahko, da katepsin X nima endogenega zaviralca, zato morajo biti drugi mehanizmi uravnavanja njegove aktivnosti toliko bolj izraženi.

KLJUČNE BESEDE: katepsin X, endogeni zaviralci, encimska kinetika

II. ABSTRACT

Cathepsin X is a lysosomal cysteine peptidase, which plays a significant physiological role. When the regulation of its activity is disrupted, it leads to harmful effects on an organism. Higher expression of cathepsin X is related to development and progression of several pathological processes, predominantly cancer and neurodegenerative diseases.

An important mechanism of regulation of cathepsins activity is their endogenous inhibition, which for cathepsin X is not yet explained. Cystatins, which are considered as main endogenous inhibitors of cathepsins, are rather non-selective, tyrosins on the contrary are more selective but less studied.

Two studies regarding endogenous inhibition of cathepsin X were performed in the past with different conclusions. However, in the master's thesis, we wanted to evaluate various endogenous inhibitors of cysteine peptidases more thoroughly. We used a specific substrate of cathepsin X and more pure recombinant enzyme, so the contribution of our work will be much more accurate.

We tested the majority of potential endogenous cathepsin X inhibitors. By measuring responses of enzymatic kinetics at fluorogenic substrate degradation, we concluded that none of the selected inhibitors possess inhibitory effect on recombinant cathepsin X. Due to some minor structural distinctions between a recombinant and a native enzyme, we then tested the inhibition of native cathepsin X in the lysates of non-differentiated cells U937 but we again refuted the inhibition. The control of the method was done with the recombinant cathepsins B and L and native cathepsin L.

The cathepsin L activity in the lysates of non-differentiated cells could not have been measured, which was already shown in [Atkins et al., 1995] where the increased expression of active cathepsin L was detected only in differentiated cells U937. In order to perform the control of the previous method, we differentiated the cells and tested the majority of inhibitors. Once again, there was no inhibition of cathepsin X whereas the inhibition was present with cathepsin L.

We proved different expression of cathepsin L with two different methods (comparison of profiles of cathepsin L activity in both lysates and expression of cathepsin L by using western blot transfer).

We concluded that there is no endogenous inhibitor of cathepsin X. Therefore, we propose that other mechanisms of regulation of its activity must be more pronounced.

KEYWORDS: cathepsin X, endogenous inhibitors, enzyme kinetics

III. OKRAJŠAVE

Abz – orto-aminobenzoil (ang. *ortho-aminobenzoyl*)

AMC – 7-amino-4-metil kumarin (ang. *7-amino-4-methylcoumarin*)

BSA – goveji serumski albumin (ang. *bovine serum albumin*)

cat – katepsin (ang. *cathepsin*)

CD – označevalec pripadnosti (ang. *cluster of differentiation*)

CRES – s cistatinom povezan epididimalni spermatogeni protein (ang. *cystatin related epididymal spermatogenic*)

CXCL – kemokinski ligand (ang. *chemokine ligand*)

DMSO – dimetil sulfoksid

Dnp – 2,4-dinitrofenil (ang. *2,4-dinitrophenyl*)

DTT – ditiotritol

EDTA – etilendiamintetraočetna kislina (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ECM – zunajcelični matriks (ang. *extracellular matrix*)

FBS – fetalni goveji serumski albumin (ang. *fetal bovine serum*)

FRET – resonančni prenos energije s fluorescenco (ang. *fluorescence resonance energy transfer*)

HRP – hrenova peroksidaza

HSPG – heparan sulfat proteoglikani

Ki – konstanta inhibicije

LFA-1 – z limfocitno funkcijo povezan antigen-1 (ang. *lymphocyte function-associated antigen-1*)

Mac-1 – makrofagni antigen-1 (ang. *macrophage-1 antigen*)

mRNA – informacijska RNA (ang. *messenger RNA*)

pAb – poliklonska protitelesa (ang. *polyclonal antibodies*)

PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza

PBS – fosfatni pufer z NaCl (ang. *phosphate buffered saline*)

PEG – polietilenglikol

PKC – protein kinaza C

PMA – forbol miristat acetat (ang. *phorbol myristate acetate*)

RFU – enota relativne fluorescence (ang. *relative fluorescence unit*)

rpm – število obratov na minuto (ang. *revolutions per minute*)

SD – standardna deviacija

SDS – natrijev dodecilsulfat (ang. *sodium dodecyl sulphate*)

Tris – tris(hidroksimetil)amino metan

TEMED – tetrametil-etilen-diamin (ang. *tetramethylethylenediamine*)

1 UVOD

1.1 PEPTIDAZE

Peptidaze spadajo v skupino encimov, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v polipeptidni verigi. Mehanizem, ki je v ozadju, je nukleofilni napad na elektrofilno zvrst, ki jo v primeru proteinov predstavlja karbonilna funkcionalna skupina amidne vezi. [1] Peptidaze so prisotne v vseh organizmih. Glede na strukturo in kemijsko aktivne aminokislinske preostanke v aktivnem mestu jih delimo na osem glavnih skupin (serinske, cisteinske, treoninske, aspartatne, glutamatne, asparaginske, metalopeptidaze in peptidaze mešanega tipa). [2]

V širšem smislu uporabljamo dva izraza, ki označujeta mesto cepitve peptidne vezi. Ločimo eksopeptidaze, ki odstranijo eno ali nekaj aminokislinskih preostankov na N- ali C-končnem delu polipeptidne verige, in endopeptidaze, ki cepijo peptidno vez znotraj peptidne verige. Pri tem pa delimo eksopeptidaze še na karboksipeptidaze in aminopeptidaze, odvisno od tega, kje pride do cepitve – na C- ali N-končnem delu polipeptidne verige. [1, 3]

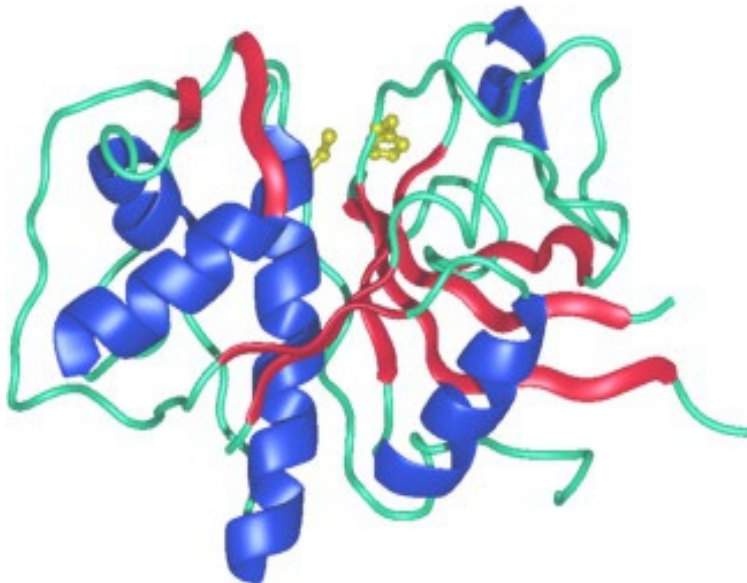
1.2 KATEPSINI/CISTEINSKI KATEPSINI

1.2.1 Delitev, osnovne značilnosti in zgradba

Katepsini so raznolika skupina peptidaz, pri katerih ločimo serinske katepsine (katepsina A in G), aspartatne katepsine (katepsina D in E) in cisteinske katepsine, ki so najštevilčnejša skupina katepsinov. [4] Znanih je enajst človeških cisteinskih katepsinov: B, H, L, C, X, W, O, K, F, S in V, vsi pa pripadajo papainski družini oz. družini C1 in klanu cisteinskih peptidaz CA. So monomerni proteini z molekulsko maso v območju med 20 in 35 kDa. Izjema je katepsin C, ki s svojo tetramerno strukturo presega molekulsko maso 200 kDa. [5] Cisteinski katepsini so po aminokislinskem zaporedju in vzorcu zvitja podobni papainu. Zgrajeni so iz leve in desne domene, ki sta si po velikosti dokaj podobni. Levo domeno na N-koncu sestavljajo tri α -vijačnice, medtem ko je desna domena na C-koncu oblikovana v

obliki β -sodčka. S pomočjo kristalnih struktur kompleksa encima in zaviralca so ugotovili, da se substrat veže v aktivno mesto katepsinov v iztegnjeni konformaciji. Aktivno mesto katepsinov leži nekje v sredini med levo in desno domeno, sestavljeno pa je iz dveh aminokislinskih preostankov: iz Cys25 na levi ter iz His159 (številčenje glede na papain) na desni domeni (slika 1). Ta dva interagirata z vezavno skupino na vezočem substratu, tvorita pa tudi tiolat-imidazolni ionski par, ki je ključnega pomena za proteolitično aktivnost encima. Poleg teh dveh aminokislin pa imajo pomembno vlogo tudi tiste, ki so v zviti konformaciji v relativni bližini aktivnega mesta ter tako pripomorejo k večji katalitični učinkovitosti same proteolize. [4, 6, 7]

Katepsina X (karboksimonopeptidaza) in C (aminodipeptidaza) sta le eksopeptidazi, katepsin H je endopeptidaza in aminopeptidaza, katepsin B pa je endopeptidaza in karboksidipeptidaza. K tem razlikam pripomorejo dodatni strukturni elementi, ki po eni strani kot sterična ovira preprečujejo dostop nekaterim substratom v aktivno mesto encima, po drugi strani pa olajšajo vezavo na končne dele peptidov, saj omogočajo dodatne elektrostatske interakcije. Na podlagi tega lahko katepsina B in H tudi uravnava svojo endo- oz. eksopeptidazno aktivnost. [4, 7]



Slika 1: Zvitje zrele oblike cisteinskih katepsinov (konkretno katepsina L). Z zeleno barvo je prikazano zvitje nativnega katepsina L, modra barva ponazarja α -vijačnice, rdeča pa β -ploskve. Stranski verigi aminokislin, ki tvorita aktivno mesto (Cys25 in His163) sta obarvani rumeno. [5]

1.2.2 Lokalizacija, funkcija in regulacija aktivnosti

Za optimalno delovanje in aktivnost potrebujejo katepsini reducirajoče in rahlo kislo okolje, ki ga med drugim nudijo lizosomi, zato ne preseneča, da so katepsine našli primarno prav v teh organelih. Pri nevtralnem pH, na primer v citosolu in znotrajceličnem okolju, pride namreč do njihove inaktivacije (izjema je le katepsin S). [6, 8, 9]

Večina cisteinskih katepsinov je v organizmu široko izražena, zato lahko najdemo posamezen katepsin v številnih tkivih. Nekateri izmed njih (katepsini S, K, V in W) pa so tkivno specifični in so zato navzoči le v točno določenih tkivih oz. celicah, kjer opravljajo točno določeno vlogo pri različnih procesih v organizmu. Ravno tkivno specifično izražanje nekaterih predstavnikov nakazuje, da njihova funkcija presega zgolj udeležnost pri razgradnji proteinov in da je njihova vloga v organizmu veliko bolj usmerjena. [4, 10] To predpostavko potrjuje tudi odkritje, da katepsini niso omejeni le na lizosome, kot so sprva mislili. Najdemo jih na primer v jedrcu, kjer opravljajo specifične funkcije, izločajo pa se tudi v zunajcelični prostor (ECM). Učinki, ki jih posredujejo izven lizosomov, so tako pomembni pri številnih fizioloških procesih, vključno z znotrajcelično razgradnjo proteinov, apoptozo in celično migracijo, kostno remodelacijo ter prohormonsko aktivacijo. Njihova prisotnost zunaj celic pa je povezana zlasti z razgradnjo proteinov ECM v povezavi s tkivnim preoblikovanjem in posledično celično migracijo – torej z bolj ali manj nespecifičnimi funkcijami, ki med drugim pripomorejo tudi k napredovanju raka in drugih obolenj.

Razširjenost katepsinov oz. njihova fiziološka vloga je v veliki meri vezana tudi na imunske celice, kjer katepsini opravljajo nepogrešljivo vlogo v prirojenem in pridobljenem imunskem odgovoru, predvsem v povezavi z antigen predstavitvenimi celicami in pri aktivaciji celic T pomagalk. Zato ne preseneča, da so kmalu prišli do ugotovitev, da imajo katepsini pomembno vlogo v procesu fagocitoze in regulacije predstavitve antigenov. V povezavi z imunskim odzivom pa so pomembni še pri drugih procesih, kot na primer pri celični citotoksičnosti, celični migraciji in adheziji, aktivaciji kemokinov, pri naboru levkocitov in v splošnem pri odpornosti proti bakterijskim in virusnim okužbam. [4, 6, 11, 12]

V normalnih razmerah v organizmu uporabljajo celice vrsto različnih mehanizmov, ki preprečujejo potencialno škodljivo in nekontrolirano proteolitično aktivnost katepsinov.

Aktivnost Katepsinov je zato skrbno uravnavana z njihovim izražanjem, posttranslacijskimi modifikacijami, pH, aktivacijo njihovih cimoenov, njihovo inhibicijo in razgradnjo, različnimi mesti nahajanja encima in substrata v telesu ali pa s kombinacijo vseh teh naštetih dejavnikov. [5, 13]

Katepsini se sintetizirajo kot neaktivni preproencimi. V lumnu endoplazmatskega retikuluma pride do cepitve N-končnega signalnega peptida in do N-glikozilacije proencima cimogena, katerega propeptid sodeluje pri pravilnem zvitju in usmerjanju encima v endosome oz. lizosome. Pri tem izrablja specifično manoza-6-fosfat receptorsko pot. Preko nje encim, po nizu kaskadnih reakcij, vstopi v endosome. Prej omenjeni propeptid zagotavlja tudi to, da ostane cimoegen neaktiven, dokler ne poteče njegova aktivacija. Do te pride po navadi v blago kislem okolju znotraj lizosoma. Tu potekajo tudi nadaljnje cepitvene reakcije, ki vodijo do končne odstranitve N-končnega propeptida. Po proteolitični cepitvi propeptida (bodisi zaradi avtokatalize ali s pomočjo drugih peptidaz) nastanejo proteolitično aktivni Katepsini. [5, 14–16]

Pri tem je treba omeniti še to, da se samo endopeptidaze aktivirajo s pomočjo avtokatalize. Ta poteče predvsem zaradi znižanja pH, ki sproži aktivacijo encimov. Ti aktivirani encimi pa nato sodelujejo pri nadaljnji aktivaciji encimov. Nasprotno pa velja za eksopeptidaze na primer Katepsina C in X, ki se aktivirata pod vplivom drugih peptidaz (Katepsinov S oz. L). [17, 18]

1.3 KATEPSIN X

1.3.1 Osnovne značilnosti Katepsina X, njegova razširjenost in zgradba

Katepsin X je monomerna, lizosomska cisteinska peptidaza z molekulsko maso okrog 33 kDa in izoelektrično točko (pI) 5,1 – 5,3. Njegov gen leži na kromosomu 20q13, katerega izražanje je povečano pri številnih tipih raka, saj so v bližini tudi geni za nekatere onkogene. [19, 20] Katepsin X najdemo primarno v celicah monocitne linije, makrofagih, celicah mikroglije in dendritičnih celicah. Visok nivo izražanja so našli v placenti, pljučih, jetrih, ledvicah, trebušni slinavki, debelem črevesu, ovarijih, perifernih levkocitih, prostati, tankem črevesu in vranici. [1, 21] S študijo na miših so spoznali, da je praktično v vseh celicah znotraj mišjih možganov, posebno veliko pa ga je v celicah glia in starostno

degeneriranih nevronih. [22] Še do pred kratkim je veljalo prepričanje, da je katepsin X udeležen le pri končni razgradnji proteinov v lizosomih, danes pa vemo, da je njegova lokacija znotraj celice razširjena še na druge celične strukture (kot je na primer celično jedro, prisoten pa je tudi v citosolu in zunajcelični tekočini in celo vezan na plazemsko membrano). [2]

Pri diferenciaciji monocitne celične linije U937, ki so jo izvedli s pomočjo PMA, je prišlo tudi do spremembe v lokalizaciji katepsina X. Izkazalo se je, da je bila ta v promonocitni liniji omejena le na znotrajcelične vezikle, po diferenciaciji pa je bil katepsin X večinoma na celični membrani. [12]

Katepsin X ima ozko substratno specifičnost v nasprotju z drugimi katepsini. Sama struktura encima in njegova aktivnost se precej razlikujeta od splošnih lastnosti cisteinskih katepsinov. Tako ima precej kratko proregijo (najkrajšo med vsemi katepsini), ki je kovalentno vezana na aktivno mesto oz. na aminokislino Cys31. Druga značilnost katepsina X je ta, da vsebuje v svoji strukturi vstavek treh aminokislinskih preostankov (Ile24–Gln26), ki tvorijo t. i. »mini zanko« (His23–Tyr27). Ta je na glavni regiji (v bližini aktivnega mesta), ki je odgovorna za vezavo substrata. Ravno ta vstavek se je izkazal kot eden glavnih vzrokov za eksopeptidazno aktivnost katepsina X. [1, 17, 21, 23] Katepsin X ima izključno karboksimonopeptidazno aktivnost, za njegovo aktivacijo pa je potrebna druga lizosomska endopeptidaza, katepsin L. [1, 19, 21] Višje ravni katepsina X so povezane z nekaterimi obolenji, kot so na primer rak, vnetne bolezni, z vnetjem povezane nevrodegenerativne bolezni (Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, amiotrofična lateralna skleroza), infekcije s *Helicobacter pylori*, kronične bolečine in tuberkuloza. [2]

1.3.2 Fiziološka vloga katepsina X

Katepsin X ima pomembno vlogo pri prenosu celičnih signalov, ta pa naj bi bila povezana z njegovo vezavo na heparan sulfat proteoglikane (HSPG) in integrinske receptorje na površini celic. Tu sta pomembna integrin vezoča motiva, ki sta tako na nezreli – proobliki katepsina X (motiv RGD: Arg-Gly-Asp) kot tudi na njegovi zreli obliki (motiv ECD: Glu-Cys-Asp). Ta motiva se vežeta na receptorje na površini celic, te interakcije pa so pomemben element celične signalizacije in adhezije. Integrini so namreč receptorji na celični površini in so udeleženi v procesu medcelične adhezije in adhezije celic na ECM.

