

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA JUSTIN

**PRIPRAVA, IZOLACIJA IN VREDNOTENJE PROTITELES 1E3 PROTI
(PRO)KATEPSINU S**

**THE PREPARATION , ISOLATION AND EVALUATION OF ANTIBODY 1E3
AGAINST (PRO)CATHEPSIN S**

LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka.

ZAHVALA

Za pomoč pri načrtovanju in izvedbi eksperimentalnega dela, pregled magistrske naloge in njegovo večno prilagodljivost ter spodbudo se iskreno zahvaljujem doc. dr. Bojanu Doljaku.

Zahvale gredo tudi moji družini in fantu, ki so me ves čas študija vzpodbujali in mi stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. Bojana Doljaka.

Mojca Justin

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1 PROTEAZE	1
1.2 CISTEINSKI KATEPSINI	2
1.2.1 Prirojeni imunski odziv	3
1.2.2 Pridobljeni imunski odziv	5
1.3 KATEPSIN S	9
1.3.1 KATEPSIN S IN AVTOIMUNSKÉ BOLEZNI.....	11
1.3.2 KATEPSIN S IN RAZVOJ ATEROSKLEROZE TER ANEVRIZME	12
1.3.3 KATEPSIN S IN RAK.....	13
1.3.4 KATEPSIN S IN BOLEČINA	14
1.3.5 KATEPSIN S KOT DIAGNOSTIČNI IN PROGNOŠTIČNI OZNAČEVALEC ...	15
1.3.6 KATEPSIN S KOT TERAPEVTSKA TARČA	15
2. NAČRT DELA IN HIPOTEZE	16
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 BIOLOŠKI REAGENTI	18
3.1.2 NEBIOLOŠKI REAGENTI.....	19
3.1.3 PUFRI	20
3.1.4 GOJIŠČA	22
3.1.5 LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE.....	22
3.2 METODE	24
3.2.1 GOJENJE HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ.....	24
3.2.2 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTITELES.....	26
3.2.3 TEST ELISA (»Enzyme-linked Immunosorbent Assay«).....	28
3.2.4 TEST AKTIVNOSTI KATEPSINA S	31
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	33
4.1 IZOLACIJA PROTITELES 1E3 PROTI (PRO)KATEPSINU S	33
4.2 ELISA KONCENTRATOV PRIMARNIH PROTITELES	33
4.3 ELISA ZA OCENO UČINKOVITOSTI IZOLIRANIH PROTITELES	35
4.4 TEST ELISA ZA OCENO VPLIVA TEMPERATURE SHRANJEVANJA ANTIGENA NA UČINKOVITOST NJIHOVE VEZAVE S PROTITELESI	36
4.5 MERJENJE KONCENTRACIJE (PRO)KATEPSINA S V SERUMSKIH VZORCIH S TESTOM ELISA	38
4.6 MERJENJE AKTIVNOSTI KATEPSINA S V SERUMSKIH VZORCIH BOLNIKOV Z OKLUZIJO INFRARENALNE AORTE	41

5. SKLEPI	45
6. LITERATURA	46

KAZALO SLIK

Slika 1-1: vloga cisteinskih katepsinov v prirojenem imunskem odzivu.....	5
Slika 1-2: Vloga cisteinskih katepsinov v pridobljenem imunskem odzivu	7
Slika 3-1: Graf rasti celic v celični kulturi.....	25
Slika 3-2: Princip direktnega testa ELISA.....	29
Slika 4-1: Jakost signalov absorbance, merjene pri 450 nm.....	34
Slika 4-2: Primerjava učinkovitosti (jakosti signalov) novo izoliranih Ab z učinkovitostjo Ab, izoliranih leta 2002.....	36
Slika 4-3: Ocena vpliva T shranjevanja Ag na učinkovitost vezave Ag z Ab.....	37
Slika 4-4: Standardna krivulja pri testu ELISA.....	40
Slika 4-5: Primerjava koncentracij (pro)katepsina S pri bolnikih z aterosklerozo in bolnikih z anevrizmo infrarenalne aorte.....	40
Slika 4-6: Graf hitrosti nastanka produkta z encimsko reakcijo vzorcih 1-18.....	42
Slika 4-7: Graf hitrosti nastanka produkta z encimsko reakcijo v vzorcih 19-35.....	43
Slika 4-8: Graf hitrosti nastanka produkta z encimsko reakcijo v vzorcih 36-52.....	43
Slika 4-9: Graf hitrosti nastanka produkta z encimsko reakcijo v vzorcih 53-69.....	44
Preglednica I: Cisteinski katepsini in njihova vloga v imunskem sistemu.	8

OKRAJŠAVE

A	Absorbanca
Ab	Protitelo
Ag	Antigen
AK	Aminokislina
APC	Antigen predstavitvena celica
Asn	Asparagin
BSA	Goveji serumski albumin (»bovine serum albumin«)
C	Koncentracija
CTL	Citotoksični limfociti T
CTSS	Katepsin S
Cys	Cistein
Da	Dalton, enota relativne molekulske mase (1 Da = 1/12 teže ogljikovega izotopa ¹² C)
DC	Dendritične celice
DMEM	Po Dulbeccu modificirano Eaglovo gojišče
DMSO	Dimetil sulfoksid
ECM	Zunajcelični matriks
EDTA	Etilendiaminotetraocetna kislina
ELISA	Encimsko-immunski test na trdni podlagi (»enzyme-linked immunosorbent assay«)
ER	Endoplazemski retikulum
FBS	Fetalni goveji serum (»fetal bovine serum«)
GA	Golgijev aparat
GFR	Hitrost glomerulne filtracije (Glomerul filtration rate)
His	Histidin
HRP	Hrenova peroksidaza
IL	Interlevkin

KOPB	Kronična obstruktivna pljučna bolezen
mAb	Monoklonsko protitelo
MHC II	Molekula poglobitnega histokompatibilnega sistema razreda II
Mr	Relativna molekulska masa
NK	Naravne celice ubijalke (natural killer cells)
PBS	Fosfatni pufer z dodatkom NaCl (»phosphate buffered saline«)
PEG	Polietilenglikol
RA	Revmatoidni artritis
TLR	Toll-u podobni receptorji
TMB	3,3', 5, 5' -tetrametil-benzidin
TNF	Tumor-nekrotski faktor
Tris	2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol
Z-VVR-AMC	benziloksikarbonil-valin-valin-arginin-7-amino-4-metilkumarin

POVZETEK

Katepsin S je lizosomski encim iz skupine peptidaz. Spada v družino cisteinskih proteaz in sodeluje pri razgradnji proteinov do krajših peptidov in aminokislin. Pomembno vlogo ima pri predstavitvi antigenov z molekulami MHC II na površini antigen predstavitevnih celic. Razgradi invariantno verigo (Ii) in s tem omogoči vezavo antigenskega peptida na molekulo MHC II in potovanje na površino celice. Izražajo ga predvsem antigen predstavitvene celice kot so makrofagi, dendritične celice, limfociti B in celice mikroglije. Za razliko od ostalih lizosomskih proteaz je katepsin S aktiven tudi v okolju z nevtralnimi pH-jem, kar mu omogoča delovanje izven lizosoma. Spremenjeno izražanje katepsina S povezujejo s številnimi patološkimi stanji kot so avtoimunske bolezni, rak, kardiovaskularne bolezni in diabetes. Katepsin S je tako potencialni diagnostični in prognostični biomarker.

V magistrski nalogi smo pripravili in izolirali monoklonska protitelesa proti (pro)katepsinu S. Hibridomske celice 1E3 smo namnožili v celični kulturi, nato pa izolirali protitelesa s postopki grobe in fine filtracije ter afinitetne kromatografije. Izolirana protitelesa smo skoncentrirali na ultrafiltru in določili njihovo koncentracijo. Učinkovitost protiteles smo preverili s testom ELISA in jo primerjali z učinkovitostjo protiteles, izoliranih leta 2002. Nato smo v serumskih vzorcih 69 bolnikov z okluzijo infrarenalne aorte izmerili koncentracijo in aktivnost (pro)katepsina S. Polovica bolnikov je imela aterosklerozo, druga polovica pa anevrizmo infrarenalne aorte. Z direktnim testom ELISA smo določali koncentracije (pro)katepsina S v vzorcih, kjer smo spektrofotometrično merili pretvorbo substrata TMB v produkt. Na istih serumskih vzorcih smo izmerili tudi aktivnost katepsina S. Primerjali smo vrednosti koncentracij in aktivnosti med obema skupinama bolnikov. Dobljeni rezultati niso pokazali pomembnih razlik v koncentraciji in aktivnosti (pro)katepsina S med skupino bolnikov z anevrizmo in skupino bolnikov z aterosklerozo infrarenalne aorte, čeprav smo pri bolnikih z anevrizmo infrarenalne aorte pričakovali višje vrednosti kot pri bolnikih z aterosklerozo. Rezultati kljub temu predstavljajo pomemben prispevek k nadaljnjim študijam. Protitelesa ki smo jih izolirali, so pripravljena za nove klinične študije.

ABSTRACT

Cathepsin S is a lysosomal protease and is a member of the cysteine cathepsin protease family. It promotes degradation of proteins to small peptides or amino acids. It has a role in MHC class II antigen presentation, where it is important in the degradation of the invariant chain. Cathepsin S is mostly expressed in antigen presenting cells (APC), such as macrophages, dendritic cells, lymphocytes B and microglial cells. In comparison to other cysteine cathepsins, cathepsin S is more stable at a neutral pH and has more restricted tissue expression. Mis-regulation in expression of cathepsin S leads to different pathologies, such as autoimmune diseases, cancer, cardiovascular diseases and diabetes. Cathepsin S has a potential as a prognostic and diagnostic marker in those diseases.

We prepared and isolated monoclonal antibodies 1E3 against (pro)cathepsin S from hybridoma cell line 1E3. We replicated hybridoma cells in cell culture and isolated them with filtration techniques and affinity chromatography. Then we determined the concentration of isolated antibodies and checked their ability to recognise the antigen with the ELISA test. We compared their ability to recognise the antigen with antibodies which were prepared in 2002. Later we determined the concentration and activity of (pro)cathepsin S in 69 serum samples from patients with occlusion of infrarenal aorta. Half of the patients had atherosclerosis and half of them had aneurism of infrarenal aorta. Concentration of (pro)cathepsin S was measured by the direct ELISA test using the chromogen substrate TMB. With the same serum samples we measured the activity of (pro)cathepsin S using the kinetic enzyme test. Finally, we compared the concentration and activity of the (pro)cathepsin S between the groups of patients. Our results showed no significant difference in concentration and activity of (pro)cathepsin S between the two groups even though we expected higher levels of (pro)cathepsin S in patients with aneurism than in patients with atherosclerosis. The results are still a good contribution to forthcoming studies in the field. The antibodies isolated in the present study are ready to be used in the future clinical studies.