Po svoji strukturi so heterodimerne molekule, sestavljene iz α - in β -podenot, ki sestojijo iz transmembranske α -vijačnice, kratkega citoplazemskega repa in velike zunajcelične domene. [24, 25]

Vezava katepsina X na integrinski receptor β_2 Mac-1 na makrofagih in njegova aktivacija imata za posledico olajšano adhezijo in fagocitozo makrofagov ter zavirto proliferacijo celic T. Z vezavo katepsina X na integrinski receptor LFA-1 pride do cepitve citoplazemskega repa β_2 na receptorju, kar poveča afiniteto LFA-1 za določene strukturne mediatorje, to pa nazadnje izzove pospešeno celično migracijo. Učinki, ki jih ima katepsin X na integrinske receptorje, se kažejo tudi v prerazporeditvi citoskeletnih proteinov in proliferaciji celic T. Pri slednjih pride tudi do morfoloških sprememb, do njihove ameboidne migracije in povečane agregacije. Katepsin X je pomemben tudi pri dozorevanju nekaterih imunskih celic (npr. dendritičnih celic), dozorevanje pa sproži z aktivacijo prej omenjenega receptorja Mac-1 na dendritičnih celicah. Zaradi številnih funkcij, ki jih imajo integrinski receptorji β_2 , je torej pričakovati, da bo njihova interakcija s katepsinom X imela za posledico regulacijo številnih procesov celične signalizacije in aktivacije celic. Omeniti je treba tudi encim γ -enolaza, ki je bistvenega pomena predvsem pri normalnem delovanju živčnih celic. Ta encim zavira celično smrt in posledično povečuje preživetje živčnih celic. Pomemben pa je tudi pri blaženju oksidativnega stresa. Katepsin X cepi C-konec γ -enolaze, zato povečano izražanje katepsina X zmanjšuje njeno aktivnost in posledično njeno zaščitno funkcijo. [1, 11, 12, 24, 25]

1.4 VLOGA KATEPSINA X PRI PATOGENEZI RAKA

Rak je kompleksen patološki proces, ki ima svoj izvor v spremenjenem genomu. Na celični ravni se kaže kot nebrzdano razmnoževanje celic zaradi okvarjenega nadzora celične delitve in okvare apoptoze (programirane celične smrti), kar privede do neravnotežja med tema dvema procesoma. Nekateri tumorji imajo lastnost metastaziranja, pri kateri se tumorske celice s primarnega mesta nastanka lahko razsejejo tudi na druge predele v telesu. Ko doseže tumor določeno velikost, potrebuje za svoje preživetje hranila in kisik, kar doseže z razrastom žilnega spleta – angiogenezo. [26]

Iz preteklih raziskav je znano, da so nekatere peptidaze udeležene pri razvoju in napredovanju nekaterih vrst raka. V splošnem so peptidaze (endopeptidaze) z razgradnjo

proteinov ECM in bazalne membrane povezane z invazijo, angiogenezo, migracijo in metastaziranjem rakavih celic. Prej omenjeni strukturi sta v organizmu nekakšna pregrada, ki preprečuje rakavim celicam prehod v druge predele organizma. Znano je, da je veliko število peptidaz udeleženih v razgradnji ECM – med temi peptidazami je treba posebej omeniti tudi veliko večino cisteinskih katepsinov. [27]

Nekatere peptidaze delujejo tudi z aktivacijo drugih peptidaz in proteinov, ki so udeleženi v proteolizi ECM ter v drugih procesih v razvoju raka. Spet druge inaktivirajo endogene peptidazne zaviralce, posegajo v samo signalizacijo znotraj celic in posledično regulirajo njihovo apoptozo. [27]

V patofiziologiji raka ima pomembno vlogo tudi katepsin X, ki regulira adhezijo tumorskih in endotelijskih celic, preoblikovanje citoskeleta, celično migracijo in invazijo. [1, 27, 28]

V številnih študijah se je katepsin X izkazal kot pomemben spodbujevalec maligne progresije celic. Čeprav so pri študiji raka prostate zasledili približno enako količino mRNA katepsina X v zdravi prostati, znotrajepitelijski neoplaziji prostate in v začetnih stadijih invazivnega karcinoma, se je sam katepsin X različno močno izražal. To nakazuje, da razlik na nivoju mRNA praktično ni, so pa velike razlike na nivoju samega proteina. Na mišjem modelu metastatskega raka dojk so prišli do rezultatov, da se je znižano izražanje katepsina X kazalo v zakasnjem razvoju tumorja v njegovem zgodnjem obdobju. Katepsin X pa se je med drugim izkazal tudi kot pomemben dejavnik pri stabilizaciji tumorskih celic ter posledično pri razvoju in napredovanju raka. Kljub temu pa študije merjenja serumskih ravni izražanja katepsina X niso dale enoznačnega odgovora, ali ima katepsin X večji pomen v zgodnjih ali poznih obdobjih razvoja rakavih obolenj (študije na primeru kolorektalnega karcinoma). [29–31]

Katepsin X vpliva na razvoj in napredovanje raka na vrsto različnih načinov.

1. Integrini

Velik pomen imajo interakcije katepsina X z integrinskimi receptorji na celicah. Preko teh receptorjev posega v znotrajcelični prenos signalov, s tem pa vpliva na uravnavanje adhezivnih lastnosti tumorskih celic, povečano migracijo celic in posledično na njihovo invazivnost. Prokatepsin X se preko motiva RGD veže na integrinska receptorja $\alpha\beta3$ in $\alpha\beta5$ na tumorskih celicah. Ti receptorji so povezani z rastjo tumorja, angiogenezo in metastazo. Pri opisani vezavi pride do spremenjenih adhezivnih lastnosti tumorskih celic na proteine ECM. Predvidevajo, da naj bi zatem prišlo do migracije teh tumorskih celic

skozi ECM v krvni obtok in do nadaljnje adhezije na endotelij žil v nekaterih organih. [32–34]

V povezavi z integrinskimi receptorji je pomemben tudi aktiven katepsin X – ta cepi štiri aminokislinske preostanke na C-koncu $\beta 2$ verige integrinskih receptorjev. Opisana cepitev stabilizira aktivno konformacijo integrinskih zunajceličnih domen $\beta 2$ in poveča vezavo komponent ECM in preostalih ligandov na površino tumorskih celic. Rezultat pa je spet enak: medcelična adhezija in adhezija tumorskih celic na ECM. [35]

2. HSPG

Katepsin X se med drugim veže na HSPG na površini celic. HSPG uravnava encimsko aktivnost katepsina X, njegov transport iz celic in v celice, podobno kot integrini pa so pomembni tudi pri celični adheziji in signalizaciji. [32]

3. Profilin-1

Kot tarče za katepsin X so se izkazale še nekatere druge molekule, ki so prav tako udeležene v celični signalizaciji. Omeniti je treba profilin-1. Ta je dobro znan zaviralec rasti tumorskih celic, njegov nivo izražanja je zmanjšan pri različnih tipih raka. Izkazalo se je, da je njegovo povečano izražanje povezano z zmanjšano gibljivostjo celic, kar pripomore k zmanjšanemu razvoju tumorja. Pri povečanem izražanju katepsina X (npr. v celični liniji PC-3) pride do povečane cepitve C-konca na profilinu-1. Tako spremenjeni protein pa ima značilno znižano afiniteto do endogenega liganda klatrina. V končni fazi pomeni to zmanjšan zaviralni učinek profilina-1 na razvoj tumorja. [36]

4. Morfološke spremembe tumorskih celic

Naslednji mehanizem, s katerim katepsin X prispeva k napredovanju raka, je njegov vpliv na morfološke spremembe tumorskih celic. Katepsin X naj bi bil posegal v sprožitev procesa epitelijsko-mezenhimskega prehoda celic (EMT), ki se kaže v povečani migraciji, invazivnosti in v zmanjšani apoptozi tumorskih celic. Do tega pride zaradi obsežnih biokemijskih in morfoloških sprememb v samih celicah, kar se odraža med drugim v njihovi spremenjeni obliki. Takim celicam je omogočeno olajšano in hitrejše prehajanje, značilna pa je tudi pridobitev povečane odpornosti na celično smrt. [37, 38]

5. Celično staranje in apoptoza

Celično staranje je še en pomemben proces, na katerega ima velik vpliv tudi katepsin X. Ta proces služi kot močan zaviralec razvoja in invazije tumorskih celic, saj omogoča poškodovanim, okuženim ali tumorskim celicam prehod v apoptozo. Čeprav je znano, da

zmanjšana pojavnost katepsina X pospešuje celično staranje, je mehanizem, s katerim katepsin X vpliva na ta proces, še vedno neznan. V študiji na človeških celicah karcinoma prostate so prišli do spoznanja, da naj bi bil v ta mehanizem vpleten tudi inzulinski rastni dejavnik (IGF) oz. uravnavanje le-tega. IGF je namreč pomemben aktivator napredovanja raka. Preko njegovega receptorja potekajo pomembne poti, ki pripomorejo k razvoju raka predvsem zaradi vpliva na rast in regulacijo apoptoze. [30, 39–41] Katepsin X je pri regulaciji apoptoze udeležen še na druge načine. V celicah želodčnega karcinoma interagira na primer z ribosomalnim proteinom P0 (RPLP0), kar nazadnje povzroči nepravilno regulacijo apoptoze ter progresijo tumorjev. [2, 32]

1.5 ZAVIRALCI KATEPSINA X

1.5.1 Endogeni zaviralci katepsinov

Kot je bilo že omenjeno, poznamo več nivojev uravnavanja aktivnosti cisteinskih peptidaz. Med drugim njihovo aktivnost skrbno uravnavajo endogeni zaviralci, med katerimi so najbolj znani zlasti cistatini, tiropini in serpini. V osnovi so to kompetitivni, reverzibilni in tesnovezočji (ang. *tight binding*) zaviralci. Delimo jih na zaviralce, ki posredujejo svoje učinke v primerih, ki so za organizem »nujni« (cistatini, tropini), in na regulatorne zaviralce. Ti regulatorni zaviralci ne samo da blokirajo, ampak tudi modulirajo aktivnost peptidaz in so celo v njihovi bližini. [42–44]

Izraz cistatini se nanaša na proteine, ki specifično zavirajo aktivnost papaina in njemu sorodnih cisteinskih peptidaz. Cistatini so največja skupina endogenih zaviralcev cisteinskih peptidaz. Njihova slaba lastnost je, da so dokaj neselektivni in se vežejo na katepsin X veliko šibkeje kot na druge katepsine, eksopeptidaze (zlasti katepsin X) pa zavirajo šibkeje kot endopeptidaze. [17, 27, 45] Cistatini veljajo za glavne endogene zaviralce katepsinov. Najdemo jih v rastlinah, glivah, živalih pa tudi pri virusih.

Poznamo več družin cistatinov, najbolj zastopane so naslednje: **1. stefinska družina** (vključuje majhna znotrajcelična zaviralca – stefina A in B –, ki ju izraža večina celic), **2. cistatinska družina** (sem spadajo cistatini C, D, E/M, F, G, S, SA in SN ter cistatini moškega reprodukativnega sistema: cistatin 8 /CST8/, cistatin 9 /testatin/, cistatin 11, cistatin 12 /cistatin T/, CRES2, CRES3 ter CL M /cistatin 13/ iz kostnega mozga in SPP-24

oz. cistatin 14), **3. kininogenska družina** (L- in H-kininogen) in **4. fitocistatini**. [46–48]

Ta klasifikacija temelji na podobnostih s kokošjim cistatinom, ki je bil prvi zaviralni protein z znano aminokislinsko sestavo. Klasifikacija se je – zaradi odkritja vedno večjega števila zaviralcev – omejila še z drugimi kriteriji, kot so število disulfidnih vezi (2 ali 9) in število kopij cistatinu podobnih domen (1, 2 ali 3). [49–51] Predstavniki prvih treh družin – stefini, cistatini in kininogeni – so zaviralni proteini, medtem ko sestoji 4. družina iz nezaviralnih homologov cistatinov, kot so fetuini in s histidinom bogati glikoproteini. Predstavniki te družine vsebujejo tako dve cistatinom podobni domeni, ki sta med evolucijo izgubili svojo aktivnost zaradi mutacij v strukturno pomembnih regijah. V splošnem veljajo cistatini za zaviralce, ki se tesno vežejo na družino cisteinskih peptidaz C1 (papainska družina), cistatini tipa 2 pa posredujejo tudi inhibicijo družine C13 cisteinskih peptidaz (legumainska družina). [51–56]

Stefini so okoli 100 aminokislin dolgi enoveržni, neglikozilirani proteini, ki v svoji strukturi ne vsebujejo disulfidne vezi in signalnega peptida. So primarno znotrajcelični proteini, navzoči so v citosolu in jedru in se le zelo redko izločajo v zunajcelični prostor, kar pa nasprotno velja za cistatine 2. družine. Slednji so 120 aminokislin dolgi enoveržni, zunajcelični proteini z običajno dvema disulfidnima vezema. V nasprotju s stefini imajo v svoji strukturi še signalni peptid, ki jim omogoča transport preko celične membrane v posamezne, točno določene predele organizma – predvsem v telesne tekočine.

Kininogeni so veliki večfunkcionalni, glikozilirani, plazemski proteini s tremi domenami, ki so podobne cistatinom 2. družine. Dve izmed domen imata zaviralno vlogo in lahko zavirata dve molekuli katepsinov, vendar z drugačno afiniteto. Kininogeni tvorijo 8 disulfidnih vezi in so prekurzorji vazoaktivnega peptida – kinina. So glavni cisteinski proteinazni zaviralci v plazmi in sinovialni tekočini. Ločimo dva tipa kininogenov: kininogene visoke in kininogene nizke molekulske mase. Samo prve so našli tudi v nevronih, živčnih vlaknih, endotelijskih celicah in celicah glie v hrbtenjači in možganih miši. [57]

Fetuini in laksetini so sestavljeni iz dveh tandemskih, cistatinom podobnih domen, kljub temu pa ne zavirajo cisteinskih peptidaz. [52]

Glavna fiziološka vloga cistatinov je uravnavanje prekomerne aktivnosti cisteinskih peptidaz in s tem zagotavljanje ravnotežja v njihovi aktivnosti v normalnih fizioloških

razmerah.

Cistatini so v splošnem zaviralci, ki posredujejo svoje učinke predvsem v »nujnih« primerih, ko je aktivnost peptidaz iztirjena in je zato poseganje v regulacijo njihove aktivnosti bistvenega pomena za normalno delovanje organizma. Kljub temu imajo tudi regulatorno vlogo. [58]

Stefin A tako uravnava na primer normalno proliferacijo in diferenciacijo keratinocitov, ima pomembno vlogo pri apoptozi in ščiti epiteljska in limfatična tkiva pred delovanjem cisteinskih peptidaz. Stefin B je pomemben v procesu regulacije resorpcije kostnine, pri čemer zmanjšuje znotrajcelično aktivnost katepsina K. Cistatin C je neglikozilirani, 13 kDa velik protein bazičnega značaja. Velja za najpomembnejši endogeni zaviralec papainu podobnih cisteinskih peptidaz. Kot že omenjeno, deluje kot zaviralec pri procesih vnetja in tkivnega preoblikovanja, udeležen pa je tudi v procesih naravne imunosti ter pri številnih bolezenskih stanjih. Prav zaradi majhne molekulske mase in konstantne produkcije v telesu se pogosto uporablja kot biooznačevalec hitrosti glomerulne filtracije, saj se prosto filtrira skozi membrano glomerul in presnavlja v proksimalnem tubulu. Pomemben je kot zaviralec cisteinskih peptidaz, ki razgrajujejo kolagen in elastin – pomembna gradbena elementa žilnih sten. [59–62] Cistatin F je edini izmed cistatinov, ki se sintetizira kot neaktiven, z disulfidi povezan dimerni prekursor, in šele kot monomerna zvrst zavira nekatere katepsine (predvsem katepsine L, V, K in F). Najdemo ga večinoma v imunskih celicah: celicah T, celicah naravnih ubijalkah (NK) in dendritičnih celicah (DC), in sicer v endosomalnih oz. lizosomalnih veziklih, kjer regulira aktivnost katepsinov. Cistatin F ima sorazmerno majhno homologijo z drugimi predstavniki iz družine cistatinov 2. družine. [47, 63, 64]

Pričakovano je torej, da bo povečano izražanje cistatinov zmanjšalo proteolitično aktivnost in tako zaviralo napredovanje različnih vrst raka. Vendar pa so na nekaterih živalskih modelih prišli ravno do nasprotnih ugotovitev, kar pa se da razložiti predvsem z zmanjšano selektivnostjo cistatinov in prisotnostjo nezaviralnih domen. [47]

Poleg cistatinov poznamo še t. i. zaviralce tiroglobulinskega tipa oz. tiropine, ki so sicer novejši, slabše raziskani in ovrednoteni, vendar lahko za nekatere izmed njih z gotovostjo trdimo, da imajo izražen zaviralni učinek na nekatere cisteinske peptidaze. Tiropini so reverzibilni zaviralci in so, v nasprotju s prej omenjenimi cistatini, celo selektivnejši. [65]

Testikan-1 je zunajcelični matriksni proteoglikan. V večjih koncentracijah je izražen v človeških možganih (talamusni in hipotalamusni nevroni), najdemo pa ga tudi v reaktivnih astrocitih, kjer ima vpliv na regeneracijo aksonov. Pomembno vlogo naj bi bil imel v patofiziologiji Alzheimerjeve bolezni, saj naj bi reguliral nekatere peptidaze (predvsem katepsin L in matriksno metaloproteinazo 2, ki sta udeležena v sintezi in razgrajevanju amiloida- β). [66]

Nidogeni so sulfatirani, monomerni glikoproteini, ki jih najdemo pretežno v bazalni membrani in imajo tako pomembno vlogo v organogenezi oz. organizaciji bazalne membrane v tkivih, kot so koža, mišice, pljuča in živčni sistem. Pri človeku so našli dva nidogena: nidogen-1, ki je bolj zastopan, in nidogen-2. Oba imata tako strukturno kakor tudi funkcijsko vlogo. Povezujeta na primer dele laminina in keratina tipa IV, omogočata pa tudi celične interakcije s proteini ECM. [67–69]

Protein p41 se je izkazal kot pomemben zaviralec nekaterih človeških cisteinskih katepsinov (V, K in F) in tako pomembno prispeva k uravnavanju njihove aktivnosti. [70, 71] Povezan je s poglobitnim histokompatibilnim kompleksom II, ki ga najdemo na antigen predstavitevni celicah. [72]

Ekvistatin je protein iz morske vetrnice *Actinia equina*, ki se z veliko afiniteto veže na katepsin L in papain. Sestavljen je iz treh tiroglobulinskih domen tipa-1. [73]

1.5.2 Eksogeni zaviralci katepsina X

Katepsin X velja za pomembno tarčo pri razvoju eksogenih zaviralcev predvsem v protitumorni terapiji. Razvijajo se predvsem nizkomolekularni, selektivni in reverzibilni zaviralci katepsina X, ki bi bili sposobni zmanjševanja njegove karboksipeptidazne aktivnosti v točno določenih procesih progresije tumorjev. [27]

2 NAMEN DELA

Za katepsin X je bilo v preteklih raziskavah spoznano, da ima pomembno vlogo v degenerativnih procesih v času normalnega staranja in v nekaterih patoloških stanjih, kot so rak in nevrodegenerativne bolezni.

Namen magistrske naloge je testiranje endogenih zaviralcev cisteinskih peptidaz z namenom potrditve oz. ovrednotenja sposobnosti inhibicije katepsina X. Spremljali bomo aktivnost encima katepsina X ob dodatku posameznih zaviralcev in to aktivnost pokazali s pomočjo merjenja encimske kinetike pri razgradnji fluorogenega substrata Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH. Testirali bomo cistatine (cistatina C in F, stefina A in B in kokošji cistatin), ki veljajo za glavne endogene zaviralce katepsinov, ter tiropine (ekvistatin, testikan-1, p41 ter nidogena 1 in 2), ki so sicer slabše raziskani, a so od prej omenjenih selektivnejši.

Zaradi manjših razlik med rekombinantnim katepsinom X, izraženim v kvasovki *P. pastoris*, in nativnim katepsinom X bo smiselno preveriti inhibicijo še na nativnem katepsinu X. V ta namen bomo pripravili lizate celične linije U937 in na enak način kot pri rekombinantnem encimu testirali aktivnost katepsina X.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 REAGENTI IN KEMIKALIJE

Pri delu smo uporabljali reagente in kemikalije, ki so povzete v preglednici I.

Preglednica I: Reagenti in kemikalije.

Reagenti in kemikalije	Proizvajalec
Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH	sin. dr. Nace Zidar (FFA) po [21]
akrilamid/bis-akrilamid	Sigma-Aldrich
amonijev persulfat	Fluka
β -merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
bromfenolmodro	Fluka
BSA	Sigma-Aldrich
DC TM Protein Assay Reagent A, B in S	BIO RAD
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT	Sigma-Aldrich
E64	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
etanol	Riedel-de Haën
FBS	Gibco
glicin	Sigma-Aldrich
HCl	MERCK

izopropanol	FFA
L-cistein	Sigma-Aldrich
L-glutamin	Gibco
metanol	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Sigma-Aldrich
NaOH	J. T. Baker
natrijev acetat	Sigma-Aldrich
nigrozin	Sigma-Aldrich
očetna kislina	MERCK
PBS	Sigma-Aldrich
PEG 8000	Sigma-Aldrich
penicilin-streptomycin	Sigma-Aldrich
PMA	Sigma-Aldrich
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne
SDS	Sigma-Aldrich
Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate + Luminol/Enhancer Solution	Thermo scientific

Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate + Luminol/Enhancer Solution	Thermo scientific
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	MERCK
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
Z-Arg-Arg-AMC	Biomol
Z-Phe-Arg-AMC	Bachem

3.1.2 LABORATORIJSKI INSTRUMENTI IN OPREMA

Uporabljali smo laboratorijsko opremo in instrumente, ki so povzeti v preglednici II.

Preglednica II: Laboratorijski instrumenti in oprema.

Laboratorijski instrumenti in oprema	Opis; proizvajalec
analitska tehtnica	EXACTA 610EB; Tehnica
avtoklav	Kambič laboratorijska oprema
avtomatska večkanalna pipeta	50– 1200 mL; BIOHIT
avtomatska enokanalna pipeta	5 – 120 µL; BIOHIT
celični inkubator	BINDER SMBC 183AV; Iskra PIO d.o.o.
centrifuga	5415R; Eppendorf
centrifuga	Heraeus Megafuge 16R; Thermo scientific
centrifugirke	15 in 50 mL; TPP®

čitalac mikrotitrskih plošč	TECAN Safire ²
električni napajalnik	BioRad
G-box	Syngene
hemocitometer	Thoma
komora z laminarnim pretokom zraka	LFVP12; Iskra PIO d.o.o.
magnetno mešalo	ROTAMIX 606 MM; Tehnica
mikrocentrifugirke	0,5; 1,5; 2 in 5 mL; Sarstedt
mikrotitrške plošče	črne, 96F nunclon delta black microwave; Thermo Fischer Scientific
mikrotitrške plošče`	prozorne, tissue culture testpalte 96F; TPP [®]
namizna centrifuga	Capsulefuge PMC060; TOMY
nitrocelulozna membrana	Amersham
obrnjeni svetlobni mikroskop	TMS-F; Nikon
pH-meter	HI9321microprocessor pH meter; HANNA instruments
plastična gojilna posoda	T25; TPP [®]
plastična gojilna posoda`	T75; TPP [®]
polavtomatske pipete	0,1-2,5; 0,5-10; 10-20; 10-100; 10-200; 100- 1000 µL; BIOHIT miniplus; Eppendorf
sistem za elektroforezo	BioRad
stresalnik	Vibromix 314 EVT; Tehnica
stripete	5, 10 in 25 mL; TPP [®]

ultrazvočna kadička	Sonis3; Iskra PIO d.o.o.
vibracijsko mešalo	VIBROMIX 10; Tehnica
vodna kopel	Grant JB Academy
vsebnik	TPP®

3.1.3 STANDARDI IN PROTITELESA

- A) človeški rekombinantni katepsin X, izražen v kvasovki *Pichia pastoris* [74]
- B) človeški rekombinantni katepsin B, izražen v bakteriji *E. coli* (Mirković, po [75])
- C) človeški rekombinantni katepsin L, izražen v *E. coli* [76]
- Č) ovčja poliklonska protitelesa proti človeškemu katepsinu L [77]
- D) prokatepsin L, izražen v *E. coli* (vir: Inštitut Jožef Štefan)
- E) zajčja proti-ovčja protitelesa, konjugirana s HRP (Jackson Imuno Research Laboratories inc.)
- F) zajčje protitelo proti β -aktinu (SIGMA®)
- G) kozja proti-zajčja protitelesa, konjugirana s HRP (Invitrogen)

3.1.4 PUFRI IN PUFRSKI SISTEMI

AKTIVACIJSKI PUFER ZA KATEPSINA X IN L

(5 mM L-cistein; 1,5 mM EDTA)

L-cistein ... 30,29 mg

EDTA ... 27,9 mg

Dopolnimo z osnovnim pufrom do oznake 50 mL (rok uporabe: 14 dni, shranjevanje: 4 °C)

OSNOVNI PUFER ZA KATEPSINA X IN L

(0,1 M acetatni pufer; 0,1% PEG; pH=5,5)

natrijev acetat ... 3,48 g

PEG 8000 ... 0,5 g

Dopolnimo z dH₂O do oznake 500 mL. Uravnamo na dani pH.

OSNOVNI PUFER ZA KATEPSIN B

(100 mM fosfatni pufer; pH=6,0)

natrijev fosfat monohidrat ... 6,07 g

natrijev fosfat dihidrat ... 1,07 g

PEG 8000 ... 0,5 g

Dopolnimo z dH₂O do oznake 500 mL. Uravnamo na dani pH.

PUFER ZA KOKOŠJI CISTATIN

(10 mM TRIS pufer; pH=8,0)

Tris ... 242,28 mg

Dopolnimo z dH₂O do oznake 200 mL. Uravnamo na dani pH.

LIZIRNI PUFER

(50 mM natrijev acetat pH 5,5, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,25% Triton X-100)

1,025 mg natrijev acetat

93,06 mg EDTA

1,461 g NaCl

0,625 mL Triton-X100

Dopolnimo z dH₂O do 250 mL in uravnamo pH na 5,5.

1x PBS

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

Dopolnimo z dH₂O do 1000 mL in uravnamo pH na 7,4.

NANAŠALNI PUFER

0,375 M Tris, pH6,8

12% SDS

60% glicerol

0,6 M DTT

0,06% bromfenol modro (H₂O)

Shranjujemo pri -20°C.

PUFER ZA PRENOS

5,86 g Tris

11,62 g glicin

7,5 mL 10% SDS

400 mL metanol

Dopolnimo z dH₂O do 2000 mL.

PUFER ZA ODSTRANJEVANJE PROTITELES

31,25 ml Tris pH6,8

3,5 mL β-merkaptetoanol

100 mL 10% SDS (oz.10 g)

365 mL dH₂O

3.1.5 CELIČNA LINIJA U937

U937 (ATCC: CRL-1593.2), človeški monociti (izolirani iz bolnika z limfomom).

3.1.6 GOJIŠČA

Osnovno gojišče za celično linijo U937

Advanced RPMI (Gibco)

Kompletno gojišče za celično linijo U937

1% penicilin-streptomycin (PIS)

1% L-glutamin

10% FBS

88% Advanced RPMI

3.1.7 GELI

Spodnji (ločevalni) gel

4,2 mL 40% akrilamid/bis-akrilamid

3,5 mL 1,5 M Tris-HCl pH=8,8

5,94 mL dH₂O

175 µL 10% SDS

175 µL 10% amonijev persulfat

6 µL TEMED

12% gel

Zgornji (koncentracijski) gel

752 µL 40% akrilamid/bis-akrilamid

780 µL 1,5 M Tris-HCl pH=6,8

4 mL dH₂O

60 µL 10% SDS

60 µL 10% amonijev persulfat

TEMED 6 µL

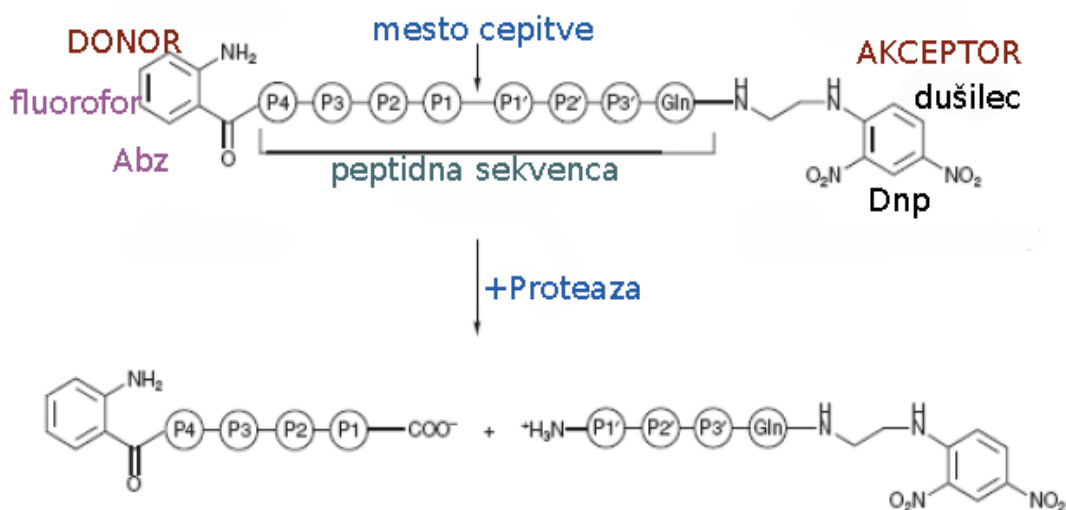
5% gel

3.2 METODE

3.2.1 ENCIMSKA KINETIKA

3.2.1.1 Splošen postopek določanja encimske aktivnosti

Za določanje encimske aktivnosti katepsina X smo uporabili resonančni prenos energije s fluorescenco (FRET). Pri tej metodi je substrat za encim označen s fluoroforom, ki fluorescira, in dušilec, ki to fluorescenco gasi, ko sta obe komponenti v neposredni bližini. Ko cepi encim peptidno vez v substratu, pride do fizične ločitve med fluoroforom in dušilec, zato slednji ne more več gasiti fluorescenco (princip prikazuje slika 2). [78] Fluorescirajoči produkt, ki pri tem nastane (v našem primeru Abz), oddaja fluorescenco, porast le-te pa spremljamo s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč.



Slika 2: Princip FRET. Shematski prikaz določanja aktivnosti encimov z uporabo Abz-fluorogenih substratov. [78]

Kot čitalec smo uporabili Tecan Safire²™ (meritev pri valovni dolžini 420 ± 20 nm in ekscitaciji 320 ± 20 nm). Uporabljali smo Abz-Phe-Glu-Lys-(Dnp)-OH, ki je specifičen fluorogeni substrat za katepsin X.

Preglednica III: Splošen postopek pri testiranju encimske kinetike.

SLEPA KONTROLA	5 μ L substrata	5 μ L osnovnega pufra	90 μ L aktivacijskega pufra
NEGATIVNA KONTROLA	5 μ L substrata	5 μ L osnovnega pufra	90 μ L encima
POZITIVNA KONTROLA	5 μ L substrata	5 μ L E64	90 μ L encima
TEST	5 μ L substrata	5 μ L zaviralca v predhodno dogovorjenih koncentracijah	90 μ L encima

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili dobro uveljavljen ireverzibilni zaviralec cisteinskih katepsinov E64. Končna koncentracija katepsina X je bila 20 nM, substrata pa 3,25 μ M.

Encim, ki smo ga redčili v aktivacijskem pufu, smo 5 min aktivirali pri 37 °C.

Po zgledu preglednice III smo v vdolbincih mikrotitrne ploščice odpipetirali posamezne komponente in začeli čimprej meriti, saj začne reakcija med encimom in substratom potekati tako rekoč »v trenutku«. Meritev je potekala pri 37 °C. Pri vsaki meritvi smo izvedli približno sto ciklov. Meritve so bile izvedene večinoma v dveh paralelkah.

Kontrolo posameznih zaviralcev smo izvedli na katepsinih, ki jih ti zaviralci dokazano zavirajo (katepsin B oz. L), saj smo hoteli ovreči sistemsko napako, ki bi lahko vplivala na rezultate meritev aktivnosti katepsina X (preglednica IV).

Preglednica IV: Kontrola posameznih zaviralcev.

ZAVIRALCI	ENCIM
cistatin C, kokošji cistatin	katepsin B
stefina A in B, cistatin F, ekvistatin, p41, testikan-1, nidogeni	katepsin L

Pri katepsinih B in L je pri cepitvi fluorogenega substrata nastal fluorescirajoči produkt AMC. Meritev smo izvedli pri valovni dolžini substratov z AMC 460 ± 10 nm in ekscitaciji 380 ± 20 nm. Pri katepsinu L smo uporabljali substrat Z-Phe-Arg-AMC, pri katepsinu B pa endopeptidazni substrat za katepsin B – Z-Arg-Arg-AMC. Postopek določanja aktivnosti je bil pri slednjih dveh encimih podoben zgornjemu, le da sta bili končni koncentraciji encimov 0,5 nM (katepsin L) oz. 5 nM (katepsin B), koncentraciji substratov pa 0,5 μ M (substrat za katepsin L) in 5 μ M (substrat za katepsin B).

Encime smo predhodno vedno aktivirali v ustreznih aktivacijskih pufrih. Zaviralce smo redčili (in v nekaterih primerih tudi inkubirali) v osnovnih pufrih za posamezen encim.

V nadaljevanju so zapisane le razlike in dopolnitve v izvedbi testiranj, ki odstopajo od splošnega postopka določanja encimske aktivnosti, opisanega v poglavju 3.2.1.1.

3.2.1.1.1 Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku cistatina C

V prvem poskusu smo testirali cistatin C v naslednjih koncentracijah: 50, 100, 500 nM, 1 μ M ter 11,25 μ M.

Vse nadaljnje poskuse smo izvajali s koncentracijo cistatina C 200 nM.

Zgoraj opisani eksperiment smo ponovili še pri temperaturi meritve 25 °C in običajnih razmerah inkubacije encima (5 min na 37 °C).

Zatem pa smo eksperiment ponovili pri temperaturi meritve 25 °C in predhodni, skupni 30-minutni predinkubaciji encima in zaviralca (kot je bilo predhodno opisano [19]).

Ker smo hoteli preveriti še morebitne nepravilnosti v terciarni strukturi cistatina C, smo preizkusili še aktivnost različnih serij istega zaviralca. Tako smo uporabili štiri serije cistatina C, ki so bile na voljo. Katepsin X smo aktivirali 5 min na 37 °C. Meritve smo izvedli pri 25 °C.

Katepsin B smo v kontrolni meritvi aktivirali 5 min na sobni temperaturi. Meritve smo izvedli pri 25 °C.

3.2.1.1.2 Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku stefinov A in B

Najprej smo želeli najti povezavo med načinom in časom inkubacije ter vplivom na inhibicijo katepsina X. Zatem pa smo želeli ovrednotiti še vpliv temperature meritve na rezultate inhibicije. Poskus smo pripravili tako, da smo izvedli ločeno in skupno inkubacijo zaviralca in encima ter nato spremljali aktivnost katepsina X.

1. V prvem poskusu smo pri ločeni inkubaciji inkubirali posamezna stefina v osnovnem pufri z DTT (100 mM) 15 min na sobni temperaturi, katepsin X pa 5 min na 37 °C. Pri skupni predinkubaciji pa smo raztopino posameznega zaviralca in encima v aktivacijskem pufri inkubirali 15 min na sobni temperaturi. Meritev smo izvedli pri 37 °C.

2. V drugem poskusu smo le podaljšali čas skupne predinkubacije na 30 min. Meritev smo tudi v tem primeru izvedli pri 37 °C.

3. V tretjem poskusu smo ponovili testiranje iz točke 2, a s to razliko, da je temperatura meritve zdaj znašala 25 °C.

Koncentracija posameznega stefina je bila 1 µM. Pozitivno kontrolo inhibicije smo izvedli na katepsinu L.

3.2.1.1.3 Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku cistatina F

Na katepsinu X smo testirali divji tip (ang. »*wild type*«) ter mutirano obliko cistatina F v koncentracijah 0,5 µM. Katepsin X smo inkubirali 5 min pri 37 °C, oba tipa cistatina F pa 15 min pri 37 °C v osnovnem pufri, ki mu je bil dodan DTT (100 mM). Izvedli smo še pozitivno kontrolo na katepsinu L.

3.2.1.1.4 Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku kokošjega cistatina

Katepsin X smo inkubirali 5 min pri 37 °C, kokošji cistatin pa smo dodali neposredno v vdolbinice črne mikrotitrne ploščice – torej brez inkubacije. Koncentracija kokošjega cistatina je bila 200 nM. Pozitivno kontrolo smo izvedli na katepsinu B.

3.2.1.1.5 Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku drugih zaviralcev

Na rekombinantnem katepsinu X smo preizkušali še druge zaviralce (dar Univerze v Ljubljani – Fakultete za kemijo, Katedre za biokemijo): **ekvistatin** (Eqs), **p41**, **testikan-1** (T Θ 100), **nidogen-1 domena-1** (N1D1), **nidogen-2 domena-1** (N2D1) in **nidogen-2 domena-2** (N2D2). Koncentracije zaviralcev v posamezni izhodni mikrocentrifugirki so bile neznane, zato smo iz vsake odpipetirali 5 μ L posameznega zaviralca (maksimalno možno koncentracijo). Katepsin X smo pred meritvijo inkubirali 5 min na 37 °C.

3.2.1.1.6 Določanje aktivnosti katepsina X v celičnem lizatu

Pripravili smo lizate nediferenciranih in diferenciranih celic U937 (opisano v poglavjih od 3.2.3 do 3.2.5) ter na nativnem katepsinu X testirali naslednje zaviralce: cistatin C (200 nM), stefin A in B (1 μ M) ter p41, Eqs, T Θ 100, N1D1 in N2D1 v maksimalni možni koncentraciji. Celotna koncentracija proteinov v posameznih lizatih je bila 0,2 mg/mL. Lizat smo redčili z ustreznim aktivacijskim pufrom, da smo zagotovili aktivnost katepsina X v lizatu. Pripravljeni lizat smo inkubirali oz. aktivirali 5 min na 37 °C.

Na lizatih nediferenciranih celic U937 smo izvedli dva poskusa. V prvem smo testiranje izvedli tako, kot je opisano v poglavju 3.2.1.1.6. Zatem smo uporabili večjo koncentracijo proteinov v lizatu (0,4 mg/mL) in dve različni koncentraciji substrata (0,5 μ M in 1 μ M). Pripravljeni lizat smo inkubirali 5 min na 37 °C. V meritev smo vključili tudi katepsin X, da bi ugotovili, ali ta razgrajuje Z-Phe-Arg-AMC oz. v kakšni meri.

Po celični diferenciaciji smo na lizatih diferenciranih celic testirali naslednje zaviralce: stefin B (1 μ M) ter N1D1, N2D1 in T Θ 100 v maksimalni koncentraciji. Celotna koncentracija proteinov v vseh treh lizatih je bila 0,5 mg/mL. Pripravljeni lizat smo inkubirali 5 min na 37 °C.

3.2.2 POSTOPKI ROKOVANJA S CELIČNO LINIJO U937

3.2.2.1 Odmrzovanje celic

Celice smo iz tekočega dušika, v katerem so bile hranjene (-196 °C), postavili za 2 min v vodno kopel (37 °C), da so se odtajale. Nato smo jih prenesli v centrifugirko, v katero smo predhodno dali 4 mL svežega in ogretega gojišča (37 °C). Sledilo je petminutno centrifugiranje pri 1200 rpm. Supernatant smo po koncu centrifugiranja odlili stran, celice pa resuspendirali v 1 mL svežega in ogretega gojišča. Vsebinsko iz centrifugirke smo zatem prenesli v plastično gojilno posodo T25, v katero smo predhodno odpipetirali 4 mL svežega gojišča

3.2.2.2 Gojenje celic

Celično linijo U937 smo gojili v plastičnih gojilnih posodah (T25 ali T75) v celičnem inkubatorju pri temperaturi 37 °C, 5 % CO₂ ter v ozračju, zasičenim z vlago.

Ker delo s celicami zahteva sterilne razmere, smo morali le-te tudi stalno zagotavljati.

Celicam smo na 2–3 dni zamenjali gojišče.

3.2.2.3 Štetje celic in subkultivacija

Vsebinsko iz gojilne posode smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 2000 rpm. Supernatant smo zavrgli, celicam pa dodali 1 mL svežega gojišča in jih resuspendirali.

Novonastali celični suspenziji smo odvzeli volumen 20 µL, ga prenesli v mikrocentrifugirko in dodali 80 µL svežega gojišča. V isto mikrocentrifugirko smo dodali še 100 µL 0,2% nigrozina (200 mg/100 mL H₂O), ki ima to lastnost, da prehaja le skozi membrane mrtvih celic in jih tako obarva črno. Pomembno je bilo redčenje suspenzije celic in nigrozina v razmerju 1 : 1.

Nastali celični suspenziji z nigrozinom smo odvzeli 10 µL dobro premešane celične zmesi in jo odpipetirali na hemocitometer. Žive celice smo prešteli dvakrat s pomočjo obrnjenega svetlobnega mikroskopa. Število celic smo izračunali po enačbi. (Enačba 1)

$N_{CELOTNO}/mL = N_{PREŠTETE} \times F \times 10,000 \text{ celic}/mL$ (**Enačba 1**)

$N_{CELOTNO}$celotno število celic

$N_{PREŠTETE}$število prešteti celic

Ffaktor redčenja

Celično suspenzijo, ki smo ji prej odvzeli 20 μ L, smo po štetju ustrezno redčili v svežem gojišču, da je bila koncentracija celic v gojilni posodi približno 10^5 celic/mL gojišča. Gojilno posodo smo nato postavili v celični inkubator.

3.2.3 DIFERENCIACIJA CELIC

Najprej smo prešteli celice (opisano v poglavju 3.2.2.3). Za diferenciacijo monocitne celične linije U937 v makrofage smo uporabili PMA v končni koncentraciji 50 nM. Pod vplivom PMA pride do pritrditve celic na dno, celice pa začnejo izražati površinske označevalce, značilne za makrofage. Začetno koncentracijo PMA (1 mg/mL oz. 1,62 mM) smo najprej 1000-krat redčili v gojišču do koncentracije 1,6 μ M.