1. UVOD

1.1 PROTEAZE

Proteaze so skupina encimov, imenovana tudi peptidaze, proteinaze ali proteolitični encimi, ki katalizirajo razgradnjo proteinov do manjših peptidov ali aminokislinskih ostankov. Poleg vloge v katabolizmu beljakovin, se proteaze vključujejo v številne fiziološke procese v organizmu kot so celično signaliziranje, regulacija aktivnosti proencimov in pro-hormonov, predstavitev antigenov (Ag), razgradnjo in preoblikovanje zunajceličnega matriksa (ECM), kaskado strjevanja krvi, delovanje imunskega sistema, preoblikovanje kostnega tkiva, ovulacijo in procese programirane celične smrti (apoptoza) (1, 2). Biološki procesi, pri katerih sodelujejo, so zaradi ireverzibilnosti proteolize strogo nadzorovani. Regulacija lahko poteka na več načinov in sicer na ravni transkripcije, z inhibicijo njihove aktivnosti s proteaznimi inhibitorji in s post-translacijskimi modifikacijami (3, 4). Motnje v regulaciji aktivnosti proteaz vodijo v številne patološke procese. Med njimi je moteno signaliziranje med celicami, spremenjeno izražanje citokinov, neoangiogeneza, motena obnova tkiva in apoptoza (5). Prav zaradi njihove vpletenosti v številne patološke procese, so proteaze postale pomembna tarča zdravilnih učinkovin za zdravljenje raka, avtoimunskih in drugih vnetnih bolezni, srčno-žilnih in nevrodegenerativnih bolezni, uveljavljajo pa se tudi kot prognostični in diagnostični biološki označevalci (6).

Proteaze uvrščamo v encimski razred hidrolaz. Za nukleofilni napad na karbonilno skupino v peptidni vezi proteina uporabljajo molekule vode. Glede na mesto cepitve peptidne vezi jih ločimo na ekso in endopeptidaze. Eksopeptidaze delimo glede na mesto njihovega delovanja na amino in karboksipeptidaze. Katalizirajo lahko cepitev ene (monopeptidaze), dveh (dipeptidaze), treh (tripeptidaze) ali več aminokislin na koncu peptida. Endopeptidaze delimo na osnovi njihovega katalitičnega mehanizma na serinske, cisteinske, aspartatne, treoninske in metaloendopeptidaze. Proteaze so po sodobnem sistemu klasifikacije proteaz (baza MEROPS) razdeljene na osnovi njihove strukture in katalitičnega mehanizma v družine in klane. Vsaka družina proteaz je poimenovana s črko, ki predstavlja enega izmed petih katalitičnih mehanizmov (C-cisteinske proteaze, S-serinske proteaze, T-treoninske proteaze, A-aspartatne proteaze, M-metaloproteaze in U-neznan mehanizem), ki ji je

arbitrarno dodana številka (7, 8). Klan predstavlja družine, katerih člani imajo skupnega prednika. Med evolucijskim razvojem je prišlo do sprememb v celotnem ali delnem aminokislinskem zaporedju, ki je odgovorno za katalitsko aktivnost. Podobnosti med encimi istega klana vidimo predvsem v njihovi terciarni strukturi, lahko pa tudi v položaju aminokislin v aktivnem mestu encima (7, 8, 2). Klan je poimenovan s črko, ki predstavlja katalitični mehanizem encima (enako kot pri družini) in dodatno črko, ki si sledijo po abecedi (7).

1.2 CISTEINSKI KATEPSINI

Katepsini so raznolika skupina proteolitičnih encimov. Pri človeku je poznanih 15 katepsinov, ki so razdeljeni v tri skupine, glede na aminokislinski ostanek, ki sodeluje pri katalizi v aktivnem mestu. Katepsina A in G spadata v skupino serinskih proteaz, katepsina D in E v razred aspartatnih proteaz ter katepsini S, B, C, F, H, K, L, O, V, W in X v razred cisteinskih proteaz. Cisteinski katepsini so glede na njihovo proteolitično aktivnost razdeljeni na endo in eksopeptidaze. Katepsini S, K, V, F in L imajo endopeptidazno aktivnost, katepsini B, H, X in C pa imajo tako endo kot tudi eksopeptidazno aktivnost (9). Papain je bil prvi znani encim, ki so ga uvrstili v razred cisteinskih proteaz, družino C1 in klan CA (7). Cisteinski katepsini so monomerni proteini z molekulsko maso 22-18 kDa in imajo dve domeni. V eni prevladujejo α -vijačnice, v drugi pa β -strukture. Interakcije med domenama so hidrofilne in hidrofobne narave ter so specifične za vsak katepsin posebej. Izjema je katepsin C, ki je tetramer in ima Mr 200 kDa. Substrat se v aktivno mesto, ki ga tvorita Cys in His, veže v raztegnjeni konformaciji (10).

Tako kot aktivnost ostalih proteaz, je tudi aktivnost cisteinskih katepsinov strogo nadzorovana na različnih ravneh (11). Sintetizirajo se v obliki pre-proencima. Vsebujejo propeptidno domeno, ki zakrije aktivno mesto encima in s tem reverzibilno inhibira aktivnost encima (12). Razgradnja propeptida in aktivacija encima ponavadi potekata v lizosomih s pomočjo drugih aktivnih proteaz ali pa avtokatalitično pod določenimi pogoji, kot so kisli pH ali prisotnost glikozaminoglikanov (13). Katepsini se večinoma nahajajo v lizosomih, ki so glavni razgradnji organi v evkariontski celici. Nekatere celice, predvsem celice hematopoetskega sistema, vsebujejo posebne lizosomske predelke, ki lahko izločajo svojo vsebino v zunajcelični prostor kot odgovor na zunaj-celične signale (14). Take

lizosome imenujemo sekretorni lizosomi in vsebujejo litične granule, predelke z molekulami poglavitnega histokompatibilnega sistema razreda II (MHC II), bazofilne in azurofilne granule ter številne proteolitične encime (15). pH v lizosomih je kisel, kar omogoča stabilnost proteaz. Aktivnost zrelih katepsinov regulirajo njihovi endogeni inhibitorji cistatini, stefini, tropini in serpini. Tesno se povežejo z encimom in preprečijo hidrolizo substrata (16).

Cisteinski katepsini imajo različno tkivno specifičnost. Katepsini B, C, F, H, L in X se nahajajo v vseh vrstah celic, drugi pa so bolj tkivno-specifični. Katepsin S se nahaja v antigen predstavitvenih celicah (APC), kjer poteka predstavitev antigenov z molekulami MHC II. Katepsin K je pretežno izražen v epitelnih celicah ter osteoklastih in je pomemben člen v resorpciji kostnega tkiva. Katepsin V se izraža v priželjcu, testisih in roženici, katepsin W pa izključno v naravnih celicah ubijalkah (NK) ter CD8⁺ citotoksičnih limfocitih T (17). Različna stopnja izražanja katepsinov v določenem tkivu kaže na to, da imajo določeni katepsini specifične biološke naloge (18). Poleg njihove vloge v recikliranju proteinov, imajo cisteinski katepsini pomembno vlogo v prirojenem in pridobljenem imunskem sistemu, kot je povzeto v tabeli 1-1.

1.2.1 Prirojeni imunski odziv

Cisteinski katepsini sodelujejo v okviru prirojene imunosti v različnih procesih, kot ji prikazuje slika 1-1.

a) Apoptoza vnetnih celic

Po vstopu Ag v telo pride do premika imunskih celic na mesto vdora Ag in nastanka vnetja. Vnetne celice (nevtrofilci, eozinofilci) v okolje sproščajo toksične snovi ter s tem poškodujejo tudi okoliško tkivo. Da se prepreči prevelika poškodba okoliškega tkiva, se sproži proces apoptoze vnetnih celic, ki jih nato fagocitirajo fagociti. Osrednji element apoptoze je proteolitična kaskada, ki vključuje posebne proteaze, imenovane kaspaze. Poleg kaspaz pri regulaciji celične smrti sodelujejo tudi cisteinski katepsini (19). Katepsin B je en izmed cisteinskih katepsinov, ki ima pomembno vlogo v procesu apoptoze nevtrofilcev. V citosol se sprošča ob prisotnosti reaktivnih kisikovih radikalov in povzroči cepitev pro-apoptotičnega proteina Bid, ki spada v družino Bcl-2. Ta aktivira BAX protein,

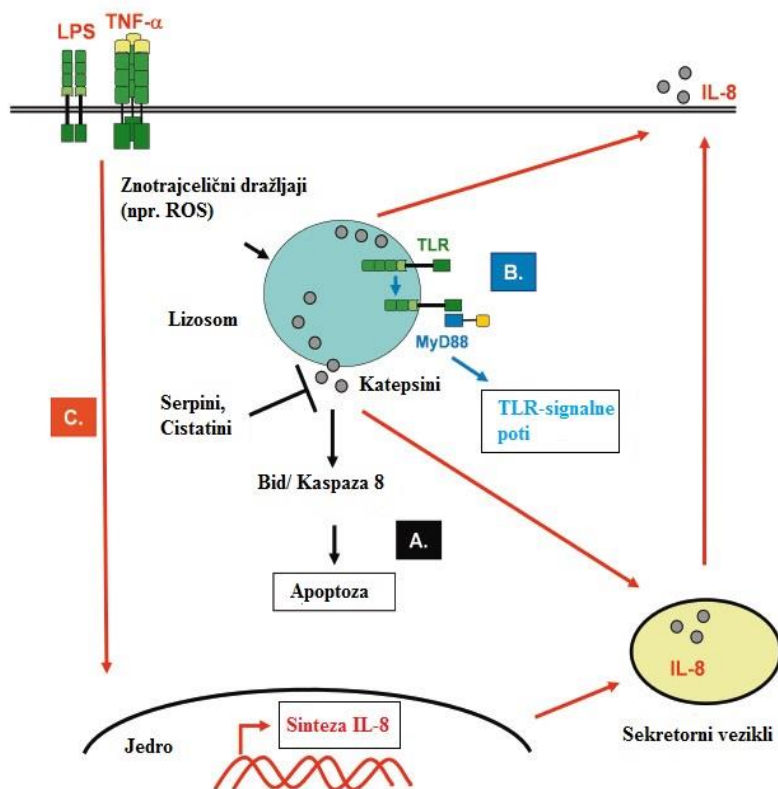
ki je prav tako član družine Bcl-2, in povzroči spremembe v membrani mitohondrija ter aktivacijo kaspaz (20).

b) Signaliziranje preko Toll-u podobnih receptorjev

Toll-u podobni receptorji (TLR) 3, 7, 8 in 9 so izraženi na celičnih membranah in membranah endosoma ter prepoznajo nukleinske kisline mikrobov, ki jih fagocitirajo imunske celice. Aktivacija receptorjev povzroči sintezo vnetnih citokinov in aktivacijo pridobljenega imunskega odziva. Cisteinski katepsini katalizirajo proteolitično cepitev, potrebno za aktivacijo TLR7 in TLR9. Le aktivirani receptor lahko aktivira eno od štirih adapterskih molekul, diferenciacijski mieloidni protein 88 (MyD88) v citoplazmi. Ta prenese signal ter aktivira jedrni transkripcijski dejavnik κ B (NF κ B), ki povzroči prepis genov za vnetne citokine (predvsem TNF in IL-1G) (21).

c) Sinteza in aktivnost citokinov

Dokazano je bilo, da aktivnost cisteinskih katepsinov neposredno aktivira ali inhibira določene citokine, ki imajo pomembno vlogo v vnetnih odzivih. Katepsin L v človeških fibroblastih poveča aktivnost interleukina-8 (IL-8), ki je vnetni citokin in močan aktivator kemotakse nevtrofilcev. Katepsin B sodeluje v posttranslacijski modifikaciji tumor-nekrotskega faktorja-alfa (TNF- α), ki ima pomembno vlogo pri odzivu na lipopolisaharid (LPS), sestavni del bakterijske celične stene. (18, 22). Oba cisteinska katepsina sta pomembna regulatorja prirojenega imunskega odziva in predstavljata potencialno tarčo za zdravljenje različnih vnetnih bolezni.



Slika 1-1: vloga cisteinskih katepsinov v prirojenem imunskem odzivu. A) nastanek z lizosomi posredovane apoptoze preko aktivacije pro-apoptotičnega proteina Bid in kaspaz. B) aktivacija TLR receptorjev. Aktiviran TLR aktivira myD88, ki prenese signal do jedra in aktivira transkripcijski dejavnik NFκB. Pride do prepisa genov za vnetne citokine C) vpliv na sintezo vnetnih citokinov.

1.2.2 Pridobljeni imunski odziv

Katepsini imajo pomembno vlogo tudi v pridobljenem imunskem odzivu, kot je prikazano na sliki 1-2.

a) Predelava in predstavitev Ag

Specifični pridobljeni imunski odziv je odvisen od predelave tujih peptidov in njihove predstavitve na molekulah poglobitnega histokompatibilnega kompleksa razreda I ali II (MHC I, II). Pri tem sodelujejo endosomalne proteaze, ki se nahajajo v antigen predstavitvenih celicah (APC) kot so dendritične celice (DC) in makrofagi. Proteaze razgradijo zunajcelične proteine, ki pridejo v APC s fagocitozo, v manjše peptide, ki so primerne velikosti za vezavo na MHC II in predstavitev CD4⁺ limfocitom T. Imajo tudi sposobnost odstranitve invariantne verigo (Ii) z MHC II, ki preprečuje vezavo peptida (23).

Proteaze in njihovi inhibitorji so verjetno glavni selektorji repertoarja kompleksov peptid-MHC II (24). Največjo vlogo pri tem ima katepsin S, ki je opisan v poglavju 1.3.

b) Citokini

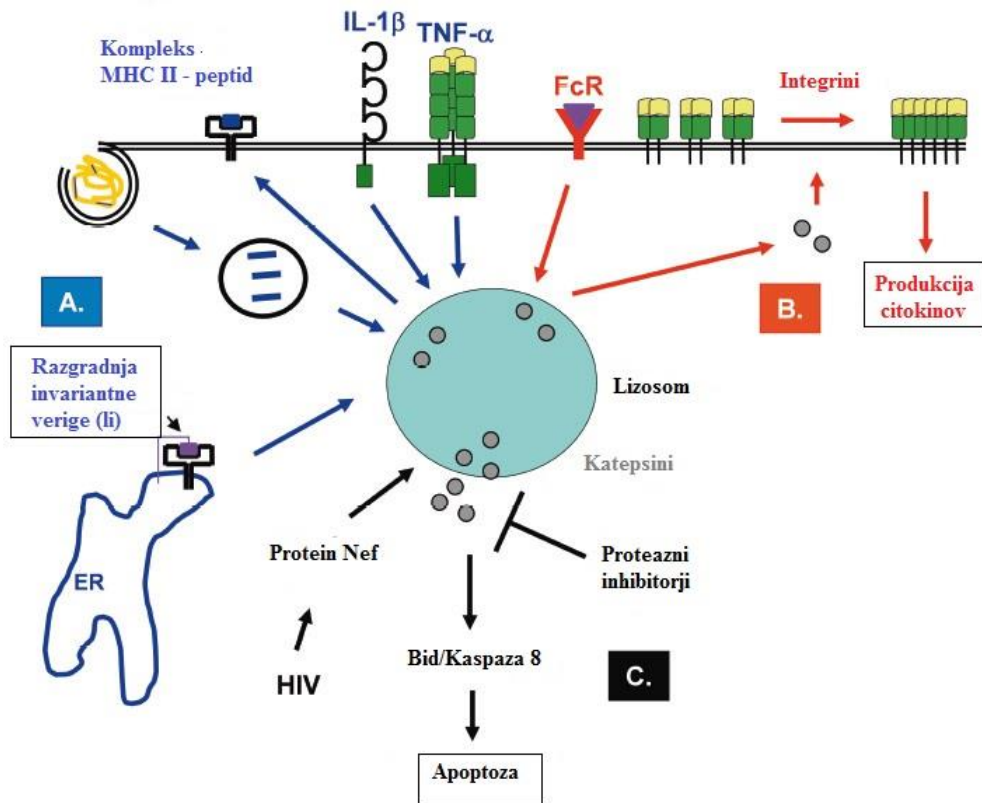
Določeni citokini regulirajo aktivnost lizosomskih proteaz. TNF- α in IL-1 β povečata aktivnost katepsina S in B v humanih DC in s tem vplivata na predstavitev Ag z MHC II (25). IL-6 in IL-10 povečata aktivnost številnih katepsinov, tudi katepsina S, in izboljšata predstavitev Ag z MHC II. Vezava imunskih kompleksov na Fc receptor povzroči konformacijsko spremembo membranskega receptorja β -integrina. S tem se poveča afiniteta integrina za vezavo liganda. Katepsini preko še nepojasnjenega mehanizma preidejo iz citosola do tarčnega integrina na membrani. Preureditev integrinskega citoskeleta in vezava liganda omogočita povezovanje integrinskih molekul in sintezo citokinov (18).

c) Aktivacija granul serinskih proteaz

Katepsin C je vključen v aktivacijo progranucimov A in B v aktivna grancima v celicah NK in limfocitih T. Grancima A in B sta naravni serinski proteazi, ki se nahajata v celicah NK in citotoksičnih limfocitih T (CTL). Vključena sta v apoptozo tarčne celice, ki nastane zaradi od Ca²⁺ odvisnega sproščanja litičnih granul, ki vsebujejo grancime in perforine (26).

d) Z lizosomi posredovana apoptoza

Apoptoza imunskih celic je pomemben mehanizem regulacije ustreznega imunskega odziva. Ob različnih signalih se katepsini sprostijo v citosol, kjer inducirajo proteolizo različnih tarč (npr. kaspaze-8, Bid ali drugih pro-apoptotskih članov družine Bcl-2), in s tem aktivirajo encimsko kaskado, ki vodi v apoptozo. Aktivnost katepsinov v citosolu regulirajo proteazni inhibitorji. Apoptozo, posredovano s katepsini, lahko sprožijo tudi nekateri znotrajcelični patogeni, npr. virus HIV v celicah CD4⁺. Ta preko proteina Nef povzroči sproščanje katepsinov B in D (27).



Slika 1-2: Vloga cisteinskih katapsinov v pridobljenem imunskem odzivu. A - cisteinski katapsini razgradijo invariantno verigo na MHC II in s tem omogočijo predstavitev Ag na MHC II, APC. B - vezava imunskega kompleksa na FcR povzroči konformacijsko spremembo integrinskega receptorja in sproščanje katapsinov iz lizosomov. Na integrinski receptor se lahko vežejo ligandi, kar povzroči prepis genov za vnetne citokine. C - nastanek z lizosomi posredovane apoptoze preko aktivacije pro-apoptotičnega proteina Bid in kaspaz.

Preglednica I: Cisteinski katepsini in njihova vloga v imunskem sistemu.

KATEPSIN	PORAZDELITEV V TKIVIH	VLOGA	VKLJUČENOST V BOLEZNI
Katepsin B	nespecifična	TLR signaliziranje, produkcija TNFalfa, apoptoza nevtrofilcev, limfocitov B in T	vnetne bolezni, Alzheimerjeva bolezen, rak
Katepsin C	nespecifična	aktivacija grancimov	vnetne bolezni
Katepsin F	nespecifična	TLR signaliziranje	rak
Katepsin H	nespecifična	razgradnja ZCM	rak
Katepsin K	epitelne celice, DC, osteoklasti	TLR signaliziranje, razgradnja ECM, kostna remodelacija	revmatoidni artritis
Katepsin L	nespecifična	TLR signaliziranje, razgradnja kosti, CD 4 in NK sinteza, selekcija kompleksa MHC II-peptid	ateroskleroza, revmatoidni artritis, rak
Katepsin S	APC	selekcija kompleksa MHC II-peptid, TLR signaliziranje, razgradnja ECM, sinteza NK	artritis, ateroskleroza, astma, KOPB, psoriza, rak
Katepsin V	nespecifična	selekcija kompleksa MHC II-peptid, sinteza NK in CD 4 T celic	patologija priželjca, rak
Katepsin W	NK, CD8 ⁺ citotoksične T celice	selekcija kompleksa MHC II-peptid	avtoimunski atrofični gastritis
Katepsin X	nespecifična	aktivacija limfocitov T	rak

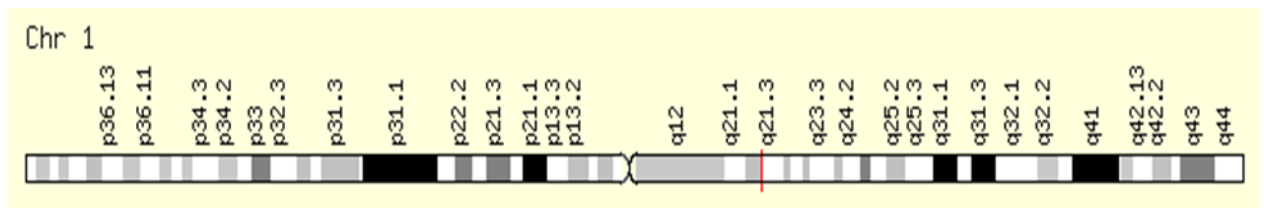
Cisteinski katepsini so povezani s številnimi patološkimi stanji kot so avtoimunske, kardiovaskularne in nevrodegenerativne bolezni ter rak. Odkrili so tudi nekaj genetskih

bolezni, povezanih z okvarami genov za katepsine. Piknodisostoza je redka avtosomno recesivna bolezen, za katero je značilno pomanjkanje katepsina K v osteoklastih in je povezana z hudimi nepravilnostmi v kostni resorpciji. Vzrok je mutacija gena za katepsin K, ki se nahaja na prvem kromosomu (28). Papiilon-Lefevre sindrom je avtosomno recesivna bolezen, ki nastane zaradi mutacije v genu za katepsin C in povzroči pomanjkanje tega encima. Posledici sindroma sta peridontitis in palmoplantarna keratoderma (29).

1.3 KATEPSIN S

Katepsin S (CTSS) je cisteinska proteaza in je za razliko od drugih cisteinskih katepsinov bolj tkivno specifičen. Nahaja se v APC (makrofagih, DC, limfocitih B in celicah mikroglije), izraža se tudi v nekaterih epitelnih celicah in keratinocitih. Njegova posebnost je, da ohrani aktivnost tudi pri nevtralnem pH (30). Zaradi stabilnosti pri nevtralnem pH je vključen tudi v zunajcelične proteolitične procese (31).