Da smo dosegli končno koncentracijo PMA 50 nM in zadostno koncentracijo celic, smo v plastično gojilno posodo T75 zmešali naslednje tri komponente:

1. predhodno pripravljeno suspenzijo celic v 1 mL svežega gojišča;
2. ustrezen volumen svežega gojišča;
3. ustrezen volumen 1,6 μ M PMA.

Gojilno posodo smo nato prenesli v inkubator za najmanj 24 ur.

Za makrofage – celice, ki smo jih dobili z diferenciacijo – je značilno, da so adherentni in da se ne razmnožujejo več. Ravno zato je bilo potrebno, da smo predhodno namnožili čim večje število celic, da smo kasneje dobili zadostno količino proteinov.

3.2.4 PRIPRAVA LIZATOV NEDIFERENCIRANIH CELIC

Celice U937 smo iz plastične gojilne posode prenesli v centrifugirko in jih 5 min centrifugirali pri 2000 rpm. Supernatant smo zavrgli, celicam pa dodali PBS in jih resuspendirali. Sledilo je ponovno centrifugiranje pod enakimi pogoji. Celice v peletu smo

nato s pipeto prenesli v mikrocentrifugirko, dodali 1 mL PBS in spet centrifugirali v enakih razmerah.

Pelet, ki je nastal po centrifugiranju, smo resuspendirali v čim manjšem volumnu lizirnega pufra. Ta je celice liziral in obenem omogočil aktivnost katepsina X v nadaljnjih testih. Ko celice enkrat lizirajo, je potrebno nadaljnje postopke opravljati na ledu, drugače bi druge peptidaze razgradile katepsin X.

Mikrocentrifugirko smo nato postavili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minimalno 1,5 ure. Sledila je hitra odmrznitev na sobni temperaturi in razbijanje morebitnih agregatov v ultrazvočni kadički (zaporedno $2 \times 8\text{ s}$, $1 \times 10\text{ s}$). Nastalo suspenzijo smo centrifugirali pri maksimalnih obratih ($13,2 \times 10^3\text{ rpm}$) 15 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in supernatant prenesli v čisto mikrocentrifugirko, ki smo jo hranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.5 PRIPRAVA LIZATOV DIFERENCIRANIH CELIC

Celice so se po diferenciaciji pritrdile na površino plastične gojilne posode. Staro gojišče smo odvzeli s pipeto in ga zavrgli. Pritrjene celice smo nežno sprali s 5 mL PBS, da smo odstranili še preostali del gojišča. Da bi celice ločili od podlage, smo v gojilno posodo dodali 5 mL PBS 0,02 % EDTA. EDTA veže kovinske ione (v tem primeru Ca^{2+} ione), ki so pomemben element adhezije – z odtegnitvijo teh ionov pa adhezija ni več možna. Ko so se celice ločile od podlage, smo jih prenesli v centrifugirko in jih centrifugirali 5 min na 2000 rpm. Supernatant smo zavrgli, celice pa prenesli v mikrocentrifugirko, jim dodali 1 mL PBS in ponovno centrifugirali. Nastali pelet smo resuspendirali v čim manjšem volumnu lizirnega pufra in nadaljevali s postopkom, opisanim v poglavju 3.2.4.

3.2.6 DOLOČEVANJE CELOTNE KONCENTRACIJE PROTEINOV

Uporabili smo Bio-Radovo metodo DC proteini, ki temelji na Lowryjevi metodi določanja celotne koncentracije proteinov (shema nanosa komponent prikazuje preglednica V).

Z redčenjem osnovne raztopine BSA (koncentracija 10 mg/mL v vodi) v lizirnem pufra smo pripravili 5 standardnih raztopin BSA. S pomočjo teh standardov in njihovih rezultatov meritev smo pripravili umeritveno krivuljo ter določili enačbo premice, na podlagi katere smo izračunali celotno koncentracijo proteinov v lizatih (slika 18). Kot

negativno kontrolo smo uporabili lizirni pufer. Vzorce smo ustrezno redčili v lizirnem pufri.

Preglednica V: Shema nanosa vseh potrebnih komponent za določanje celotne koncentracije proteinov.

$C_{\text{STANDARDA}}$ (mg/mL)	V_{STANDARD} (μL)	$V_{\text{LIZIRNI PUFER}}$ (μL)	$V_{\text{REAGENT A'}}$ (μL)	$V_{\text{REAGENT B}}$ (μL)
0,2	5	/	25	200
0,5	5	/	25	200
0,8	5	/	25	200
1,0	5	/	25	200
1,5	5	/	25	200
Vzorec	5	/	25	200
Slepa	/	5	25	200

Reagent A' pripravimo z mešanjem 1 mL reagenta A in 20 μL reagenta S. Mikrotitrsko ploščo z vsemi dodanimi komponentami smo inkubirali 15 min na sobni temperaturi ter izmerili absorbanco pri 750 nm.

3.2.7 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Poliakrilamidno elektroforezo uporabljamo za karakterizacijo in ločevanje proteinov na osnovi velikosti oz. mase. Po polimerizaciji akrilamida in bis-akrilamida, ki jo sprožita amonijev persulfat in TEMED, nastane različno zamrežen gelski matriks, na katerem poteka ločevanje proteinov.

SDS (natrijev lavrilsulfat) je anionska, površinsko aktivna snov, ki se z nespecifičnimi interakcijami veže na proteine in jih pri tem denaturira. Nastanejo kompleksi z močnim negativnim nabojem, razmerje med tem nabojem in dolžino proteinske verige pa je enako za vse proteine. Ločitev proteinov poteka tako le na osnovi njihove mase. [79, 80]

Najprej smo pripravili 12% ločevalni gel in ga vlili v celico, ki je bila sestavljena iz dveh

steklenih plošč, med katerima je bil postavljen distančnik z debelino 1,5 mm. Na vrh ločevalnega gela smo dodali i-propanol, da je polimerizacija potekala nemoteno. Ko je polimerizacija potekla do konca, smo i-propanol odlili in na ločevalni gel nanесли še 5% koncentracijski gel. Vstavili smo še glavniček z debelino 1,5 mm.

Sledili sta priprava vzorcev za analizo in priprava standarda prokatepsina L, ki je služil kot kontrola. Z redčenjem osnovnih lizatov (LN1, LN2, LD1, LD2)¹ smo pripravili redčitev posameznega lizata, ki je vseboval 100 µg celotnih proteinov. Zatem smo si pripravili štiri mikrocentrifugirke, v katere smo dali po 20 µL posameznega lizata s 100 µg proteinov. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali še 4 µL nanašalnega pufru. Vzorce smo nato podvrgli 8-minutni denaturaciji v vodni kopeli (vrenje), jih kratko centrifugirali ter v vsak žepk nanесли po 24 µL pripravljenega vzorca. Poleg vzorcev smo v ločene žepke nanесли še prokatepsin L in označevalec velikosti (SeeBlue→Plus 2 Pre-Stained Protein Standard (Life Technologies)) – proteine z znano molekulsko maso. Z njihovo pomočjo smo lahko na podlagi primerjanj prepotovanih dolžin označevalcev in proteinov v lizatu ocenili molekulsko maso proučevanih proteinov. Ločevanje je potekalo pri konstantni napetosti 100V.

3.2.8 PRENOS WESTERN IN ODSTRANJEVANJE VEZANIH PROTITELES

Po ločitvi proteinov z SDS-PAGE smo s pomočjo električnega toka prenesli proteine na nitrocelulozno membrano dimenzij 5,3 x 8,3 cm. Prenos je potekal 1,5 ure pri konstantni napetosti 100V. Po prenosu je sledila imunokemijska analiza prenesenih proteinov (princip je prikazan na sliki 3).

Najprej smo s 5% posnetim mlekom v pufru 1x PBST (PBS, ki vsebuje 0,05% Tween-20) blokirali prosta mesta na membrani. Membrano smo stresali 1h na stresalniku pri sobni temperaturi.

Blokirano membrano smo spirali z 1x PBST (3 x 5 min na sobni temperaturi na stresalniku) in jo nato izpostavili primarnim protitelesom (ovčja poliklonska protitelesa proti humanemu katepsinu L) v PBST v koncentraciji 7,5 µg/mL. Sledilo je stresanje čez

¹ LN ... lizat nediferenciranih celic; LD ... lizat diferenciranih celic

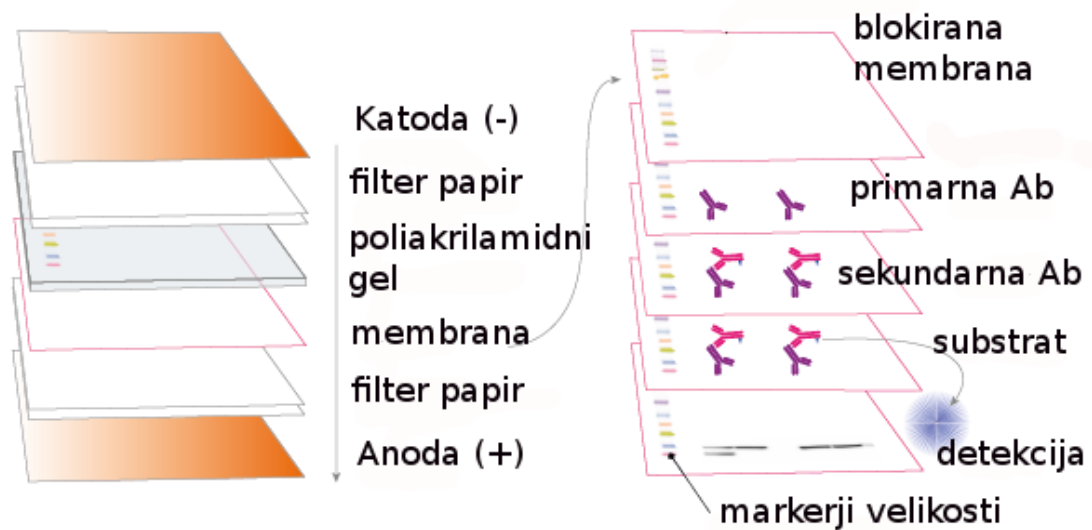
noč na 4 °C. Naslednji dan smo membrano sprali (3 x 10 min na sobni temperaturi) z 1x PBST in ji dodali sekundarna protitelesa (zajčja proti-ovčja protitelesa, konjugirana z encimom HRP), ki smo jih redčili 1/2000. Po enournem stresanju na sobni temperaturi in nadaljnem spiranju (3 x 5 min, sobna temperatura) z 1x PBST smo membrani dodali mešanico: kemiluminiscentni substrat (Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate) v pufri (Super Signal® West Dura Luminol/Enhancer Solution), ki smo ju zmešali v razmerju 1 : 1. Membrano z nanosenim substratom smo vstavili med dva prozorna plastična sloja in detektirali oddano kemiluminiscenco s pomočjo sistema G-box. Pri tem smo membrano najprej slikali pod normalno svetlobo, da so se videli le označevalci velikosti. Zatem smo luč izklopili in naprava je zaznala sproščeno kemiluminiscenco.

Odstranjevanje vezanih protiteles

Po končani detekciji katepsina L smo membrano stresali v 1x PBST (20 min na sobni temperaturi). Sledilo je enourno stresanje v pufri za odstranjevanje protiteles pri 60 °C, zatem pa še spiranje z 1x PBST (2 x 20 min na sobni temperaturi). Membrano smo nato 30 min blokirali s posnetim mlekom (5 % v 1x PBST).

Vrednotenje enakomernosti nanosa proteinov

Blokirano membrano smo izpostavili primarnim zajčjim protitelesom proti β -aktinu v PBST (koncentracija: 0,7 mg/mL) in stresali membrano 1h na sobni temperaturi. Sledilo je spiranje z 1x PBST (3 x 10 min) in zatem nanos kozjih proti-zajčjih protiteles, označenih z encimom HRP. Po enournem stresanju na sobni temperaturi in nadaljnem spiranju (3 x 5 min, sobna temperatura) z 1x PBST smo membrani dodali mešanico: kemiluminiscentni substrat (Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate) v pufri (Super Signal® West Femto Luminol/Enhancer Solution), ki smo ju zmešali v razmerju 1 : 1. Nadaljnja detekcija kemiluminiscence je potekala na enak način kot pri vrednotenju katepsina L.



Slika 3: Prenos western. Levo: postavitve glavnih elementov in prenos proteinov na membrano s pomočjo električnega toka. Desno: posamezni koraki pri določanju aktivnosti proteinov. [81]

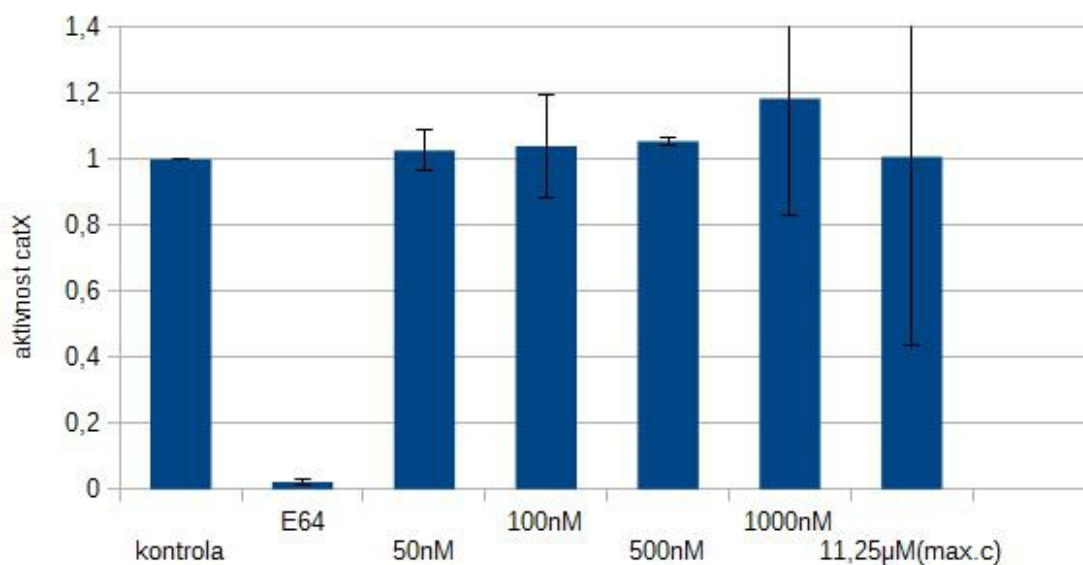
3.2.9 STATISTIČNA ANALIZA IN OBDELAVA PODATKOV

Pri statistični analizi podatkov smo uporabljali dvostranski Studentov t-test, s katerim smo preverjali razlike med aritmetičnima sredinama dveh vzorcev. Razlike so bile statistično pomembne, ko so bile p-vrednosti manjše od 0,05. Podatke smo urejali s pomočjo programa LibreOffice Calc.

4 REZULTATI

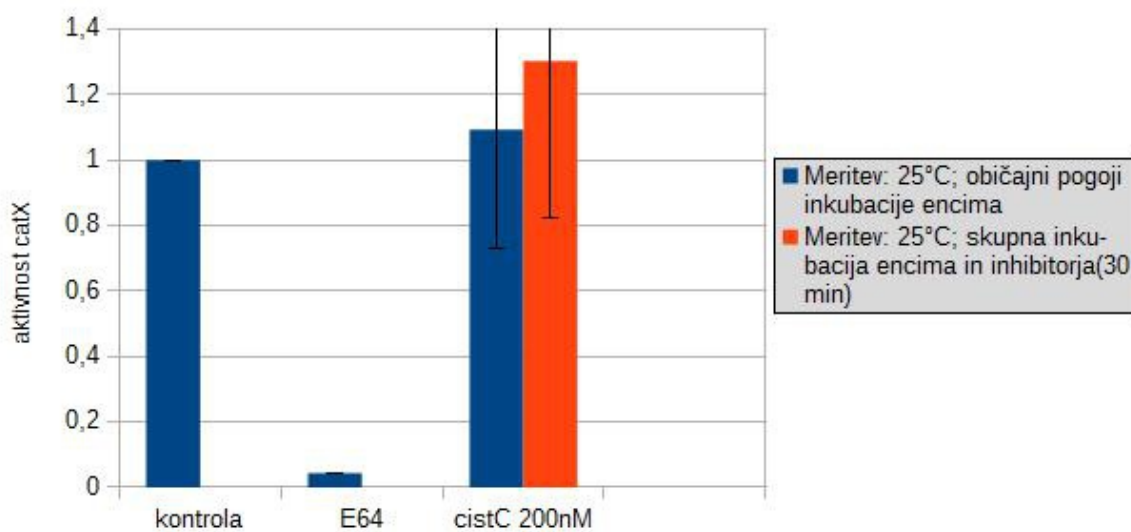
4.1 Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku cistatina C

Iz grafa na sliki 4 je razvidno, da inhibicije ni bilo in da je bilo prisotno celo rahlo povečanje aktivnosti katepsina X z večanjem koncentracije cistatina C. Pozitivna kontrola pri vseh testih je bil dobro uveljavljen ireverzibilni zaviralec cisteinskih katepsinov E64.



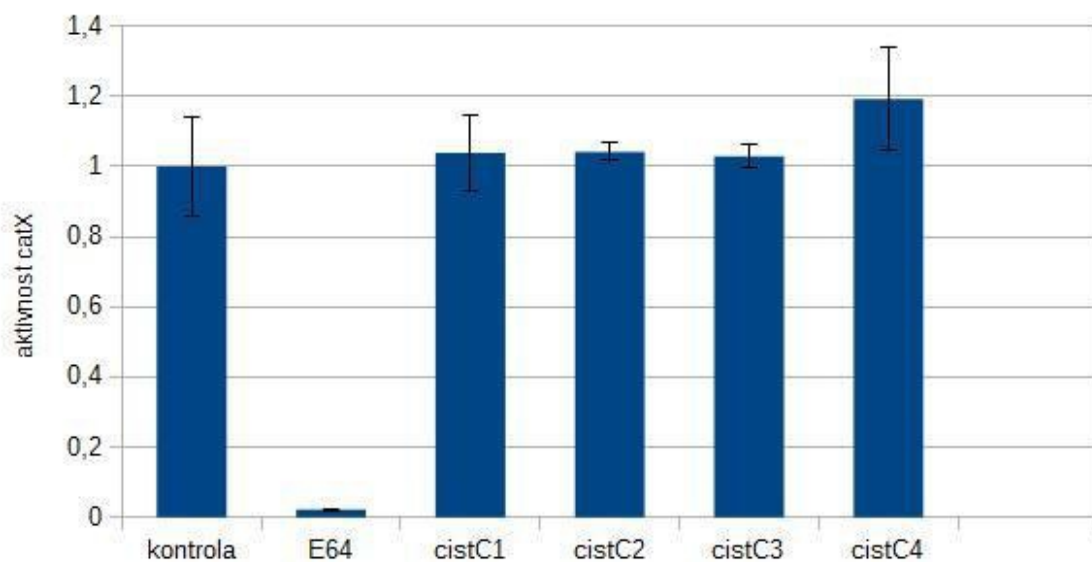
Slika 4: Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku naraščajočih koncentracij cistatina C. Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD (n=2, 4).

Eksperiment smo ponovili kot v [19] in dobili podobne rezultate (slika 5) (glej poglavje 3.2.1.1.1).