Katepsin S kodira gen CTSS, ki se nahaja na kromosomu 1q21 (slika 1-3). Sestavljen je iz 6 eksonov in 6 intronov. Gen sestavlja 35 762 baznih parov. Sintetizira se v obliki preproencima, v ribosomih. Po vstopu v lumen endoplazmatskega retikuluma (ER) se signalni peptid odcepi. Proencim se nadalje procesira v golgijevem aparatu (GA) z modifikacijo manoznih ostankov v manozna-6-fosfat. Modificirani prokatepsini se nato vežejo na manozna-6-fosfatni receptor in transportirajo do lizosomov. Tam se proencim avtokatalitično aktivira pri pH 4,5 s cepitvijo propeptida na N-koncu. Zreli katepsin S je globularni monomerni protein, sestavljen iz dveh polipeptidnih verig z molekularno maso okoli 24 kDa. Ima dve domeni, 426 AA in štiri disulfidne vezi (Cys12/Cys110, Cys22/Cys66, Cys56/Cys99, Cys158/Cys206). Cys25, His164 in Asn184 tvorijo katalitično triado in sodelujejo pri hidrolizi substrata (31).

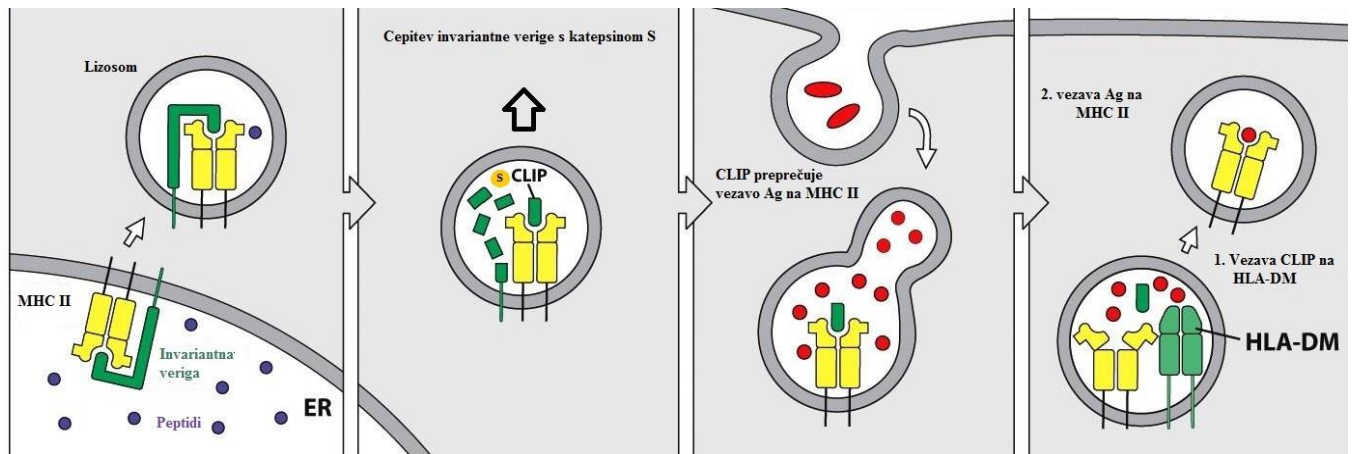


Slika 1-3: gen CTSS. Gen ki kodira katepsin S se nahaja na kromosomu 1q21.

Študije so pokazale, da propeptidna inhibitorna domena služi tudi kot šaperon, ki pomaga pri pravilnem zvitju proteina (32). Manjši delež populacije katepsina S se ne transportira do lizosomov, ampak se izloča direktno v zunajcelični prostor kot prokatepsin S (33).

Zrel in aktivni katepsin S se iz lizosomov izloča v zunajcelični prostor preko od Ca^{2+} odvisne fuzije lizosoma s plazemsko membrano (34).

Aktivni katepsin S ima sposobnost razgradnje proteinov bazalne membrane (hondroitin sulfat, heparan sulfat, proteoglikani) in komponent ECM (laminin, fibronektin, elastin, osteokalcin in kolagen). Zaradi sposobnosti razgradnje elastina in kolagena pomembno prispeva k povečani prepustnosti žilne stene in angiogenezi (35). Poleg razgradnje proteinov sodeluje tudi v imunskem sistemu. Ima kritično vlogo pri predstavitvi Ag z MHC II na APC (slika 1-4). MHC II je heterodimer, sestavljen iz alfa in beta verige. Nahaja se le na APC in veže zunajcelične proteine. Na vezavno mesto na molekuli se veže invariantna veriga (Ii), ki preprečuje vezavo znotrajceličnih proteinov na kompleks. V lizosomu katepsin S razgradi invariantno verigo, ostane le majhen delček verige imenovan CLIP. Ta preprečuje vezavo lastnih znotrajceličnih peptidov na kompleks. V prisotnosti zunajceličnih antigenskih peptidov se na molekulo MHC II veže HLA-DM in s tem sprostijo CLIP iz molekule. Antigenski peptid se sedaj lahko veže na MHC II, kompleks pa potuje na površino APC (36). Zaradi njegove vloge pri predstavitvi Ag, je katepsin S postal potencialna tarča v zdravljenju avtoimunskih bolezni kot so lupus, revmatoidni artritis (RA) in multipla skleroza.



Slika 1-4: vloga katepsina S pri predstavitvi Ag z MHC II. 1. Na MHC II je vezana invariantna veriga, ki preprečuje vezavo Ag na MHC II. 2. V lizosomu katepsin S razgradi invariantno verigo, na MHC II ostane vezan le CLIP, ki preprečuje vezavo lastnih znotrajceličnih peptidov na MHC II. 3. Ob vstopu Ag v celico se na MHC II veže HLA-DM. CLIP se odcepi z MHC II in veže na HLA-DM. Ag se sedaj lahko veže na MHC II. Kompleks potuje na površino APC.

Spremenjeno izražanje, aktivnost, nesorazmerje med količino encima in njegovega inhibitorja ter sprememba lokacije katepsina S, povzročajo številna patološka stanja (37). Katepsin S, ki se izloča iz tkivnih makrofagov, je vpleten v razgradnjo ECM in prispeva k nastanku bolezni kot so ateroskleroza, artritis, bronhialna astma in kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB) (38).

1.3.1 KATEPSIN S IN AVTOIMUNSKÉ BOLEZNI

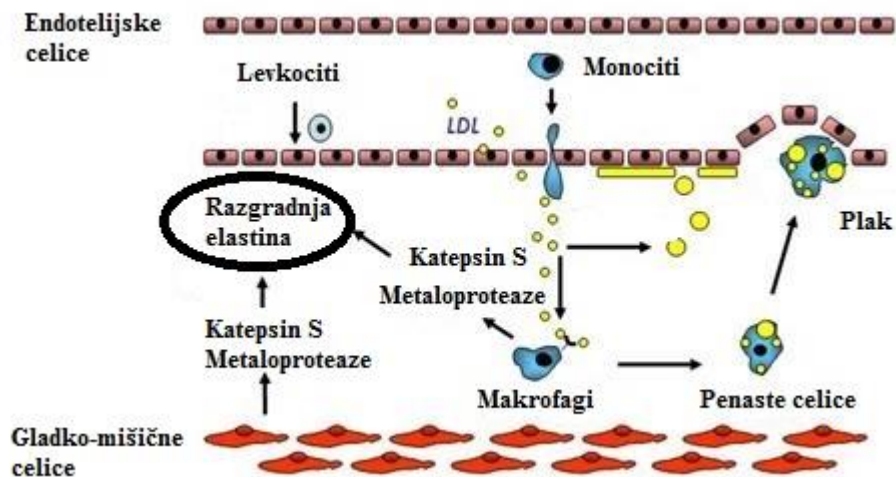
Avtoimunske bolezni so skupina bolezni, ki nastanejo kot posledica prekinitve normalnih mehanizmov, ki vzdržujejo toleranco do lastnega. To vodi v reakcije organizma proti lastnim celicam in tkivom. Katepsin S predstavlja potencialno tarčo v zdravljenju različnih avtoimunskih bolezni. Sintetizira se kot odgovor na vnetne mediatorje, njegovo pomanjkanje pa oslabi predstavitev Ag z MHC II. Revmatoidni artritis (RA) je kronična vnetna bolezen, za katero je značilna razgradnja kosti in hrustanca ter prizadene predvsem male sklepe rok, zapestja in kolena. Razgradnja kosti in hrustanca pri RA je posledica povečane aktivnosti številnih proteaz kot so metalo in cisteinske proteaze, ki jih sproščajo različne celice v hrustancu. Proteaze so vključene tudi v nastanek vnetne reakcije, ki je značilna za RA. Številne klinične raziskave so dokazale povišano izražanje cisteinskih proteaz, tudi katepsina S, v sinovijski membrani in serumu bolnikov z RA. Natančna vloga

katapsina S in ostalih cisteinskih proteaz še ni dokončno raziskana (39). Multipla skleroza je prav tako vnetna avtoimunska bolezen, pri kateri lastni imunski sistem napade mielinsko ovojnico nevronov v možganih in hrbtenjači. Demielinizacija povzroči propad nevronov. Glavni proces pri demielinizaciji je proteolitična razgradnja mielinskega bazičnega proteina (MBP), ki je sestavni del mielina. V njegovo razgradnjo je vpleten katapsin S (40). Pomemben dejavnik pri preučevanju povečane ravni proteaz je upoštevanje razmerja med proteazami in njihovimi inhibitorji, ki je pri številnih boleznih spremenjeno.

1.3.2 KATEPSIN S IN RAZVOJ ATEROSKLEROZE TER ANEVRIZME

Ateroskleroza je vnetna bolezen, za katero je značilna obsežna preureditev strukture ECM v arterijski steni (slika 1-5). Proteoliza proteinov ECM rezultira v premiku mononuklearnih levkocitov iz žilnega lumna v subendotelij ter pomiku gladkomišičnih celic iz tunike medie v intimo. To je pomemben proces v patogenezi ateroma, v katerem sodelujejo zunajcelične proteaze, predvsem metalo in serinske proteaze. Novejše študije nakazujejo, da so v nastanek ateroskleroze vpletene tudi nekatere cisteinske proteaze kot je katapsin S, ki ima sposobnost razgradnje elastina in kolagena. Izražanje katapsina S je povečano pri bolnikih z aterosklerozo v primerjavi z zdravimi, hkrati pa je zmanjšano izražanje njegovega inhibitorja cistatina C. Katapsin S se izraža v številnih celicah, ki jih najdemo v ateromu. Izražajo ga makrofagi v intimi, prav tako gladko mišične celice v tuniki medii. *In vitro* študije so pokazale povečano sproščanje aktivnega katapsina S iz celic ob njihovi izpostavitvi vnetnim citokinom (IL-1beta, TNF-alfa, interferon gama) v ateromu (41).

Povišano raven katapsina S in zmanjšano raven cistatina C povezujejo tudi z nastankom anevrizme trebušne aorte, za katero je značilna obsežna razgradnja elastina in kolagena v žilni steni, invazija vnetnih celic in apoptoza gladkomišičnih celic. Najpogosteje se razvije iz aterosklerotične žile. Koncentracije metalo, serinskih in cisteinskih proteaz so v steni anevrizme bistveno višje kot pri aterosklerozi. Izločajo jih gladkomišične celice, fibroblasti, makrofagi in endotelne celice (42).