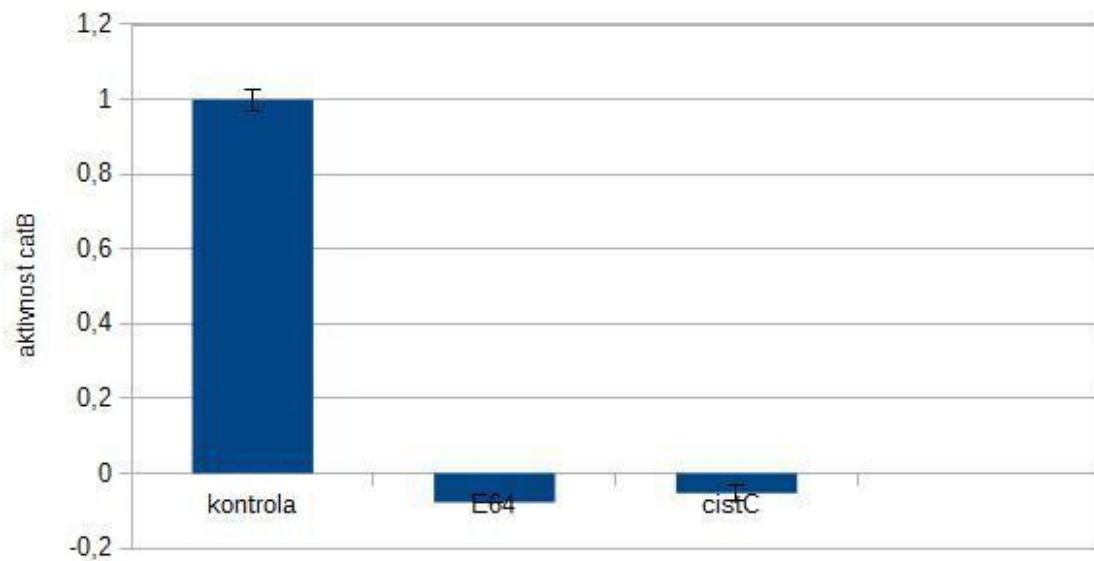
Slika 5: Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku cistatina C ter regulaciji temperature meritve in predinkubacije. Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD (n=2, 4).

Tudi pri testiranju različnih serij cistatina C (kot kontrola morebitnih nepravilnosti v terciarni strukturi zaviralca) so rezultati pokazali, da inhibicija ni bila prisotna (slika 6).



Slika 6: Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku različnih serij cistatina C (200 nM). Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD (n=2).

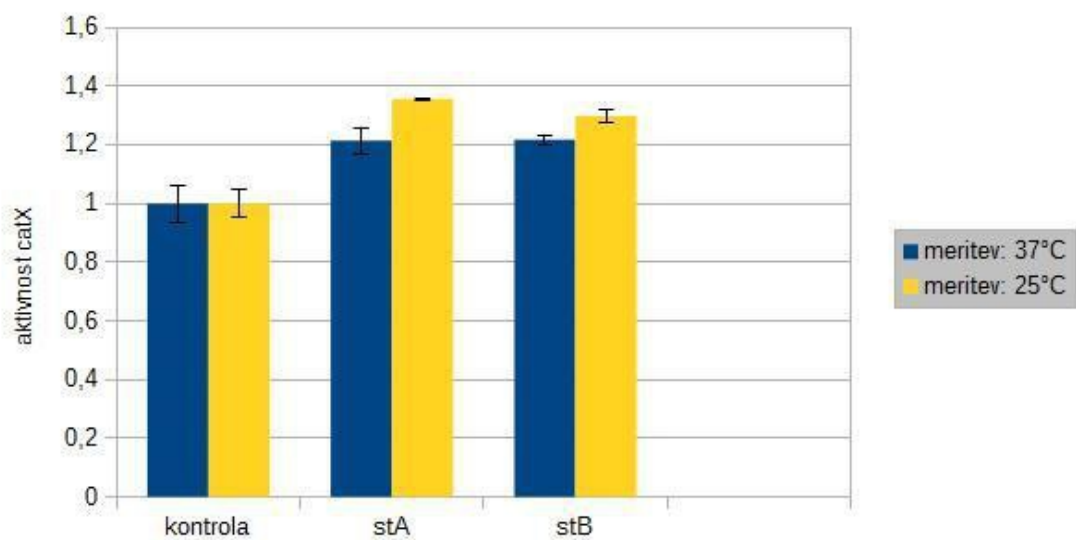
Iz rezultatov kontrolne meritve lahko vidimo, da je cistatin C zaviral katepsin B (slika 7).



Slika 7: Graf aktivnosti katepsina B ob dodatku cistatina C (200 nM). Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD (n=2).

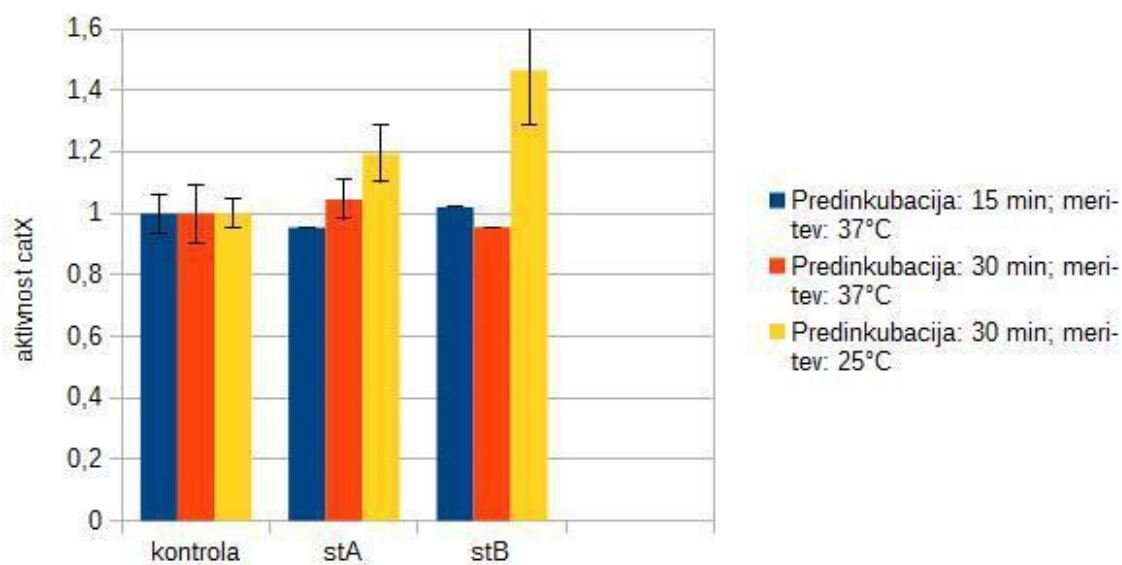
4.2 Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku stefinov A in B

Ob dodatku stefinov A in B ni prišlo do inhibicije (slika 8), saj je bila aktivnost katepsina X celo povečana (zlasti je to vidno pri meritvi pri 25 °C).



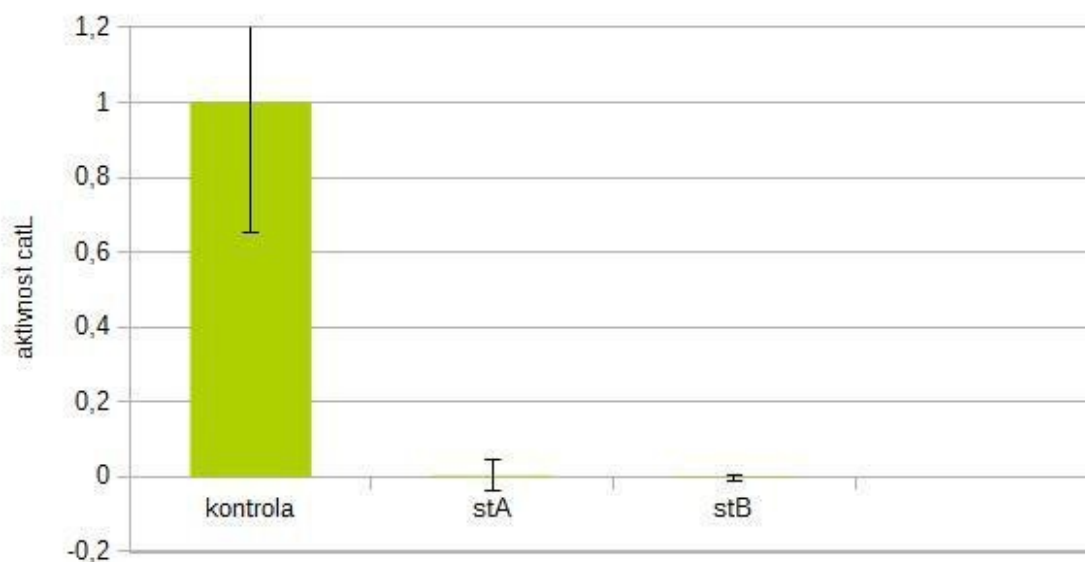
Slika 8: Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku stefinov A in B (1 μM) (ločena inkubacija posameznega stefina in encima). Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD (n=2).

V primeru skupne predinkubacije encima in zaviralca tudi ni prišlo do statistično značilne inhibicije, je pa moč opaziti rahlo razliko med posameznimi načini predinkubacije (slika 9). Aktivnost katepsina X je bila tako pri obeh načinih predinkubacije pri temperaturi meritve 25 °C povečana v primerjavi s 37 °C.



Slika 9: Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku stefinov A in B ($1 \mu\text{M}$) (skupna predinkubacija posameznega stefina z encimov na sobni temperaturi). Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD ($n=2$).

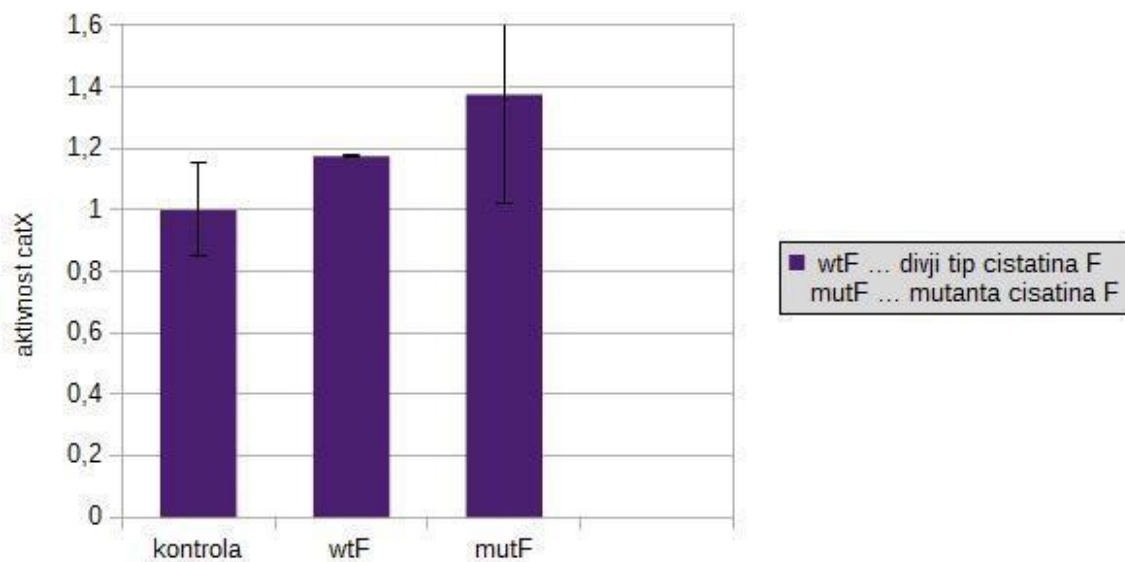
Oba stefina smo testirali na katepsinu L in potrdili inhibicijo (slika 10).



Slika 10: Graf aktivnosti katepsina L ob dodatku stefinov A in B ($1 \mu\text{M}$). Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD ($n=2$).

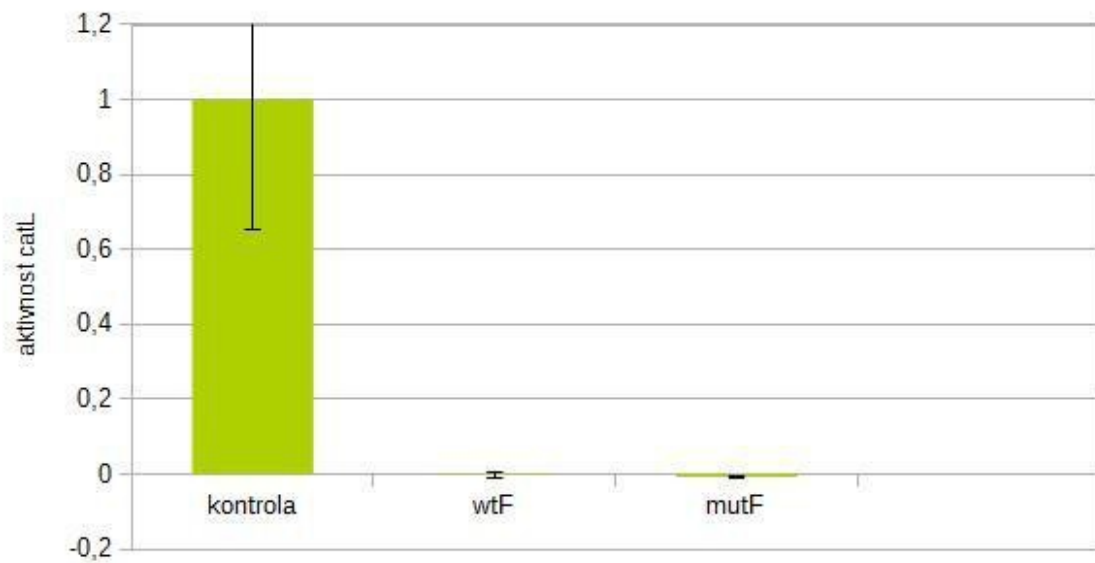
4.3 Določanje aktivnosti Katepsina X ob dodatku cistatina F

Pri testiranju inhibicije s cistatinoma F so rezultati pokazali, da ta ne zavirata Katepsina X (slika 11), kar so ugotovili že v [63].



Slika 11: Graf aktivnosti Katepsina X ob dodatku cistatinov F (0,5 μ M). Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD (n=1, 2).

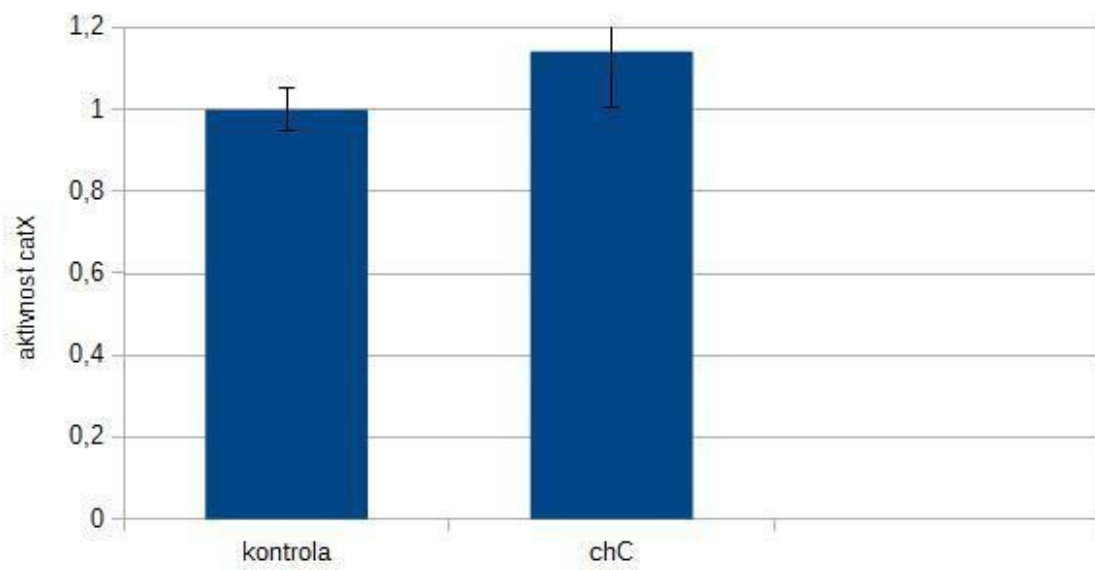
Iz kontrolne meritve je vidno, da sta cistatina F zavirala Katepsin L (slika 12). S tem smo lahko izključili sistemsko napako ter tako potrdili prej izvedene meritve na Katepsinu X.



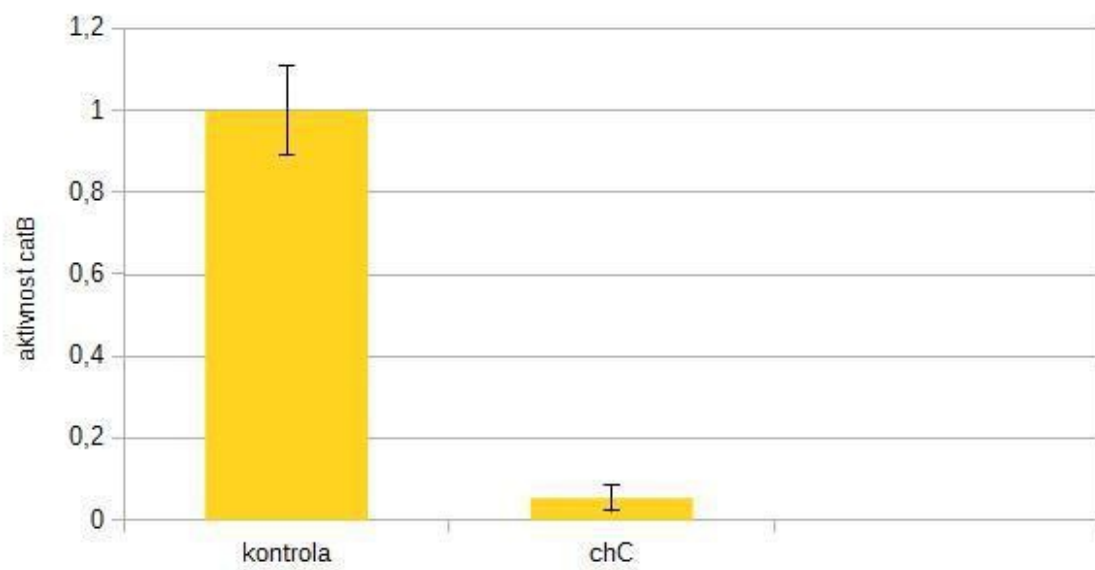
Slika 12: Graf aktivnosti katepsina L ob dodatku obeh cistatinov F (0,5 μ M). Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD (n=2).

4.4 Določanje aktivnosti katepsina X ob dodatku kokošjega cistatina

Rezultati so pokazali, da tudi kokošji cistatin ne zavira katepsina X (slika 13), zato smo testirali omenjen zaviralec še na katepsinu B in potrdili njegovo inhibicijo (slika 14).



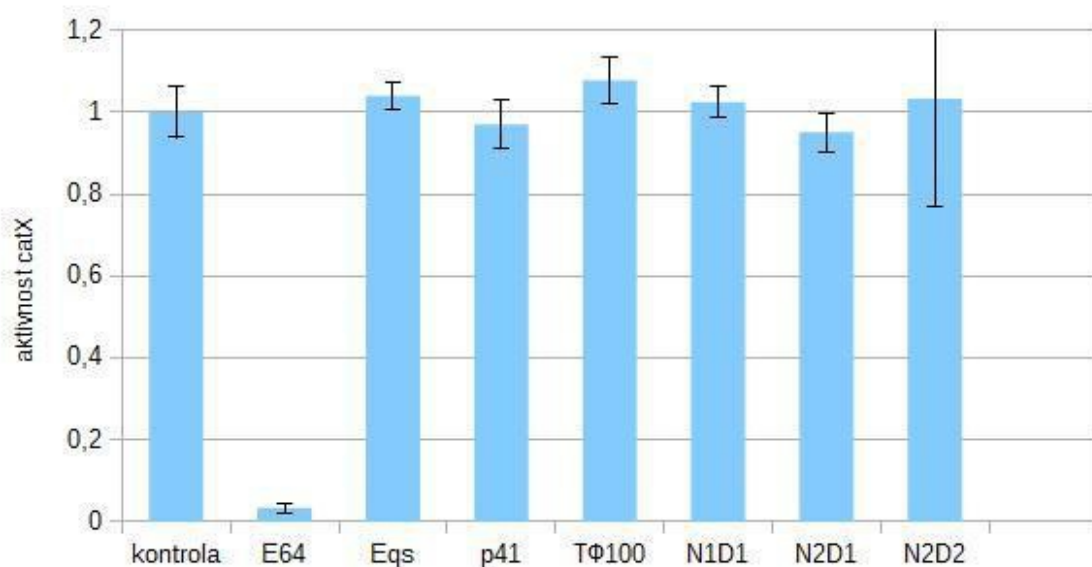
Slika 13: Graf aktivnosti katepsina X ob dodatku kokošnjega cistatina (200 nM). Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD (n=2).