Slika 1-5: Vpletenost katepsina S v nastanek ateroskleroze. Katepsin S izločajo makrofagi in gladkomišične celice. Tako kot metaloproteaze sodeluje pri razgradnji elastina. Posledica je premik gladko-mišičnih celic iz tunike medie v intimo in premik mononuklearnih levkocitov iz žilnega lumna v subendotelij, kjer fagocitirajo LDL delce. Nastanejo penaste celice.

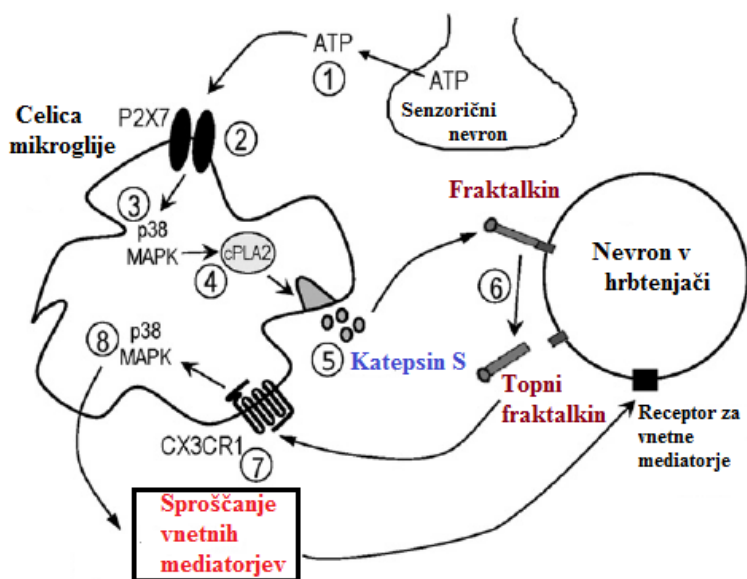
1.3.3 KATEPSIN S IN RAK

Proteaze sodelujejo pri nastanku raka preko različnih mehanizmov, kot so obnova tkiva, neoangiogeneza in sinteza citokinov. Dokazano je, da ima katepsin S pomembno vlogo pri angiogenezi. Sodeluje pri nastanku pro-angiogenega dejavnika gama2 iz anti-angiogenega peptida laminina-5 in pri nastanku endostatina iz NC-1 domene kolagena tipa XVII (43). Raziskave vloge katepsina S na modelih so razkrile, da izbitje gena za katepsin S ne zmanjša le procesa angiogeneze, ampak tudi velikost in invazijo tumorja (44). Inhibicija katepsina S s specifičnim monoklonskim protitelesom (mAb) Fsn0503 je pokazala zmanjšanje in napredovanje tumorskih celic pri raku dojke, prostate in črevesja. Inhibicija katepsina S s Fsn0503 in vivo je pokazala precejšnje zmanjšanje rasti tumorja tudi v modelih raka debelega črevesja in danke (45). Velik vir katepsina S v tumorjih so s tumorjem povezani makrofagi (tumour associated macrophages-TAMs). Študije na modelih raka debelega črevesja in danke (MC38) so pokazale, da tako tumor sam kot s tumorji povezane celice, v tumorsko okolje izločajo proteaze (46). Te ugotovitve je potrdila študija na modelu celične linije invazivnega metastatskega raka dojke. V isti študiji so dokazali vlogo katepsina S v nastanku metastaz v možganih. Sodeloval naj bi v procesiranju adhezijske molekule JAM-B v krvno-možganski pregradi in s tem omogočil

vstop tumorskih celic v možgane. Inhibicija katepsina S na istem modelu je pomembno zmanjšala nastanek metastaz v možganih. Katepsin S se je tako pokazal kot potencialna tarča za preprečevanje nastanka sekundarnih tumorjev (47).

1.3.4 KATEPSIN S IN BOLEČINA

Kronična bolečina je bolečina, ki je lahko posledica dolgotrajnega draženja nociceptorjev (prosti živčni končiči, morfološko najmanj zapleteni receptorji v somatskem živčnem sistemu) zaradi stalnega patološkega procesa v njihovi okolici (govorimo o nociceptivni bolečini) ali poškodb živčnih poti (nevropatska bolečina). Meje ločevanja obeh tipov bolečin so zelo ozke, bolniki lahko trpijo za obema hkrati. Pri poškodbi začnejo celice mikroglije v centralnem živčnem sistemu sproščati provnetne dejavnike (48). Fraktalkin je glavni bolečinski kemokin. Je transmembranski protein, sintetiziran v nevronih. Po odcepitvi z membrane nevrona, se veže na receptor CX3CR1, ki je prisoten na zunanji membrani celic mikroglije. Katepsin S se povečano sprošča iz celic mikroglije pri poškodbi perifernega živca. Cepi membransko vezan fraktalkin in s tem omogoči nastanek bolečinskega signala (slika 1-6). Ugotovili so, da cepi tudi protease-activated-receptor 2 (PAR-2), ki je receptor na nociceptivnih nevronih, in ga s tem aktivira. Aktiviran receptor sproži številne znotrajcelične procese, ki vodijo v nastanek vnetja in bolečine (49).



Slika 1-6: vloga katepsina S pri nastanku bolečine. Katepsin S sodeluje pri odcepitvi molekule fraktalkina na membrani nevrona. Po odcepitvi z membrane nevrona

se veže na receptor CX3CR1, ki je prisoten na zunanji membrani celic mikroglije. Pride do sproščanja vnetnih mediatorjev in nastanka bolečine.

1.3.5 KATEPSIN S KOT DIAGNOSTIČNI IN PROGNOСТИČNI OZNAČEVALEC

Katepsin S je zaradi svojega diferencialnega izražanja pri določenih boleznih potencialni prognostični in diagnostični biološki označevalec. Njegova koncentracija se specifično poveča pri številnih rakavih obolenjih, kot so hepatocelularni rak, rak prostate rak trebušne slinavke ter rak debelega črevesja in danke (50). Analize preživetja so pokazale povezavo med povečanim izražanjem katepsina S in slabšim izidom bolezni (51). Povišano raven katepsina S najdemo tudi v serumu bolnikov z diabetesom. Spremenjeno je tudi razmerje med koncentracijo katepsina S in njegovega inhibitorja cistatina C. Analize serumskih vzorcev bolnikov z miokardnim infarkt, anevrizmo abdominalne aorte in nestabilno angino pectoris so pokazale povišano raven katepsina S (50). Novejše raziskave so razkrile, da je katepsin S možno določati tudi v solzah, kjer lahko služi kot biološki kazalec za Sjogrenov sindrom. To je avtoimunska bolezen, ki prizadene solzne žleze in žleze slinavke (52).

1.3.6 KATEPSIN S KOT TERAPEVTSKA TARČA

Katepsin S je zaradi vključenosti v različna patološka stanja postal pomembna terapevtska tarča. Razvili so že več spojin z majhno molekularno maso. Te naj bi se vezale na aminokislinski ostanek cisteina v aktivnem mestu encima (53). Težava pri načrtovanju inhibitorjev katepsina S in ostalih katepsinov je velika strukturna podobnost med njimi. Potrebna je visoka optimizacija, da lahko inhibitor specifično prepozna točno določeno tarčo. Drugi problem pri načrtovanju inhibitorjev je lizomotropizem, kopičenje šibkih baz in lipofilnih komponent v lizosomskih predelkih v celici zaradi nizkega pH (54). Lizosomalne membrane so namreč bolj prepustne za neprotonirane bazične molekule kot za protonirane. Akumulacija teh komponent v endo-lizosomski poti povzroči povečano število nespecifičnih vezav, to pa zmanjša učinkovitost zdravilne učinkovine. Šibke baze lahko v kislem okolju lizosoma povzročijo dvig pH, kar pripelje do funkcijskih okvar lizosoma. Več inhibitorjev katepsina S že testirajo v kliničnih študijah za zdravljenje RA,

psorizae in nevropatske bolečine, raziskujejo pa tudi že potencialni inhibitorji katepsina S za zdravljenje različnih vrst raka in nekaterih vnetnih bolezni (53).

2. NAČRT DELA IN HIPOTEZE

Katepsin S je lizosomski encim, spada v družino cisteinskih proteaz in sodeluje pri razgradnji proteinov do krajših peptidov in aminokislin. Pomembno vlogo ima pri predstavitvi antigenov z molekulami MHC II na površini antigen predstavitevni celic. Razgradi invariantno verigo (I_i) in s tem omogoči vezavo antigenskega peptida na molekulo MHC II ter potovanje na površino celice. Izražajo ga predvsem antigen predstavitvene celice, kot so makrofagi, dendritične celice, limfociti B in celice mikroglije. Spremenjeno izražanje katepsina S se povezuje s številnimi patološkimi stanji. Povišani nivoji katepsina S v serumu so povezani z etiologijo anevrizme in ateroskleroze arterije. Katepsin S je tako potencialni diagnostični in prognostični označevalec.

Naš namen je pripraviti monoklonska protitelesa, ki bodo v serumu prepoznala in specifično vezala tako aktivni kot neaktivni prokatepsin S. S testom ELISA bomo preverili učinkovitost izoliranih protiteles in jo primerjali z učinkovitostjo protiteles, ki so bila pripravljena in izolirana leta 2002. Na koncu bomo z enakim testom izmerili koncentracijo (pro)katepsina S v serumskih vzorcih bolnikov z anevrizmo in aterosklerotično okluzijo infrarenalne aorte ter primerjali rezultate obeh patoloških stanj. Pričakujemo, da bosta imeli obe skupini bolnikov povišane vrednosti CTSS v primerjavi z zdravo populacijo. Pri bolnikih z anevrizmo infrarenalne aorte pričakujemo višje vrednosti CTSS v primerjavi z bolniki z aterosklerotično okluzijo iste aorte. S testom encimske aktivnosti bomo izmerili tudi aktivnost CTSS. Pričakujemo, da bo pri obeh stanjih povišana glede na zdravo populacijo, pri bolnikih z anevrizmo infrarenalne aorte še nekoliko bolj.

NAČRT DELA:

1. Iz hibridomske celične linije 1E3 bomo pripravili monoklonska protitelesa proti (pro)katepsinu S
2. Protitelesa bomo izolirali s postopki grobe in fine filtracije ter afinitetne kromatografije

3. Pripravljena mAb, ki prepoznajo aktivni in neaktivni katepsin S, bomo uporabili pri testu ELISA, s katerim bomo preverili njihovo učinkovitost in jo primerjali z učinkovitostjo Ab, izoliranih leta 2002.
4. V serumskih vzorcih bolnikov z anevrizmo in bolnikov z aterosklerotično okluzijo infrarenalne aorte bomo izmerili koncentracijo (pro)katepsina S
5. V istih serumskih vzorcih bomo z encimskih testom izmerili aktivnost katepsina S
6. Primerjali bomo razmerje koncentracij in aktivnosti (pro)katepsina S pri obeh skupinah bolnikov.

HIPOTEZE:

1. (pro)katepsin S bo povišan pri obeh skupina bolnikov v primerjavi z zdravo populacijo.
2. Vrednosti (pro)katepsina S bodo višje pri skupini bolnikov z anevrizmo infrarenalne aorte kot pri bolnikih z aterosklerotično okluzijo.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 BIOLOŠKI REAGENTI

a) Prokatepsin S

OZNAKA	OPIS REAGENTA	KONCENTRACIJA
Prokat S	Prokatepsin S, shranjen na -20° C,	0,8 mg/mL
Ⓢ	Prokatepsin S, shranjen na -80° C	0,8 mg/mL

b) Katepsin S

OZNAKA	OPIS REAGENTA	KONCENTRACIJA
Kat S	Katepsin S, shranjen na -80° C	0,33 mg/mL
Kat S	Katepsin S, shranjen na -20° C	0,33 mg/mL

c) Protitelesa proti (pro)katepsinu S

OZNAKA	OPIS REAGENTA	KONCENTRACIJA
mAb 1E3	Monoklonska protitelesa proti (pro)katepsinu S, 1E3, izolirana 5.2. 2016, FFA	3,2 mg/mL
mAb 1E3	Monoklonska protitelesa proti (pro)katepsinu S, 1E3, izolirana 10.5. 2002, FFA	0,947 mg/mL

d) Sekundarna protitelesa proti (pro)katepsinu S, konjugirana z encimom HRP

OZNAKA	OPIS REAGENTA	KONCENTRACIJA
Anti-kat S	Sekundarna protitelesa proti (pro)katepsinu S, označena z encimom hrenovo peroksidazo (HRP)	R=1:9000

3.1.2 NEBIOLOŠKI REAGENTI

REAGENT	OPIS REAGENTA, PROIZVAJALEC
TMB	Sigma
H ₂ SO ₄	
Na ₂ CO ₃	Sigma
NaHCO ₃	Sigma
NaCl	Kemika
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Riedel-deHaen
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Riedel-deHaen
Tween 20	Serva
BSA	Sigma
Citronska kislina (0,1M)	Riedel-deHaen
Cistein	Aldrich
EDTA	Promega
0,1 % PEG 8000	Sigma
Z-VVR-AMC	Biomol
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Riedel-deHaen
KH ₂ PO ₄	Sigma
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O (trinatrijev citrat dihidrat)	Riedel-deHaen
C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O (citronska kislina monohidrat)	Riedel-deHaen
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck KGaA
Protein-A Sepharosa	GE Healthcare
DMEM	ICN Biomedicals Inc.
FBS	Gibco
DMSO	GibcoBRL
L-glutamin	ICN Biomedicals Inc.
Penicilin/Streptomycin	Sigma
Nigrozin	Sigma
PBS	Biowhittaker

3.1.3 PUFRI

PUFRI ZA TEST ELISA

a) **Pufer A** (za prekritje mikrotitrne ploščice s Ab pri testu ELISA)

1,6 g Na₂CO₃

2,9 g NaHCO₃

Dolijemo destilirano vodo do 1 L, pH 9,6 uravnavamo s HCl.

b) **Pufer B** (za spiranje mikrotitrne ploščice pri testu ELISA)

20x 170 g NaCl

26,8 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

8,8 g NaH₂PO₄ x 2H₂O

10 g Tween 20

Dolijemo destilirano vodo do 1 L in uravnamo pH pufru na 7,2.

c) **Pufer C** (za blokado prostih mest na mikrotitrski ploščici ter redčenje standardov, vzorcev in sekundarnih protiteles pri testu ELISA)

Za pripravo 100 mL pufru C odmerimo 2 g BSA v 100 mL pufru B

d) **Substratni pufer za TMB** (za redčenje substrata TMB pri testu ELISA)

21 g citronske kisline (0,1 M)

17,8 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

PUFRI ZA TEST AKTIVNOSTI KATEPSINA S

a) **Aktivacijski pufer**

Za pripravo 50 mL aktivacijskega pufru odmerimo:

0,0302 g cisteina

150 µL EDTA (0,5 M)

50 mL osnovnega pufru

b) Osnovni pufer

100 mM fosfatni pufer (pH 6,5)

0,1 % PEG 8000

PUFRI ZA AFINITETNO KROMATOGRFIJO

a) Vealni pufer

0,14 M fosfatni pufer, pH 8,2

Raztopina A: 12,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, dodamo 500 mL destilirane vode

Raztopina B: 0,950 g KH_2PO_4 , dodamo 50 mL destilirane vode

Raztopini A (500 mL) dodajamo raztopino B do pH 8,2.

b) Pufer za eluiranje protiteles (elucijski pufer)

0,1 M citratni pufer, pH 3,5

Raztopina A: 1,48 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$, dodamo 50 mL destilirane vode

Raztopina B: 4,2 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$, dodamo 200 mL destilirane vode

Raztopini B (150 mL) dodajamo raztopino A do pH 3,5.

c) Pufer za dodatno spiranje kolone po eluciji protiteles

0,1 M citratni pufer, pH 2,5

Raztopina A: $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Raztopina B: $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$

50 mL raztopini B, pripravljene za elucijski pufer, dodajamo raztopino A do pH 2,5.

d) Pufer za nevtralizacijo eluiranih protiteles

1 M Tris,

Za pripravo 50 mL pufra odmerimo 6,1 g Trisa in dodamo 50 mL destilirane vode.

3.1.4 GOJIŠČA

a) Kompletno gojišče za hibridomske celice 1E3

85 % DMEM

13% FBS

1% L-glutamin

1% penicilin/streptomycin

Za pripravo 1 L DMEM potrebujemo

13,38 g praška DMEM

3,7 g NaHCO₃

Dodamo 1 L destilirane vode.

b) Gojišče za zamrznitev hibridomskih celic 1E3

750 µL DMEM

600 µL FBS

150 µL DMSO

3.1.5 LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE

OPREMA, APARATURA	OPIS, PROIZVAJALEC
Avtomatske večkanalne pipete	E1200, Biohit
Mikrotitrna ploščica za test ELISA	Thermo Scientific

Avtomatski spiralec mikrotitrskih ploščic za test ELISA	Thermo Scientific
Suhi inkubator	WTB BINDER, Nemčija
Mini centrifuga	Capsulefuge PMC-060, Tomy
Konično mešalo (Vortex)	Vibromix 104EV, Technica
Polavtomatske pipete	0,2-2 μ L, 0,5-10 μ L, 2-20 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L, Eppendorf
Celični inkubator	Binder
Termometer	Assistent
Črna mikrotitrška ploščica za merjenje encimske aktivnosti	Nunclon Delta Surface, Thermo Fisher Scientific
Analizna tehtnica	Mettler-Toledo AB104
Vakuumska črpalka	Buchi Vacuum
Stresalnik	Tehtnico
Komora z laminarnim pretokom zraka	PIO SMBC 183 AV
Plastenke za gojenje celičnih kultur	25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ² , TPP Tissue Culture Flasks
Invertni mikroskop	Nikon TMS-F
Ploščica za štetje celic	Tiefe Depth Profounder 0,100 mm 0,0025 mm ² , Thoma
Nuča	Sartorius
Krovna stekelca	Alltra d.o.o, Slovenija
Filter papir	Schleicher&Schuell, Black ribbon, 185 cm
Celuloza acetatni filter za nučiranje	0,8 μ m, Sartorius
Posoda za ultrafiltracijo	350 mL, 10 mL, Amicon 8010
Membrana za ultrafiltracijo	Millipore YM-10, Amicon
pH meter	Hanna HI9321 microprocessor pH meter
Kolona s protein-A sefarozo	GE Healthcare
pH lističi	Merck
Spektrofotometer	Nanodrop Spectrophotometer ND1000
Čitalec mikrotitrskih ploščic	Tecan Safire ²
Centrifuga	Sorvall RT7

3.2 METODE

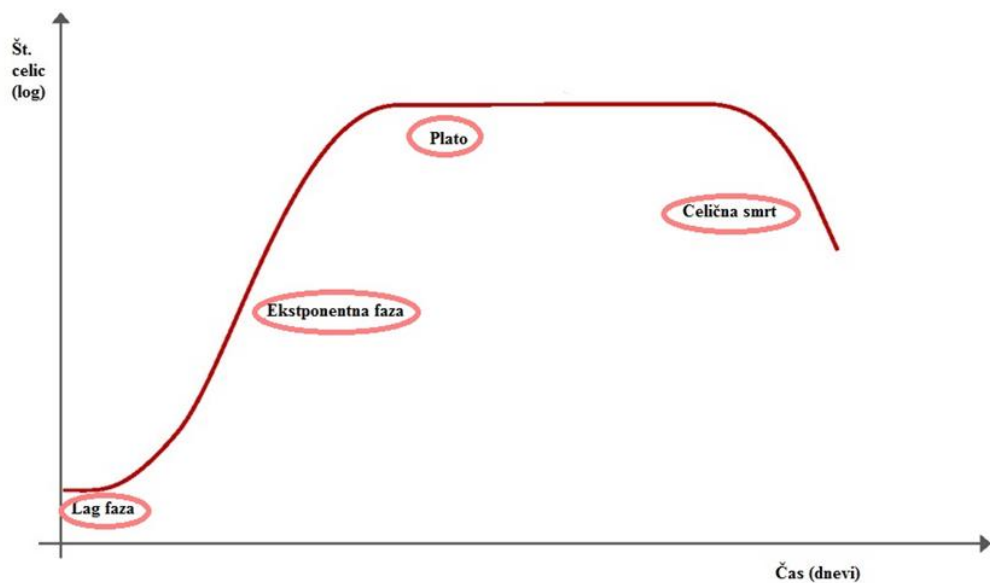
3.2.1 GOJENJE HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ

Odmrznitev hibridomov 1E3 B11

Hibridomske celice 1E3 B11, zamrznjene v tekočem dušiku, smo odtalili v vodni kopeli na 37°C. Odtaljene hibridome smo prenesli v 5 mL kompletnega gojišča in centrifugirali 5 minut pri 1300 obratih na minuto v ohlajeni centrifugi. Po končanem centrifugiranju smo supernatant odlili, usedlino s hibridomi pa prenesli v platenko za gojenje (25 cm²) in dodali kompletno gojišče.

Gojenje hibridomskih celičnih linij

Hibridome smo gojili v platenkah za gojenje (25, 75 in 150 cm²) pri sterilnih pogojih v celičnem inkubatorju pri temperaturi 37°C in 5% CO₂. S celicami smo manipulirali v komori z laminarnim pretokom zraka in jih vsak dan opazovali pod invertnim mikroskopom, kjer smo preučevali njihovo obliko, gostoto ter morebitno prisotnost okužbe. Ko so dosegle dovolj visoko gostoto in je gojišče postalo svetlo oranžno do rumeno, smo jih prenesli v nove platenke in jim dodali sveže gojišče. Celice smo na ta način razredčili in dosegli da so ves čas v eksponentni fazi rasti. Ta postopek smo ponavljali toliko časa, dokler nismo dobili zelenega števila namnoženih hibridomskih celic.