Slika 14: Graf aktivnosti katepsina B ob dodatku kokošnjega cistatina (200 nM). Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD (n=2).

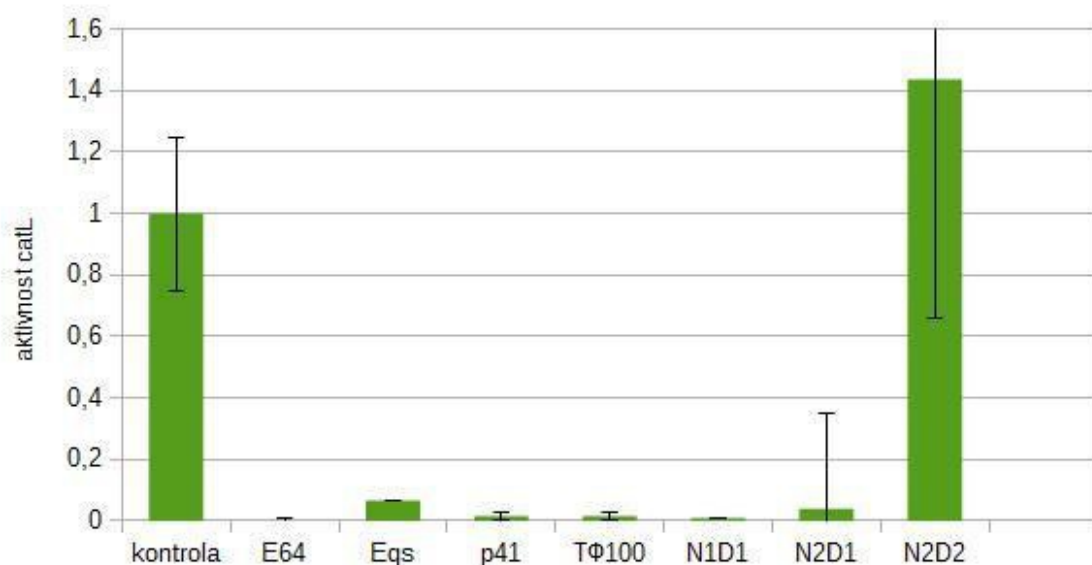
4.5 Določanje aktivnosti Katepsina X ob dodatku tiropinov (zaviralcev s tiroglobulinsko domeno tipa 1)

V nadaljevanju smo testirali tiropine, ki tudi veljajo za potencialne zaviralce Katepsina X. Testirali smo aktivnost omenjenega encima in dobili rezultate, ki nakazujejo, da inhibicija Katepsina X s tiropini ni bila prisotna (slika 15).



Slika 15: Graf aktivnosti Katepsina X ob dodatku tiropinskih zaviralcev. Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD (n=2).

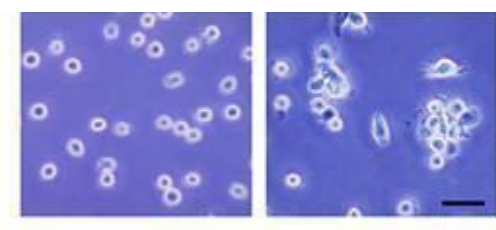
Vsi testirani zaviralci, razen N2D2, pa so zavirali Katepsin L (kontrola inhibicije) (slika 16).



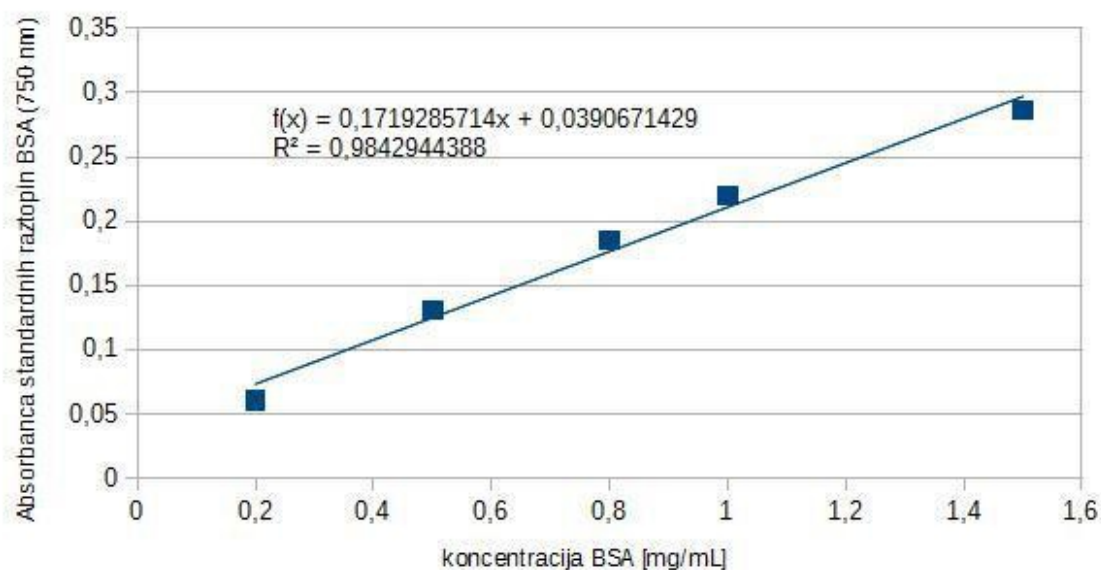
Slika 16: Graf aktivnosti katepsina L ob dodatku tiropinskih zaviralcev. Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD ($n=1, 2$).

4.6 Diferenciacija celične linije U937 in določitev celotne koncentracije proteinov v celičnem lizatu

Celično linijo U937 smo diferencirali (morfološke razlike med obema fenotipoma celic prikazuje slika 17), da bi testirali delovanje zaviralcev na nativnem katepsinu L. Celotno koncentracijo proteinov v lizatih smo določili s pomočjo Bio-Radove metode DC proteini (rezultati celotnih koncentracij proteinov v lizatih so povzeti v preglednici VI), ki vključuje tudi pripravo umeritvene krivulje (slika 18).



Slika 17: Morfološke razlike med nediferenciranimi (*levo*) in diferenciranimi (*desno*) celicami linije U937. [82]



Slika 18: Umeritvena krivulja pri določanju celotne koncentracije proteinov v celičnih lizatih celične linije U937 s pomočjo linearne regresije oz. enačbe premice. Slika prikazuje konkreten primer določanja celotne koncentracije proteinov v lizatu diferenciranih celic 3. Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SN (n=2).

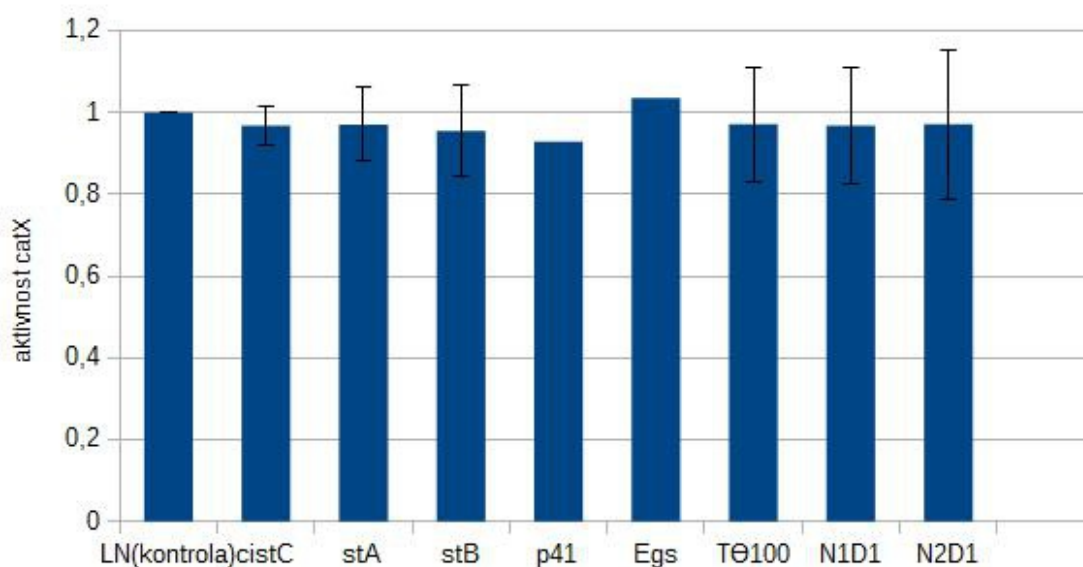
Preglednica VI: Celotna koncentracija proteinov v lizatih.

VZORCI	C (mg/mL)
Lizat nediferenciranih celic U937 1	22,3
Lizat nediferenciranih celic U937 2	18,8
Lizat diferenciranih celic U937 1	30,5
Lizat diferenciranih celic U937 2	8,9
Lizat diferenciranih celic U937 3	3,9

4.7 Katepsin X v lizatih

4.7.1 Določanje aktivnosti katepsina X v lizatih nediferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev

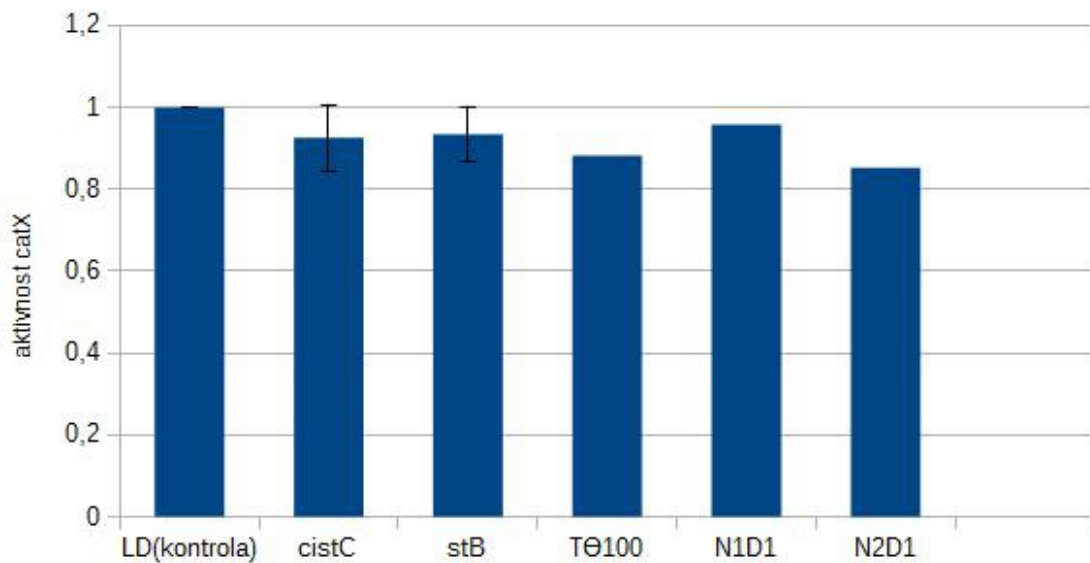
Ker so doslej rezultati pokazali, da inhibicije rekombinantnega katepsina X ni, smo pripravili lizate nediferenciranih celic linije U937 in testirali aktivnost nativnega katepsina X. Rezultati kažejo, da inhibicija nativnega katepsina X ni prisotna (slika 19).



Slika 19: Graf aktivnosti katepsina X v lizatih nediferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev. Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD ($n=2, 4$).

4.7.2 Določanje aktivnosti katepsina X v lizatih diferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev

Po celični diferenciaciji smo preverili še aktivnost katepsina X v lizatu diferenciranih celic. Tu je sicer zaznati rahlo inhibicijo katepsina X, ki pa ni statistično značilna (slika 20).

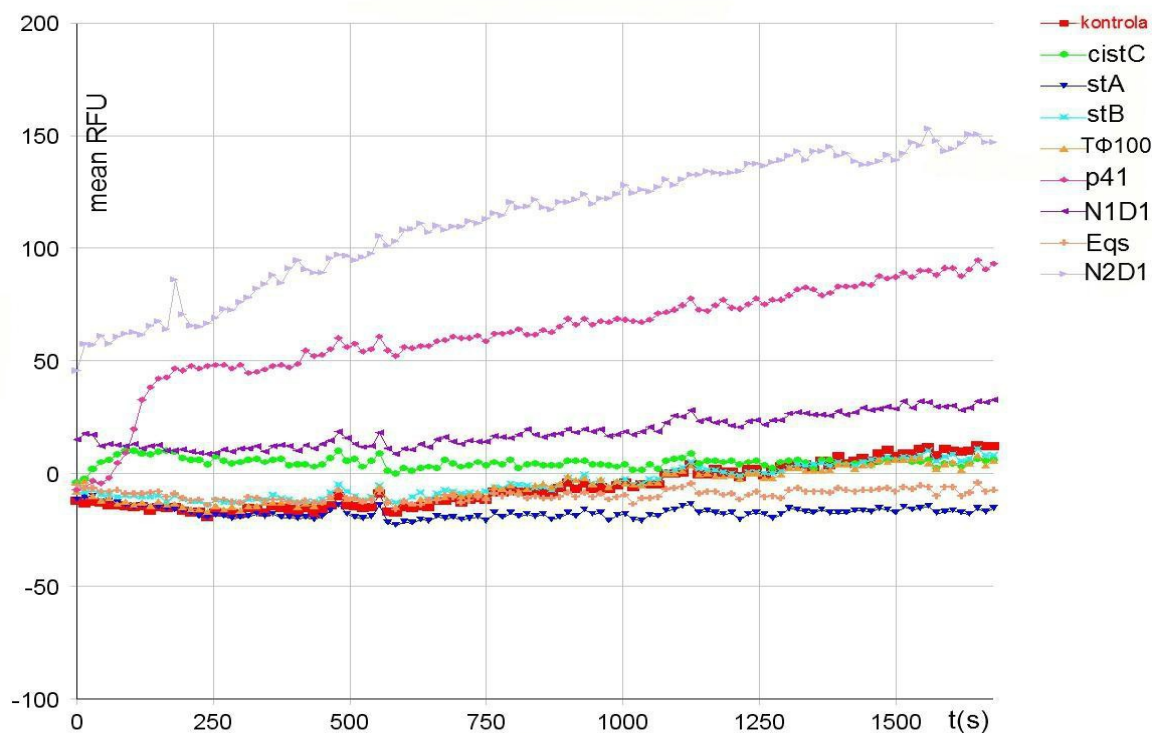


Slika 20: Graf aktivnosti katepsina X v lizatih diferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev. Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD ($n=2, 4$).

4.8 Katepsin L v lizatih

4.8.1 Določanje aktivnosti katepsina L v lizatih nediferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev

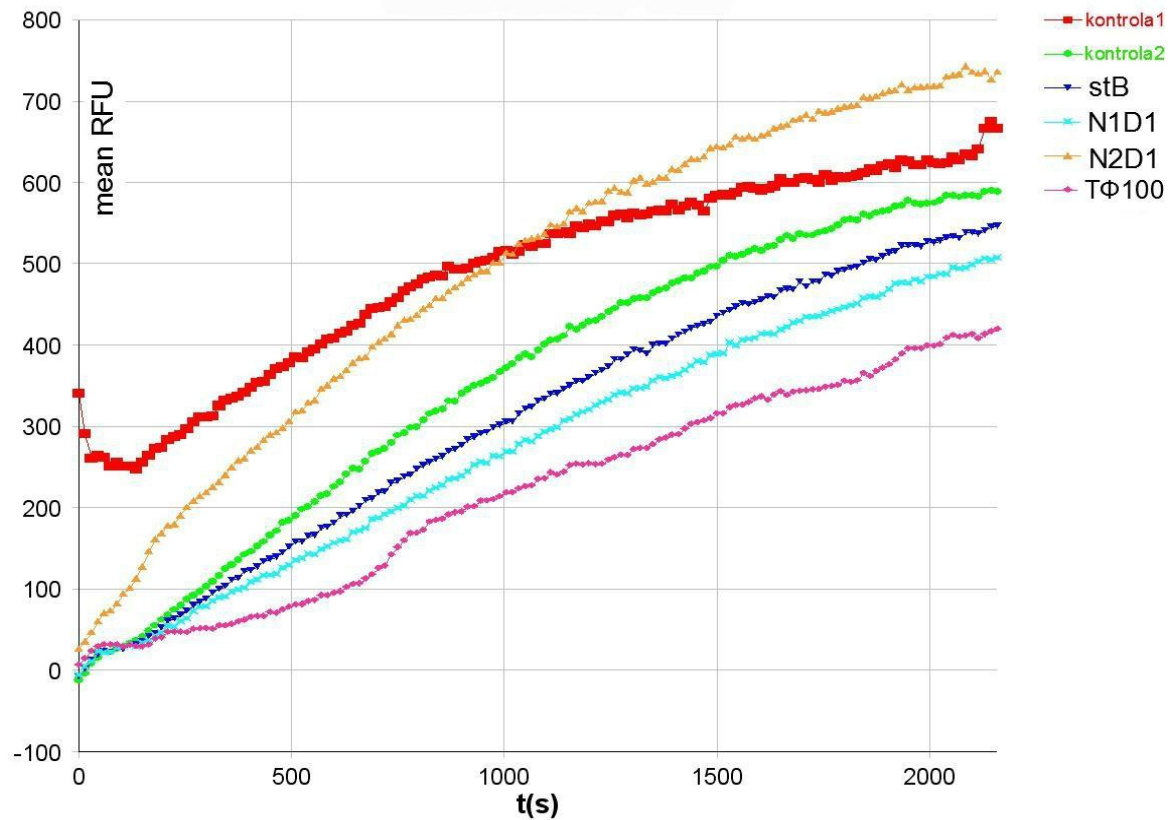
Izvedli smo potrditev metode, predstavljene v poglavju 4.7.1, na nativnem katepsinu L v lizatih nediferenciranih celic U937. Iz rezultatov je razvidno, da je aktivnost katepsina L v lizatu zelo šibka (slika 21).



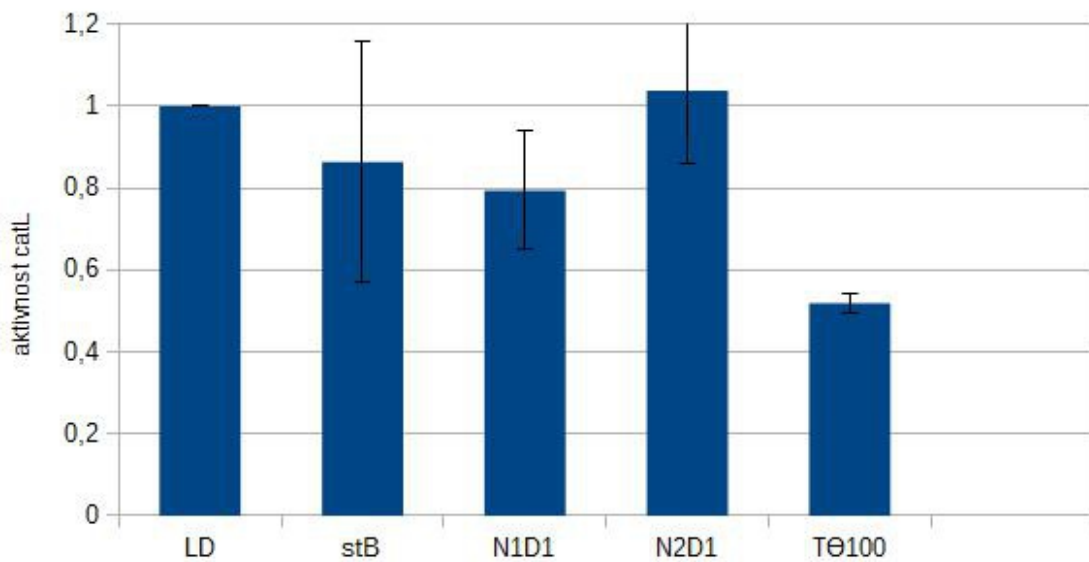
Slika 21: Profil aktivnosti katexsina L v lizatih nediferenciranih celic (prvi poskus). Slika prikazuje graf povprečne enote relativne fluoresce (mean RFU) v odvisnosti od časa. Kontrola je lizat nediferenciranih celic.

4.8.2 Določanje aktivnosti katexsina L v lizatih diferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev

V primeru diferenciranih celic nam rezultati kažejo, da je bila aktivnost katexsina L zaznana (slika 22). Kar se tiče inhibicije, je pri stefinu B, TΦ100 in N1D1 prišlo do inhibicije katexsina L. V primeru N2D1 inhibicija ni bila zaznana (sliki 22 in 23).



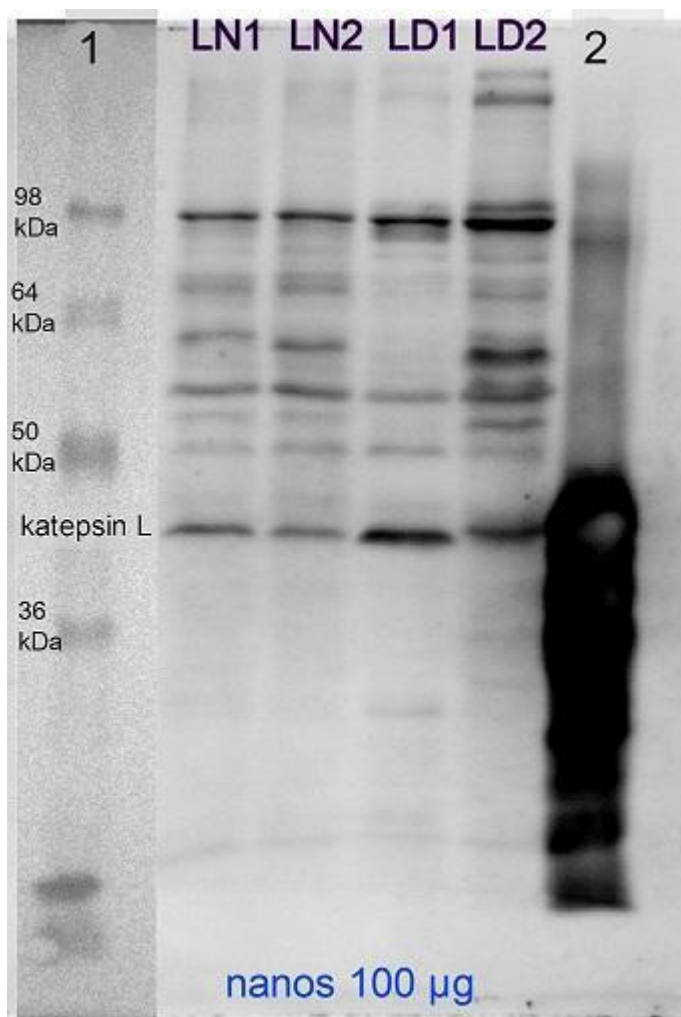
Slika 22: Profil aktivnosti Katepsina L v lizatu diferenciranih celic. Posredno je prikazana hitrost razgradnje substrata v odvisnosti od časa. Kontrola 1 je rekombinantni Katepsin L, kontrola 2 pa lizat diferenciranih celic.



Slika 23: Graf aktivnosti Katepsina L v lizatih diferenciranih celic U937 ob dodatku izbranih zaviralcev. Vrednosti, ki so predstavljene, so povprečne vrednosti \pm SD ($n=3, 6$).

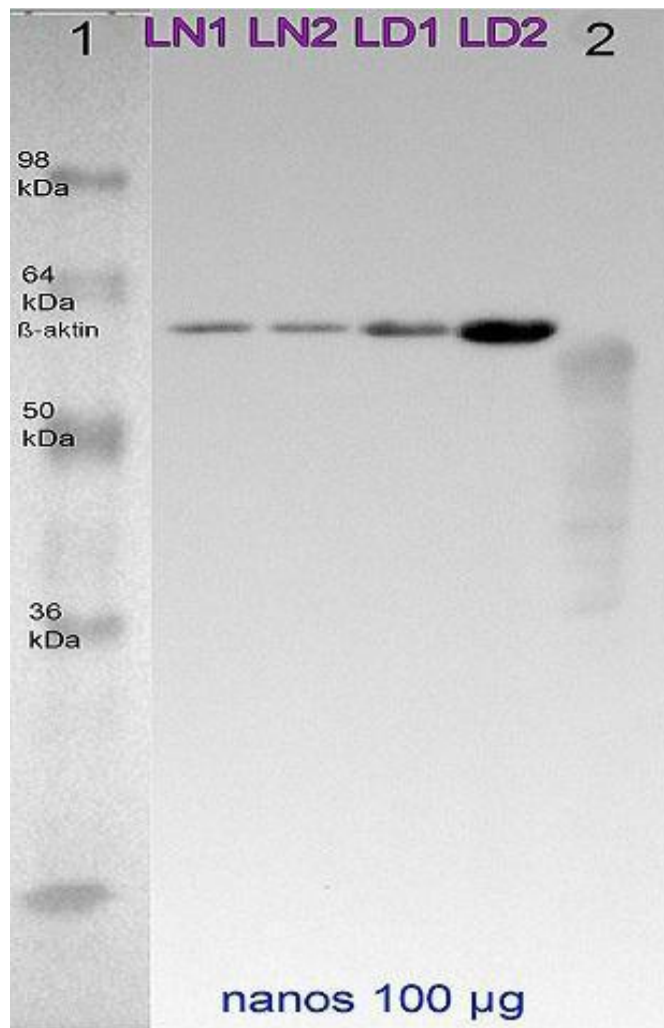
4.9 Določanje prisotnosti katepsina L v lizatih nediferenciranih in diferenciranih celic U937

Zgornjo razliko v izražanju katepsina L (sliki 21 in 22) smo potrdili še s prenosom western. S to metodo smo dokazali povečano prisotnost katepsina L v lizatu diferenciranih celic (slika 24).



Slika 24: Detekcija katepsina L s specifičnimi protitelesi z metodo prenos western. Legenda: 1 ... označevalci velikosti; 2 ... standard (prokatepsin L); LN ... lizat nediferenciranih celic U937; LD ... lizat diferenciranih celic U937.

Na isti membrani smo detektirali še β -aktin, ki je dober pokazatelj enakomernosti nanosa proteinov. Rezultati kažejo, da je koncentracija proteinov v prvih treh nanosih lizatov precej enakomerna (slika 25). Večje odstopanje predstavlja le četrta lisa.



Slika 25: Detekcija β -aktina s specifičnimi protitelesi z metodo prenos western.

Legenda: 1 ... označevalci velikosti; 2 ... standard (prokatepsin L); LN ... lizat nediferenciranih celic U937; LD ... lizat diferenciranih celic U937.

5 RAZPRAVA

Katepsin X je monomerna, lizosomska peptidaza, ki ima v telesu številne pomembne fiziološke vloge. Te v veliki meri opravlja z vezavo na integrinske receptorje in s proteolitično cepitvijo nekaterih njihovih podenot ter drugih substratov. Na ta način pomembno posega v procese celične signalizacije ter v samo aktivacijo in migracijo celic. Pomembno fiziološko vlogo ima pri imunskih celicah pa tudi v drugih celicah in predelih organizma, med drugim v možganih, kjer s proteolitično cepitvijo nekaterih encimov uravnava preživetje živčnih celic.

Kot je bilo omenjeno že v uvodu, mora biti aktivnost katepsinov v organizmu skrbno uravnavana, saj lahko telo le tako preprečuje škodljive učinke, ki so posledica povečane proteolitične aktivnosti katepsinov. Mehanizmi, ki so udeleženi pri uravnavanju aktivnosti katepsinov, so številni in posegajo na različne nivoje: preko njihovega izražanja, postranslacijskih modifikacij, pH, aktivacije njihovih cimogenov, njihove inhibicije in razgradnje, različnega mesta nahajanja encima in substrata v telesu ali pa preko kombinacije vseh teh dejavnikov. Eden od pomembnih načinov uravnavanja aktivnosti katepsinov pa je tudi njihova endogena inhibicija. [5, 13, 45, 83]

O endogeni inhibiciji katepsina X so bile v preteklosti že izvedene nekatere raziskave – obstajata dve študiji, ki pa se v marsičem precej razlikujeta in se razhajata. Zaradi preglednosti bomo njihove glavne razlike in rezultate povzeli v preglednici VII. Preglednici smo dodali še stolpec, v katerem smo strnili podatke te magistrske naloge.

Preglednica VII: Primerjava treh različnih testiranj inhibicije Katepsina X.

	Nägler, 1999	Klemenčič, 2000	naš poskus
Encim	Rekombinantni catX. (<i>Pichia pastoris</i>)	nativni catX izoliran iz človeških jeter	1.rekombinantni catX. (<i>Pichia pastoris</i>) 2.catX v celičnem lizatu celične linije U937
Kinetika – pogoji in meritev	Meritev: 25°C, 50 mM natrijev citrat (pH3–5,9)	Meritev: 25°C, 100 mM acetatni pufer (pH5,5)	Meritev: 25°C oz. 37°C, 100 mM acetatni pufer (pH5,5)
Inkubacija	ni podatka	30 min predinkubacija z zaviralcem	z inkubacijo in brez nje
Substrat	Abz-Phe-Arg-Phe-(4NO ₂)	Z-Phe-Arg-AMC	Abz-Phe-Glu-Lys (Dnp)-OH
Koncentracija catX	ni podatka	5–20 nM	20 nM
Zaviralec	cistC (do 4 µM)	cistC (0–150 nM), stA(0–20 nM), chC(0–150 nM)	cistC, stA, stB, chC, cistF, p41, TØ100, Eqs, N1D1, N2D1, N2D2
Inhibicija – rezultati	cistC: ni inhibicije	Inhibicija je: stA (K _i =1,7 nM) >cistC (K _i =12 nM) >chC (K _i =15 nM); stB in L-kininogen (slabše oz. ni inhibicije; K _i >250 nM)	ni inhibicije

Ker v času izvedbe zgornjih dveh študij še ni bil znan specifični substrat za Katepsin X pa tudi čistost samega encima ni bila popolna (kontaminacija s Katepsinoma B [19] oz. L [17]), smo želeli natančneje ovrednotiti endogene zaviralce Katepsina X.

Najprej smo testirali **cistatin C**, ki že dolgo velja za endogeni zaviralec nekaterih katepsinov. Pri določanju aktivnosti rekombinantnega katepsina X ob dodatku cistatina C nismo dobili rezultatov, ki smo jih pričakovali glede na izsledke raziskave [19], na katero smo se naslanjali. Rezultate primerljive našim so dobili tudi pri študiji na rekombinantnem katepsinu X, kjer prav tako niso opazili inhibicije s cistatinom C. [17] Inhibicije nismo zaznali kljub nekaterim ukrepom, kot so bili: postopno povečevanje koncentracije cistatina C, različne temperature meritve, podaljšan čas inkubacije. Še več – aktivnost katepsina X je bila celo povečana. Iz rezultatov poskusa z različnimi serijami cistatina C je razvidno, da so vsi štirje cistatini enako vplivali na aktivnost katepsina X. Čeprav smo uporabili dokaj visoke koncentracije cistatina C, smo lahko izključili sistemsko napako ter s tem potrdili pravilnost prej izvedenih meritev na rekombinantnem katepsinu X.

Pri testiranju aktivnosti rekombinantnega katepsina X ob dodatku **stefinov A** in **B** smo prav tako dobili nepričakovane rezultate. V našem primeru smo pri stefinu A dobili rezultat, ki se je razlikoval od rezultata v študiji [19]. Inhibicije ni bilo, aktivnost encima pa je bila celo nekoliko povečana kljub uvedenim ukrepom, da smo pred meritvijo zaviralec v prvem primeru inkubirali ločeno od encima, v drugem primeru pa skupaj z njim. Povečali smo tudi čas inkubacije ter znižali temperaturo merjenja, kot smo to naredili pri cistatinu C. Tudi pri testiranju stefina B smo dobili enake rezultate. Iz dobljenih rezultatov lahko sklenemo, da inhibicije ni bilo in da način inkubacije ter uporabljena temperatura meritve ne vplivata bistveno na inhibicijo katepsina X.

Testirali smo še **cistatin F** (divji tip in legumainsko mutanto). Divji tip cistatina F obstaja v dimerni obliki, ki je pomembna za prehod v celico. Mutanta, ki smo jo testirali, je bila okarakterizirana na encim legumain, ki ga cistatin F zavira. Ta mutanta je brez 15 aminokislin na N-koncu (monomerna N-končno skrajšana oblika) in je aktivna oblika zaviralca, a se ne more povezati v dimerno obliko in ne prehaja v celice. [dar: Milica Perišič, IJS] Tudi pri testiranju obeh tipov cistatina F smo ovrgli inhibicijo katepsina X, kar so ugotovili že v podobni raziskavi izpred nekaj let [63].

Enake rezultate smo dobili tudi pri testiranju **kokošnjega cistatina**. Glede na rezultate, ki smo jih dobili z vsemi doslej uporabljenimi zaviralci, smo ugotovili, da nobeden ni izkazoval inhibicije rekombinantnega katepsina X.

V zadnjem času so se kot potencialni endogeni zaviralci izkazali še nekateri drugi predstavniki, ki jih je bilo smiselno testirati. V ta namen smo na rekombinantnem Katepsinu X preizkusili še novejša in slabše okarakterizirana zaviralca – tiropine: **ekvistatin** (Eqs), **p41**, **testikan-1** (TΘ100), **nidogen-1-domena-1** (N1D1), **nidogen-2-domena-1** (N2D1), **nidogen-2-domena-2** (N2D2). Tudi tukaj so bili rezultati enaki prejšnjim – inhibicija rekombinantnega Katepsina X ni bila prisotna.

Ker bi lahko na dane rezultate vplival tudi sam zaviralec oz. spremembe v njegovi strukturi in posledično aktivnosti, smo izvedli še pozitivno kontrolo, s katero smo preverili našo metodo določanja aktivnosti. V literaturi smo našli podatke, da cistatin C in kokošji cistatin zavirata Katepsin B, stefina A in B, cistatin F ter vsi drugi zaviralci pa zavirajo aktivnost Katepsina L. Rezultati so to tudi pokazali – torej je metoda, ki smo jo uporabili za določanje aktivnosti Katepsina X, v redu. Inhibicije nismo zaznali le pri drugi domeni Nidogena 2. (Nidogen 2 je sestavljen iz dveh domen: domena 1 zavira Katepsin K, za domeno 2 pa inhibicija Katepsinov ni bila objavljena. Ker Katepsina K nismo imeli na razpolago, smo tudi Nidogen 2 testirali kar na Katepsinu L)

Razlog za zmanjšano inhibicijo rekombinantnih encimov bi bil lahko med drugim tudi v spremenjeni oz. povečani glikozilaciji proteinskih verig. Rekombinantni Katepsin X ima – v nasprotju z nativnim – višjo glikozilacijo proteinske verige. [17, 74] Ko bi bili hipotetično sladkorji dodani v bližini aktivnega mesta, bi tak encim izkazoval večjo sterično oviro za zaviralec, z drugimi besedami, dostop aminokislinskih verig zaviralca v aktivno mesto Katepsina X bi bil otežen. Posledično pa bi bila tudi možnost inhibicije takega encima zmanjšana. Ker pa imamo v našem primeru aktiven rekombinantni Katepsin X, lahko z gotovostjo trdimo, da sta tako aktivni center kot tudi njegova okolica taka kot pri nativnem encimu, sicer naš encim ne bi bil aktiven. Hiperglikozilacija proteinskih verig torej lahko sicer delno res vpliva na delovanje zaviralcev, ne more pa biti razlog za popolno odsotnost inhibicije.

Ker so bile koncentracije tiropinov neznane², bi lahko tudi to imelo neki vpliv na rezultate, saj bi obstajala verjetnost, da so bili zaviralci zastopani v prenizkih koncentracijah, kot so potrebne za inhibicijo. Vendar pa je to le malo verjetno, še posebej glede na uspešno inhibicijo katepsina L, ki smo jo zaznali v kontrolnih poskusih.

Ker smo z vsemi doslej uporabljenimi zaviralci dobili rezultate, ki ne govorijo v prid inhibicije rekombinantnega katepsina X, je bilo smiselno preveriti, ali morda zavirajo nativni katepsin X. Tako bi preverili že prej omenjen morebiten vpliv hiperglikozilacije na inhibicijo in s tem na morebitno neskladnost dobljenih rezultatov.

Rezultati inhibicije nativnega katepsina X v lizatih nediferenciranih celic U937 (slika 19) kažejo, da inhibicija nativnega katepsina X ni bila prisotna. Zaznati je sicer določena odstopanja, zato bi bilo potrebno eksperiment večkrat ponoviti, kar pa v primeru tiropinov – zaradi porabe zaviralcev – ni bilo mogoče. Povečana aktivnost nativnega (ter že prej rekombinantnega) katepsina X, ki smo jo ponekod zaznali, pa gre verjetno na račun prisotnosti drugih katepsinov oz. peptidaz, za katere pa v študiji [21] niso bile izvedene raziskave o rezistentnosti substrata Abz-Phe-Glu-Lys (Dnp)-OH na druge peptidaze. Za povečano aktivnost pa so verjetni tudi vzroki, povezani s samimi napakami pri delu in meritvah.

Zatem smo hoteli potrditi še možen vpliv samih zaviralcev zaradi morebitnih sprememb v njihovi strukturi in posledično v njihovi sposobnosti interakcije z encimom. Izvedli smo potrditev zgornje metode oz. kontrolo na nativnem katepsinu L v lizatih nediferenciranih celic U937 (slika 21). Rezultati, ki smo jih pri tem dobili, so nakazovali, da aktivnosti katepsina L sploh ni oz. je ta zelo nizka. Po pregledu znanstvene literature smo naleteli na študijo, ki je opisala in dokazala zmanjšano pojavnost aktivnega katepsina L v nediferenciranih celicah U937 v primerjavi z diferenciranimi celicami, zato smo se odločili v nadaljevanju celice diferencirati. [84]

V raziskavi [84] so v celični liniji U937 inducirali izražanje katepsina L s PMA. Katepsin L je lizosomalna cisteinska peptidaza, katere sintezo in izločanje inducirajo rastni dejavniki

2 Omenjene zaviralce smo dobili v dar. Na embalaži ni bilo navedene njihove koncentracije, pa tudi količine zaviralcev so bile premajhne, da bi lahko določili njihovo koncentracijo.

in tumorski promotorji. Ta encim najdemo v številnih celicah in tkivih, v velikem obsegu pa se sintetizira pri nekaterih tumorjih. Glavno vlogo ima pri znotrajceličnem metabolizmu, cepi pa tudi zunajcelične proteine in tako vpliva na uravnavanje obnavljanja proteinov znotraj in zunaj celice. S pomočjo PMA smo inducirali prepisovanje mRNA katepsina L v celicah U937. [84] Raven mRNA katepsina L doseže vrh med 6 in 12 ur in vztraja kakih 72 ur. Pri našem delu je diferenciacija potekala v povprečju 24 do 48 ur.

Po diferenciaciji celične linije U937 smo pripravili lizat diferenciranih celic in najprej testirali inhibicijo nativnega katepsina X (slika 20). Rezultati kažejo, da inhibicije ni bilo. Ponekod je sicer opaziti določen odstotek inhibicije (predvsem N2D1 in TΦ100), ki pa je zanemarljiv in ni statistično značilen (gre pa verjetno na račun že prej omenjenih vzrokov).

Na nativnem katepsinu X smo tako testirali večino kandidatov, ki bi lahko bili endogeni zaviralci katepsina X. Ekvistatin in p41 smo v naslednjih stopnjah izključili iz testiranja, saj ju nismo imeli več na voljo. Omeniti je treba še skupino zaviralcev kininogenov, ki pa nam jih žal ni uspelo dobiti.

Kontrolo metode za katepsin X na diferenciranih celicah smo potrdili še na katepsinu L. Če pogledamo rezultate poskusa določanja aktivnosti katepsina L v lizatih diferenciranih celic (sliki 22, 23), vidimo, da je v večini primerov prišlo do delne inhibicije (TΦ100 48,1%, N1D1 20,6% in stB 13,6% inhibicija), medtem ko pri N2D1 ni zaznani inhibicije, kar je v nasprotju s pričakovanji, saj smo na rekombinantnem katepsinu L dokazali močno inhibicijo z N2D1 (sliki 16 in 21).