Slika 3-1: Graf rasti celic v celični kulturi. Celice se po naselitvi v celično kulturo kratek čas še ne razmnožujejo. Tej fazi pravimo lag faza. S časom število celic eksponentno narašča. Ko dosežejo določeno število in velikost se celice ne morejo več razmnoževati, dosežen je plato. Celice je treba prenesti v novo gojiščno posodo in jim dodati sveže gojišče, če ne preidejo v celično smrt.

Štetje hibridomskih celic

Celice smo šteli pod invertnim mikroskopom, po predhodnem barvanju z barvilom nigrozin. Barvilo vstopa le v poškodovane celice in jih obarva temno. Iz plastenke za gojenje celic smo vzeli 100 μL gojišča s hibridomi in dodali 100 μL nigrozina. Zmes smo prenesli na stekelce za štetje celic. Pod mikroskopom smo prešteli število živih (okroglih) celic v enem kvadratu. Koncentracijo hibridomskih celic v gojišču (število celic/mL) smo izračunali po formuli:

$$c = N \times 10^7 \times 2$$

Zamrznitev hibrodomov 1E3 B11

Glede na število hibridomskih celic v gojišču smo določili da zamrznemo 6 vial. V vsaki viali smo zamrznili 5 milijonov hibridomskih celic. Gojišče s hibridomi smo centrifugirali 5 minut pri 1500 obratih na minuto. Supernatant smo odlili, usedlini s hibridomi pa dodali

9 mL gojišča za zamrznitev hibridomov (1,5 mL na vialo) in jo dobro premešali. Zmes smo nato razporedili v 6 vial in zamrznili na -70°C .

3.2.2 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTITELES

Groba filtracija

Pred filtracijo smo v plastenkah celicam iztrošili gojišče. Hibridomske celice so zaradi šoka pospešeno izločale protitelesa v gojišče. Celotno vsebino v plastenkah smo nato filtrirali skozi celulozni filter papir (black ribbon) v liju. Celice so ostale na papirju, filtrirala pa so se protitelesa ter ostanki celic in membran (debris). Dobili smo 1 L filtrata.

Fina filtracija

Po filtraciji je sledila filtracija na nuči s podtlakom (300 mbar), skozi celuloza-acetatni papir s porami $0,8\ \mu\text{m}$. Na filtru so se zadržali vsi ostanki celic in membran (debris), prepuščala pa so se protitelesa. Filtrat smo zamrznili na -20°C in nato uporabili za ultrafiltracijo.

Ultrafiltracija in dializiranje raztopine protiteles proti vezalnemu pufri

Za ultrafiltracijo smo uporabili ultrafilter z maksimalnim volumnom 350 mL ter celulozno membrano Ultracel YM-10, ki prepušča delce z maksimalno velikostjo 10 000 Da. Prepuščajo se voda in manjše molekule, protitelesa in druge makromolekule pa ostanejo na membrani. Ultrafiltracija je potekala pri nadtlaku (3 bar), temperaturi 4°C in stalnem mešanju. Filtrat smo skoncentrirali do volumna 22 mL in ga nato zdializirali proti vezalnemu pufri. Dializo smo izvedli tako, da smo filtratu dodali enak volumen vezalnega pufra (0,14-M fosfatni pufer s pH 8,2) in ga na ultrafiltru skoncentrirali do zelenega volumna (15 mL). Na ta način smo raztopini protiteles uravnali pH. Vzorec smo zamrznili do izvedbe afinitetne kromatografije.

Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je metoda ločevanja snovi, med drugim se uporablja tudi za čiščenje protiteles iz zmesi. Ločevanje poteka na osnovi vezave molekule iz vzorca na ligand, pripet na nosilec. Vezava mora biti specifična in reverzibilna, da lahko molekulo odstranimo z liganda in je pri tem ne spremenimo. Ligand je ves čas vezan na nosilec, molekula iz vzorca pa se zaradi spremembe pH po nanosu elucijskega pufra (0,1-M citratni pufer s pH 3,5) eluira iz kolone. Na ta način dobimo posamezne frakcije, ki vsebujejo želeno molekulo iz vzorca. Koncentracijo eluirane molekule določimo z merjenjem absorbance pri določeni valovni dolžini.

Za čiščenje protiteles iz vzorca smo uporabili kolono z nosilcem Protein-A sefarozo. Protein-A je protein, ki se nahaja v celični steni bakterije *Staphylococcus aureus* in veže Fc dele IgG.

Postopek:

1. Kolono speremo z vezalnim pufrom (3x volumen kolone) ter pustimo da ves pufer izteče iz kolone.
2. Na kolono nanese vzorec ter v čašo lovimo iztekajočo tekočino. Ko preneha iztekati prozorna in začne iztekati rdeča tekočina kolono zapremo in pustimo stati 45 min na sobi temperaturi. V tem času pride do vezave protiteles na Protein-A na nosilcu.
3. Sledi spiranje nečistoč. Nad kolono nanese vezalni pufer. Kolono spiramo dokler ne dosežemo absorbance eluata $<0,01$.
4. Kolono spiramo z elucijskim pufrom. Eluirajo se protitelesa, ki se zaradi spremembe pH odstranijo z liganda. V epruvete lovimo 3 mL frakcije protiteles, ki jim s pH indikatorskim papirčkom izmerimo pH in ga uravnamo na nevtralni pH z 1-M Trisom. Posameznim eluiranim frakcijam izmerimo absorbanco pri 280 nm. Frakcije z visoko absorbanco združimo.
5. Kolono spiramo s pufrom za dodatno spiranje (pH 2,5) toliko časa dokler ne dosežemo absorbance eluata $<0,01$.

6. Kolono spiramo z vezalnim pufrom dokler ne dosežemo vrednosti pH 8,2 in jo shranimo v hladilniku na 4°C.

Dializa protiteles proti PBS-pufru

Združene frakcije s protitelesi v ultrafiltru skoncentriramo do zelenega volumna (3 mL) in nato dializiramo proti PBS-pufru s pH 7,2 (3x spiramo s PBS-pufrom).

Določitev koncentracije izoliranih protiteles 1E3

Koncentracijo protiteles določimo spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 280 nm in uporabo formule:

$$C_{\text{mAb}} \text{ (mg/mL)} = A_{280} \times F_{\text{IgG}}$$

A_{280} ...absorbanca pri valovni dolžini 280 nm

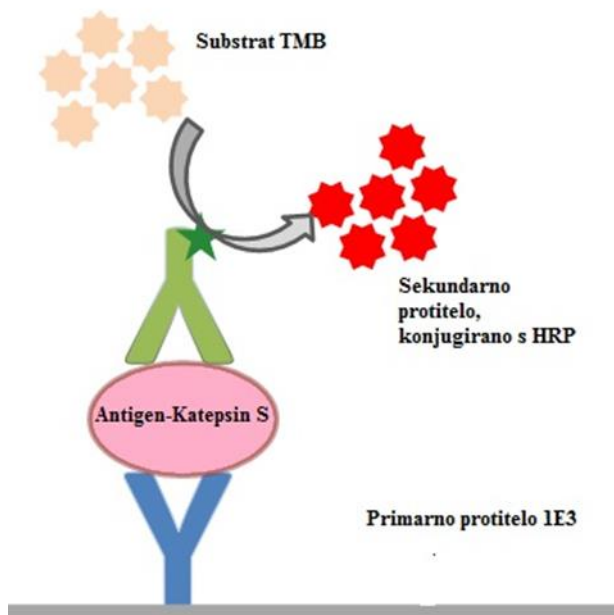
C_{mAb} ...koncentracija monoklonskih protiteles

F_{IgG} ...faktor protitelesa IgG ($1/\epsilon$)

ϵ ...ekstinkcijski koeficient (za IgG $\rightarrow 1,35 \text{ mL/mol cm}$)

3.2.3 TEST ELISA (»Enzyme-linked Immunosorbent Assay«)

Metoda temelji na osnovni imunski reakciji med Ag in Ab. Uporablja se za kvalitativno ali (semi)kvantitativno določanje Ab ali Ag v vzorcu. Poznamo več različic metode. Za določanje Ag v vzorcu lahko uporabimo »sendvič« test ELISA, kjer na površino mikrotitrne ploščice vežemo Ab, specifična za iskani Ag. Po inkubaciji ploščico speremo in blokiramo nezasedena mesta s pufrom C, ki vsebuje BSA. Dodamo vzorec z Ag in nato še sekundarna Ab, označena z encimom hrenovo peroksidazo (HRP). Po dodatku substrata TMB poteče encimska reakcija, pri kateri encim pretvori TMB v modro obarvan produkt. Reakcijo zaustavimo z dodatkom H_2SO_4 . Pri tem pride do spremembe barve iz modre v rumeno. Količina nastalega produkta je sorazmerna količini Ag v vzorcu, ki jo določimo spektrofotometrično pri 450 nm.



Slika 3-2: Princip direktnega testa ELISA. Na površino mikrotitrne ploščice vežemo primarno Ab proti (pro)katepsinu S. Dodamo vzorec z Ag. Ag se veže na primarno Ab. Dodamo sekundarno Ab, konjugirano z encimom HRP. Po dodatku substrata TMB pride do spremembe barve iz modre v rumeno.

Postopek:

1. Prekrivanje mikrotitrne ploščice s Ab 1E3 v pufru A



**100 μ L, čez noč v hladilniku,
Ccoating = 5 μ g/mL, R= 1:640**

2. Spiranje mikrotitrne ploščice na avtomatskem spiralniku



3x, pufer B

3. Blokada nezasedenih mest na ploščici s pufrom C



130 μ L, sobna T, 30 min

4. Spiranje mikrotitrne ploščice na avtomatskem spiralniku

3x, pufer B

5. Inkubacija z Ag iz vzorca in standardom padajočih koncentracij

100 μ L, 2 h, 37°C

6. Spiranje mikrotitrne ploščice na avtomatskem spiralniku

3x, pufer B

7. Inkubacija s konjugiranimi sekundarnimi Ab

**100 μ L, 2h, 37°C,
R= 1:9000**

8. Spiranje mikrotitrne ploščice na avtomatskem spiralniku

3x, pufer B

9. Razvijanje s substratom TMB

**Redčenje s substratnim
pufrom 1:1, 200 μ L,
sobna T, 15 min, tema**

10. Zaustavitev reakcije z 2 M H₂SO₄

50 μ L

11. Merjenje absorbance pri 450 nm

3.2.4 TEST AKTIVNOSTI KATEPSINA S

Test encimske aktivnosti je kinetična meritev, pri kateri merimo hitrost pretvorbe substrata v produkt. Reakcijo katalizira encim v vzorcu (aktivni katepsin S). Hitrost reakcije, ki je definirana kot sprememba koncentracije substrata v produkt v časovni enoti, podaja aktivnost encima.

Za določanje aktivnosti katepsina S smo uporabili sintetični fluorogeni substrat Z-VVR-AMC. Ta vsebuje kratko peptidno sekvenco valin-valin-arginin, ki je označena je s fluoriscenčnim 7-amino-metilkumarinom. Po cepitvi z encimom se AMC sprosti s peptidne sekvence. Nastanek prostega fluorofora (produkta) kvantificiramo kontinuirno vsakih 6 s z merjenjem fluorescence na spektrofotometru pri temperaturi 37°C. Po zaključeni meritvi smo narisali grafe časovne odvisnosti intenzitete fluorescence. Odvisnost je hiperbolična. Rezultate smo podali kot naklon krivulje v linearnem delu, z enotami RFU/s.