S pomočjo primerjave profilov aktivnosti katepsina L smo dokazali večjo hitrost razgradnje substrata Z-Phe-Arg-AMC v lizatu diferenciranih celic, medtem ko je bila hitrost razgradnje v lizatu nediferenciranih celic občutno nižja (sliki 21 in 22). Pri lizatu nediferenciranih celic so namreč nakloni premic RFU/s dokaj položni, kar posredno nakazuje na manjšo vsebnost aktivnega katepsina L. V primeru lizata diferenciranih celic pa so nakloni premic strmejši, torej je bila prisotna večja hitrost razgradnje substrata za katepsin L. Tu pa je treba opozoriti še na samo skalo na osi y. Pri profilu aktivnosti katepsina L v lizatih diferenciranih celic je skala za približno faktor 7 večja kot v primeru nediferenciranih celic (sliki 21 in 22). Tudi ta ugotovitev nakazuje, da je v diferenciranih celicah višja pojavnost aktivnega katepsina L kot pa v nediferenciranih celicah U937.

Zatem smo izvedli še detekcijo katepsina L v celičnem lizatu s prenosom western.

Uporabili smo kemiluminiscenčni način detekcije proteinov.

Če pogledamo meritve pri nanosu 100 µg proteinov (slika 24), vidimo, da sta lisi katepsina L v diferenciranih celicah intenzivnejši od lis v nediferenciranih celicah. Želeli smo preveriti še enakomernost nanosa proteinov (pri vseh vzorcih smo namreč predhodno izmerili celotno koncentracijo proteinov s pomočjo Bio-Radove metode DC proteini in nanесли enako koncentracijo pri posameznih vzorcih). V ta namen smo z metodo western določili koncentracijo β-aktina, za katero je značilno, da le malo variira in je zato dokaj konstantna za posamezen tip celic ter je neodvisna od fizioloških in patofizioloških procesov. Razlog za to so kompenzatorni mehanizmi – povečana ekspresija drugih izoform aktina, ki regulirajo njegovo celotno koncentracijo v celicah. [85] Iz rezultatov je razvidno, da je koncentracija v prvih treh lisah precej enakomerna, kar potrjuje, da smo nanесли približno enako količino proteinov in so rezultati izražanja katepsina L s prenosom western zato relevantni. Odstopanje je mogoče opaziti le v četrti lisi, kjer je zaznana povečana koncentracija proteinov v primerjavi s prvimi tremi lisami (močnejša lisa).

Do napak je bodisi prišlo že pri pripravi vzorcev, občasno pa se pojavijo tudi težave pri detekciji aktina. [86] Res pa je tudi, da o fizioloških razlikah med nediferenciranimi in diferenciranimi celicami U937 vemo le malo. Prve so suspenzijske, druge pa pritrjene. Kakšen je točen fenotip teh celic in kakšne so razlike med njimi, pa žal ne moremo v celoti vedeti. Te razlike so lahko zelo kompleksne in številne, in lahko na vrsto različnih načinov vplivajo na dobljene rezultate. Kljub temu da smo v četrtem primeru nanесли precej več proteinov kot v prvih treh, pa je s slike 24 razvidno, da je lisa za katepsin L v drugem lizatu diferenciranih celic (4. lisa) manj intenzivna v primerjavi z liso v prvem lizatu (3. lisa), kar je v pravem nasprotju s pričakovanji. Zato lahko lizata nediferenciranih celic (1. in 2. lisa) primerjamo le s prvim lizatom diferenciranih celic (3. lisa), ne pa tudi z drugim.

Če torej pogledamo membrano katepsina L, vidimo, da je razlika med obema vrstama lizatov (nediferencirani in diferencirani lizat) očitna, kar kaže na razliko v pojavnosti katepsina L v obeh lizatih.

Na dva načina (primerjava profilov aktivnosti katepsina L in izražanje katepsina L s prenosom western) smo uspešno dokazali, da je v diferenciranih celicah višja pojavnost aktivnega katepsina L kot pa v nediferenciranih celicah U937.

Glede na to, da smo testirali veliko večino potencialnih endogenih zaviralcev katepsina X,

lahko zaključimo, da – kot kaže – ni endogenega zaviralca katepsina X in da morajo biti zato drugi načini uravnavanja aktivnosti tega encima toliko bolj izraženi. Res pa je, da je v igri še nekaj kandidatov za endogene zaviralce katepsina X (npr. kininogeni), ki nam jih žal ni uspelo dobiti in testirati. Predvidevamo pa lahko, da tudi kininogeni ne zavirajo katepsina X, ker se kot zaviralci obnašajo podobno kot na primer cistatini.

6 SKLEPI

V magistrski nalogi smo se osredotočili na testiranje endogenih zaviralcev cisteinskih katepsinov na rekombinantnem katepsinu X in s pomočjo testov encimske kinetike prišli do ugotovitve, da v našem testnem sistemu encima ne zavirajo. Testirali smo cistatine (cistatina C in F, stefina A in B ter kokošji cistatin) in tiropine (ekvistatin, testikan-1, p41 ter nidogena 1 in 2). Omenjene spojine niso zavirale niti nativnega katepsina X v lizatih nediferenciranih celic U937.

Izvedli smo še kontrolo metode, in v ta namen smo zaviralce testirali na rekombinantnih katepsinih B in L ter na nativnem katepsinu L. Pri tem smo v lizatih nediferenciranih celic zaznali skorajšnjo odsotnost aktivnega katepsina L, zato smo po zgledu študije [Atkins in sodelavci, 1995] izvedli diferenciacijo celic. Na dva različna načina (primerjava profilov aktivnosti katepsina L v obeh lizatih in izražanje katepsina L s prenosom western) smo tudi uspešno dokazali ugotovitve prej omenjene študije.

V lizatih diferenciranih celic smo tako testirali še nekatere od prej omenjenih zaviralcev (cistatin C, stefin B, testikan-1 ter nidogena: N1D1, N2D1) in ponovno ovrgli inhibicijo katepsina X, v večini primerov pa potrdili inhibicijo katepsina L.

Pri meritvah odzivov encimske kinetike katepsina X smo ponekod naleteli na povečane aktivnosti katepsina X in na nekoliko večja odstopanja, zato bi bilo dobro v teh primerih meritve večkrat ponoviti, a smo bili z nekaterimi zaviralci količinsko omejeni.

Z izjemo kininogenov smo testirali večino potencialnih endogenih zaviralcev katepsina X. V prihodnje bi bilo potrebno testirati še kininogene in se usmeriti v proučevanje drugih mehanizmov uravnavanja aktivnosti tega encima.

7 LITERATURA

1. Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N: The role of cathepsin X in cell signalling. *Cell Adhesion & Migration* 2009; 3(2): 164-166.
2. Pišlar A, Perišić-Nanut M, Kos J: Lysosomal cysteine peptidases – Molecules signaling tumor cell death and survival. *Seminars in Cancer Biology* 2015; 35: 168-179.
3. Agarwal SK: Proteases cathepsins – A view. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 1990; 18(2): 67-72.
4. Fonović M, Turk B: Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochem Biophys Acta* 2014; 1840(8): 2560-2570.
5. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D: Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1824(1): 68-88.
6. Turk V, Turk B, Turk D: Lysosomal cysteineproteases: facts and opportunities. *EMBO J* 2001; 20(17): 4629-4633.
7. Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk V, Turk B: Emerging Roles of Cysteine Cathepsins in Disease and their Potential as Drug Targets. *Current pharmaceutical design* 2007; 13(4): 387-403.
8. Turk B, Turk D, Turk V: Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1477(1-2): 98-111.
9. Turk B, Bieth JG, Björk I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, Kos J, Colic A, Stok V, Turk V: Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler*: 1995; 376(4): 225-230.
10. McGrath ME: The lysosomal cysteine proteases. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 1999; 28, 181-204.
11. Obermajer N, Magister S, Kopitar AN, Tepes B, Ihan A, Kos J: Cathepsin X prevents an effective immune response against *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Cell Biology* 2009; 88(8): 461-471.
12. Obermajer N, Repnik U, Jevnikar Z, Turk B, Kreft M, Kos J: Cysteine protease cathepsin X modulates immune response via activation of β_2 integrins. *Immunology* 2008;

124(1): 76-88.

13. Turk B, Turk D, Turk V : Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J.*, 2012; 31: 1630-1643.

14. Saftig P, Klumperman J: Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10: 623-635.

15. Hasilik A, Wrocklage C, Schroder B: Intracellular trafficking of lysosomal proteins and lysosomes. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2009; 47: S18-S33.

16. Stoka V, Turk V, Turk B: Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Research Review*, 2016: 32: 22-37.

17. Nägler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisima EO, Menard R: Human cathepsin X: a cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* 1999; 38(39): 12648-12654.

18. Dahl SW, Halkier T, Lauritzen C, Dolenc I, Pedersen J, Turk V, Turk B: Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry*, 2001; 40: 1671-1678.

19. Klemencic I, Karaoglanovic-Carmona A, Cezari MHS, Juliano M A, Juliano L, Guncar G, Turk D, Krizaj I, Turk V in Turk B: Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *FEBS Eur. J. Biochem* 2000; 267: 5404-5412.

20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1522>

21. Puzer L, Cotrin SS, Cezari MHS, Hirata IY, Juliano MA, Stefe I, Turk D, Turk B, Juliano L, in Karaoglanovic-Carmona A: Recombinant human cathepsin X is a carboxymonopeptidase only: a coparison with cathepsins B and L. *Biol. Chem.* 2005; 386: 1191-1195.

22. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Pecar-Fonovic U, 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; 41(8-9): 1685-1696.

23. Guncar G, Klemencic I, Turk B, Turk V, Karaoglanovic-Carmona A, Juliano L, Turk D: Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxymonopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure* 2000; 8(3): 305-313.

24. Jevnikar Z, Obermajer N, Kos J: LFA-1 Fine-tuning by Cathepsin X. *IUBMB Life* 2011; 63(9): 686-693.
25. Jevnikar Z, Obermajer N, Pecar-Fonovic U, Karaoglanovic-Carmona A, Kos J: Cathepsin X cleaves the β 2 cytoplasmic tail of LFA-1 inducing the intermediate affinity form of LFA-1 and α -actinin-1 binding. *Eur. J. Immunol.* 2009. 39: 3217-3227.
26. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, 3. Izdaja, Medicinska fakulteta – Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2014: 128.
27. Kos J, Vižin T, Pečar-Fonović U, Pišlar A: Intracellular signaling by cathepsin X: Molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2015; 31: 76-83.
28. Pečar-Fonović U, Kos J: Cathepsin X Cleaves Profilin 1 C-Terminal Tyr139 and Influences Clathrin-Mediated Endocytosis. *PloS One.* 2015; 10(9): e0137217.
29. Jechorek D, Votapek J, Meyer F, Kandulski A, Roessner A, Franke S: Characterization of cathepsin X in colorectal cancer development and progression. *Pathol Res Pract* 2014; 210(12): 822-829
30. Kraus S, Fruth M, Bunsen T, Nägler DK: IGF-I receptor phosphorylation is impaired in cathepsin X-deficient prostate cancer cells. *Biol Chem* 2012; 393(12): 1457-1462.
31. Vižin T, Christensen IJ, Wilhelmsen M, Nielsen HJ, Kos J: Prognostic and predictive value of cathepsin X in serum from colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 2014; 14: 259.
32. Nascimento FD, Rizzi CCA, Nantes I L, Stefe I, Turk B, Karaoglanovic-Carmona A, Nader HB, Juliano L, Tersariol ILS: Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005; 436(2): 323-332.
33. Lechner AM, Assfalg-Machleidt I, Zahler S, Stoeckelhuber M, Machleidt W, Jochum M, et al.: RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin α v β 3 mediates celladhesive properties. *J Biol Chem* 2006; 281: 39588-39597.
34. Lines KE, Chelala C, Dmitrovic B, Wijesuriya N, Kocher HM, Marshall JF, et al.: S100P binding protein, S100PBP, mediates adhesion through regulation of cathepsin Z in pancreatic cancer cells. *Am J Pathol* 2012; 180: 1485-1494.
35. Vasiljeva O, Papazoglou A, Kruger A, Brodoefel H, Korovin M, Deussing J, et al. Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 5242-5250.
36. Pečar-Fonović U, Jevnikar Z, Rojnik M, Doljak B, Fonović M, Jamnik P, Kos J:

- Profilin 1 as a Target for Cathepsin X Activity in Tumor Cells. *PLoS One* 2013; 8(1): e53918.
37. Wang J, Chen LL, Li Y, Guan XY: Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* 2011; 6(9): e24967.
38. Kalluri R, Weinberg RA: The basics of epithelial–mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420-1428.
39. Staudt ND, Maurer A, Spring B, Kalbacher H, Aicher WK, Klein G: Processing of CXCL12 by different osteoblast-secreted cathepsins. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(11): 1924-1935.
40. Larsson O, Girnita A, Girnita L: Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer. *Br J Cancer* 2005; 92(12): 2097-2101.
41. Kraus S, Bunsen T, Schuster S, Cichon MA, Tacke M, Reinheckel T, Sommerhoff CP, Jochum M, Nägler DK: Cellular senescence induced by cathepsin X downregulation. *European Journal of Cell Biology*, 2011; 90: 678-686.
42. C. De Duve: Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* 1983; 37(3): 391-397
43. Klotz C, Ziegler T, Daniłowicz-Luebert E, Hartmann S: Cystatins of parasitic organisms. *Adv Exp Med Biol* 2011; 712: 208-221.
44. Ogrinc T, Dolenc I, Ritonja A, Turk V: Purification of the complex of cathepsin L and the MHC class II-associated invariant chain fragment from human kidney. *FEBS Letters* 1993; 336(3): 555-559.
45. M. Abrahamson, M. Alvarez-Fernandez, Nathanson CM: Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.*, 2003; 70: 179-199.
46. <http://www.jbc.org/content/288/23/17019.full>
47. Kos J, Mitrović A, Mirković B: The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. *Future Medicinal Chemistry* 2014; 6(11): 1355-1371.
48. Wallin H, Bjarnadottir M, Vogel LK, Wasselius J, Ekström U, Abrahamson M: Cystatins-Extra- and intracellular cysteine protease inhibitors: High-level secretion and uptake of cystatin C in human neuroblastoma cells. *Biochimie.* 2010; 92(11): 1625-1634.
49. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132003000100014
50. Turk V, Brzin J, Longer M, Ritonja A, Eropkin M, Borchart U, Machleidt W: Protein inhibitors of cysteine proteinases. III. Amino-acid sequence of cystatin from chicken egg

- white. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1983; 364(11): 1487-1496.
51. Rawlings ND, Barrett AJ: Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J Mol Evol.* 1990; 30(1): 60-71.
52. Turk V, Bode W: The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1991; 285(2): 213-219.
53. Vicik R, Busemann M, Baumann K, Schirmeister T: Inhibitors of cysteine proteases. *Curr Top Med Chem* 2006; 6(4): 331-353.
54. Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM: Cystatins. *Biochemical Society Symposia* 2003; 70: 179-199.
55. Turk V, Stoka V, Turk D: Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Frontiers in Bioscience* 2008; 13: 5406-5420.
56. Brown WM, Dziegielewska KM: Friends and relations of the cystatin superfamily — new members and their evolution. *Protein Science* 1997; 6(1): 5-12.
57. Li Z, Tylor WR, Xu J, Chao J, Hogan EL: Immunohistochemical Localization of Kininogen in Rat Spinal Cord and Brain. *Experimental Neurology*, 1999; 159: 528–537.
58. Perišić-Nanut M, Sabotic J, Jewett A, Kos J: Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. *Front. Immunol.* 2014; 5: 616
59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4668015/>
60. Newman DJ, Thakkar H, Edwards R G, Wilkie M, White T, Grubb AO, Price CP: Serum cystatin C measured by automated immunoassay: A more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney International* 1995; 47(1): 312-318.
61. Vincents B, Vindebro R, Abrahamson M, von Pawel-Rammingen U: The human protease inhibitor cystatin C is an activating cofactor for the streptococcal cysteine protease IdeS. *Chem Biol.* 2008; 15(9): 960-968.
62. Bengtsson E, To F, Håkansson K, Grubb A, Brånén L, Nilsson J, Jovinge S: Lack of the Cysteine Protease Inhibitor Cystatin C Promotes Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2005; 25: 2151-2156.
63. Magister S , Obermajer N , Mirkovic B, Svajger U, Renko M, Softic A, Romih R, Colbert JD , Watts C, Kos J: Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells. *European Journal of Cell Biology* 2012; 91(5): 391-401.
64. Hamilton G, Colbert JD, Schuettelkopf AW, Watts C: Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis. *EMBO Journal* 2008; 27(3): 499-508.

65. Mihelič M, Turk D: Two decades of thyroglobulin type-1 domain research. *Biological Chemistry* 2007; 388(11): 1123-1130.
66. Barrera-Ocampo A, Arlt S, Matschke J, Hartmann U, Puig B, Ferrer I, Zürbig P, Glatzel M, Sepulveda-Falla D, John H: Amyloid- β Precursor Protein Modulates the Sorting of Testican-1 and Contributes to Its Accumulation in Brain Tissue and Cerebrospinal Fluid from Patients with Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2016; 75(9): 903-916.
67. Sage J, Leblanc-Noblesse E, Nizard C, Sasaki T, Schnebert S, Perrier E, Kurfurst R, Brömme D, Lalmanach G, Lecaille F: Cleavage of Nidogen-1 by Cathepsin S Impairs Its Binding to Basement Membrane Partners. *PloS One* 2012; 7(8): e43494.
68. Yi XY, Wayner EA, Kim Y, Fish AJ: Adhesion of cultured human kidney mesangial cells to native entactin: role of integrin receptors. *Cell Adhes. Commun.* 1998; 5(3): 237-248.
69. <https://books.google.co.uk/booksid=SACWPJTtXkoC&pg=PA66#v=onepage&q=role&f=false>
70. Turk D, Guncar G, Turk V: The p41 Fragment Story. *IUBMB Life* 1999; 48:7-12.
71. Mihelic M, Dobersek A, Guncar G, Turk D: Inhibitory Fragment from the p41 Form of Invariant Chain Can Regulate Activity of Cysteine Cathepsins in Antigen. *J Biol Chem* 2008; 283(21): 14453-14460.
72. Bevec T, Stoka V, Pungercič G, Dolenc I, Turk V: Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J Exp Med*, 1996; 183(4): 1331-1338.
73. Galesa K, Pain B, Jongsma MA, Turk V, Lenarcic B: Structural characterization of thyroglobulin type-1 domains of equestatin. *FEBS Lett.* 2003; 539(1-3): 120-124.
74. Pecar-Fonovic U, Kos J: Efficient removal of cathepsin L from active cathepsin X using immunoprecipitation technique. *Acta chimica slovenica*, 2009; 56(4): 985-988.
75. Kuhelj R, Dolinar M, Pungercar J, Turk V: The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *Eur J Biochem* 1995; 229(2): 533-539.
76. Dolinar M, Maganja DB, Turk V: Expression of full-length procathepsin L cDNA in *Escherichia coli* and refolding of the expression product. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1995; 376(6): 385-388.

77. Kos J, Smid A, Krasovec M, Svetic B, Lenarcic B, Vrhovec I, Skrk J, Turk V: Lysosomal proteases cathepsins D, B, H, L and their inhibitors stefins A and B in head and neck cancer. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1995; 376(7): 401-405.
78. Karaoglanovic-Carmona A, Juliano MA, Juliano L: The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2009; 81(3): 381-392.
79. Mahmood T in Yang P: Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012; 4(9): 429-434.
80. Kos J, Štrukelj B: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2007: 143-146, 174.
81. <http://www.proteinatlas.org/learn/method/western+blot>
82. Taniguchi K, Hikiji H, Okinaga T, Nishihara T: Essential Role of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 in the Induction of Macrophage Polarization in PMA-Treated U937 Cells: LPCAT3 regulates M1M2-macrophage polarization. *J Cell Biochem*. 2015; 116(12): 2840-2848.
83. Turk B, Turk D, Salvesen GS: Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr. Pharm. Des.*, 2002; 8: 1623-1637.
84. Atkins KB, Troen BR: Phorbol ester stimulated cathepsin L expression in U937 cells. *Cell Growth Differ*. 1995; 6(6): 713-718.
85. Perrin BJ, Ervasti JM: The Actin Gene Family: Function Follows Isoform. *Cytoskeleton* 2010; 67(10): 630-634.
86. Mahmood T, Yang P. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci* 2012; 4 (9): 429-434.