Postopek:

1. Substrat, encim in vzorce odmrznemo na ledu
2. Pripravimo substrat in ga zavijemo v ALU-folijo



Z-VVR-AMC redčimo 50x v osnovnem pufru

3. Pripravimo pozitivno kontrolo: aktivni katepsin S



$C_{\text{začetna}} = 13,3 \mu\text{M}$

$C_{\text{končna}} = 30 \text{ nM}$, redčimo z aktivacijskim pufrom

4. Pripravimo negativno kontrolo: aktivacijski pufer

5. Pripravimo vzorce



**4x redčimo v aktivacijskem
pufu**

6. V luknjice mikrotitrne ploščice odpipetiramo pripravljeni substrat



**5 μ L v vsako luknjico,
pokrijemo z ALU-folijo**

7. Aktiviramo pozitivno kontrolo in vzorce



**5-10 min, v vodni kopeli
na 37°C**

8. Pri Tecanu odpipetiramo vzorce in kontrole v luknjice, kjer je že substrat



95 μ L v vsako

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZOLACIJA MONOKLONSKIH PROTITELES 1E3 PROTI (PRO)KATEPSINU S

Monoklonska protitelesa smo izolirali v postopku afinitetne kromatografije, kot je opisano v poglavju 3.2.2. Protitelesa smo iz kolone eluirali tako, da smo na vrh kolone nanegli elucijski pufer s pH 3,5 ter lovili frakcije s protitelesi. Vsem smo izmerili absorbanco pri 280 nm in združili frakcije z največjo absorbanco. Združenim frakcijam smo izmerili skupno absorbanco, ki je znašala 0,331, jih skoncentrirali na ultrafiltru ter zdializirali proti PBS pufru. Končnemu volumnu 2,5 mL smo izmerili absorbanco, ki je znašala 4,364.

Koncentracijo mAb 1E3 smo izračunali po formuli:

$$C \text{ (mg/mL)} = A_{280} \times F_{\text{IgG}}$$

$$F_{\text{IgG}} \dots 0,7407$$

$$A_{280} \dots 4,364$$

Končna koncentracija izoliranih mAb 1E3 z absorbanco 4,364 in faktorjem IgG 0,7407, je znašala **3,2 mg/mL**. Koncentracija mAb 1E3, izoliranih leta 2002, pa je znašala 0,947 mg/mL. Prisotnost in učinkovitost izoliranih protiteles smo preverili s testom ELISA.

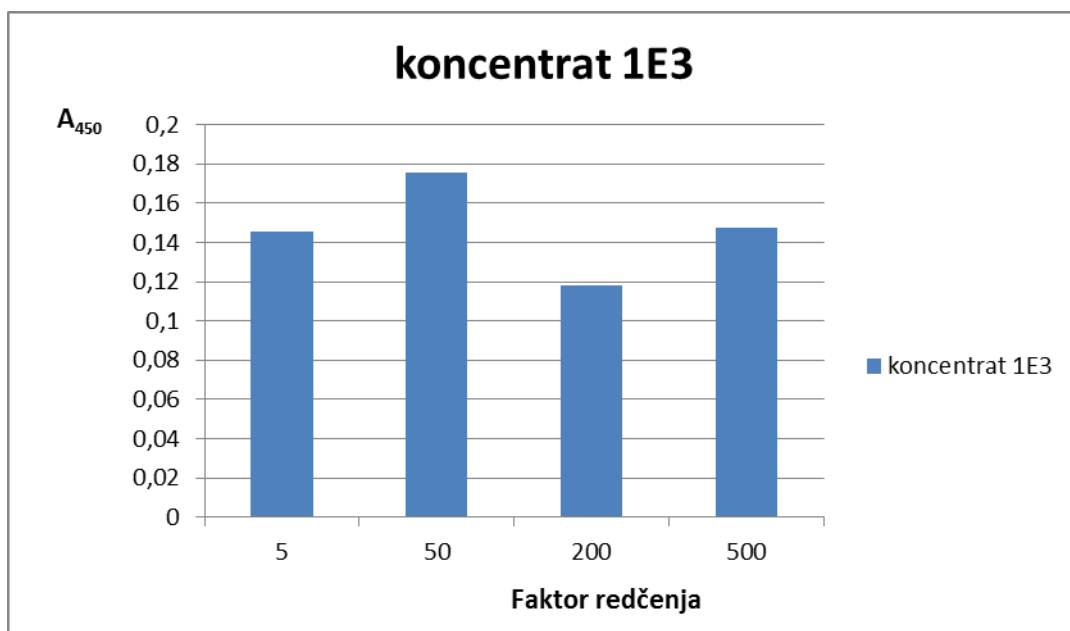
4.2 ELISA KONCENTRATOV PRIMARNIH PROTITELES

Predno smo do konca izolirali protitelesa s pomočjo afinitetne kromatografije, smo naredili poskusni ELISA test s koncentratom hibridomskega gojišča 1E3, ki smo ga dobili po ultrafiltraciji. V gojišču so bili poleg Ab prisotni tudi drugi proteini. Zanimalo nas je, kolikšne signale bomo dobili, oziroma koliko ostali proteini motijo nastanek specifične vezave Ab z Ag.

Uporabili smo naslednji testni sistem:

Koncentrat hibridomskega gojišča 1E3 po ultrafiltraciji	Redčitvena lestvica (1:5, 1:50, 1:200, 1:500)
Ag (prokatepsin S, shranjen na -20°C)	$C_{\text{začetna}} = 0,8 \text{ mg/mL}$ $C_{\text{končna}} = 61,6 \text{ mg/mL}$
Sekundarno Ab (konjugirano s HRP)	$R = 1 : 9000$

Mikrotitrsko ploščico smo prekrili z Ab v koncentratu hibridomskega gojišča 1E3, padajočih koncentracij. Vsako redčitev smo nanесли v duplikatu. Imeli smo tudi dve negativni kontroli. Prvo smo pripravili brez Ag, drugo pa brez konjugata. Po inkubaciji z Ag, spiranju ploščice, inkubaciji s sekundarnimi Ab, spiranju ter dodatku substrata TMB, smo izmerili A pri 450 nm. V vseh luknjicah smo dobili šibke signale. Jakost signala ni padala enakomerno z naraščanjem faktorja redčenja. Šibki signali so bili verjetno posledica prisotnosti drugih proteinov v gojišču, ki so ovirali specifične vezave Ab z Ag.



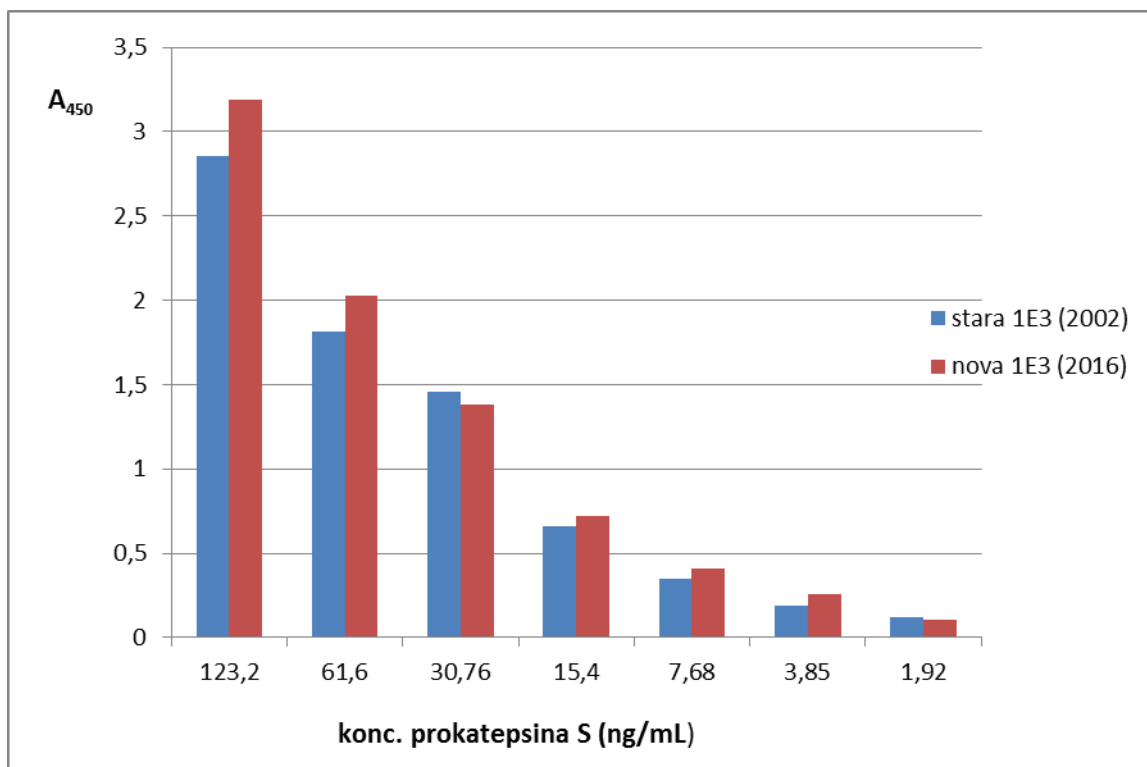
Slika 4-1: Jakost signalov absorbance, merjene pri 450 nm. Jakosti A ne padajo sorazmerno z redčitvijo koncentrata hibridomskega gojišča. Signali so zelo šibki. Po vsej verjetnosti so posledica prisotnosti drugih proteinov v koncentratu, ki ovirajo vezave Ab z Ag.

4.3 ELISA ZA OCENO UČINKOVITOSTI IZOLIRANIH PROTITELES

S testom ELISA, opisanem v poglavju 3.2.3, smo preverili učinkovitost izoliranih protiteles 1E3 in jih primerjali z učinkovitostjo protiteles, izoliranih leta 2002. Uporabili smo sledeči testni sistem:

Primarno Ab1E3 (izolirano 5.2.2016)	$C_{\text{začetna}} = 3,2 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{končna}} = 5 \text{ } \mu\text{g/mL}$
Primarno Ab 1E3 (izolirano 10.5.2002)	$C_{\text{začetna}} = 0,947 \text{ mg/mL}$ $C_{\text{končna}} = 5 \text{ } \mu\text{g/mL}$
Ag (prokatepsin S, shranjen na -20°C)	Redčitvena vrsta od 123,2 ng/mL do 1,92 ng/mL
Sekundarno Ab (konjugirano s HRP)	$R = 1 : 9000$

Po končani inkubaciji z Ag in sekundarnimi Ab, smo z merjenjem A pri 450 nm potrdili prisotnost protiteles 1E3 v izolatu in ugotovili, da so protitelesa ki smo jih izolirali mi, približno enako učinkovita kot protitelesa, pripravljena in izolirana leta 2002.



Slika 4-2: Primerjava učinkovitosti (jakosti signalov) novo izoliranih Ab z učinkovitostjo Ab, izoliranih leta 2002. Učinkovitost naših Ab se bistveno ne razlikuje od učinkovitosti Ab, izoliranih leta 2002. Odzivi so podobni in padajo z večanjem faktorja redčenja.

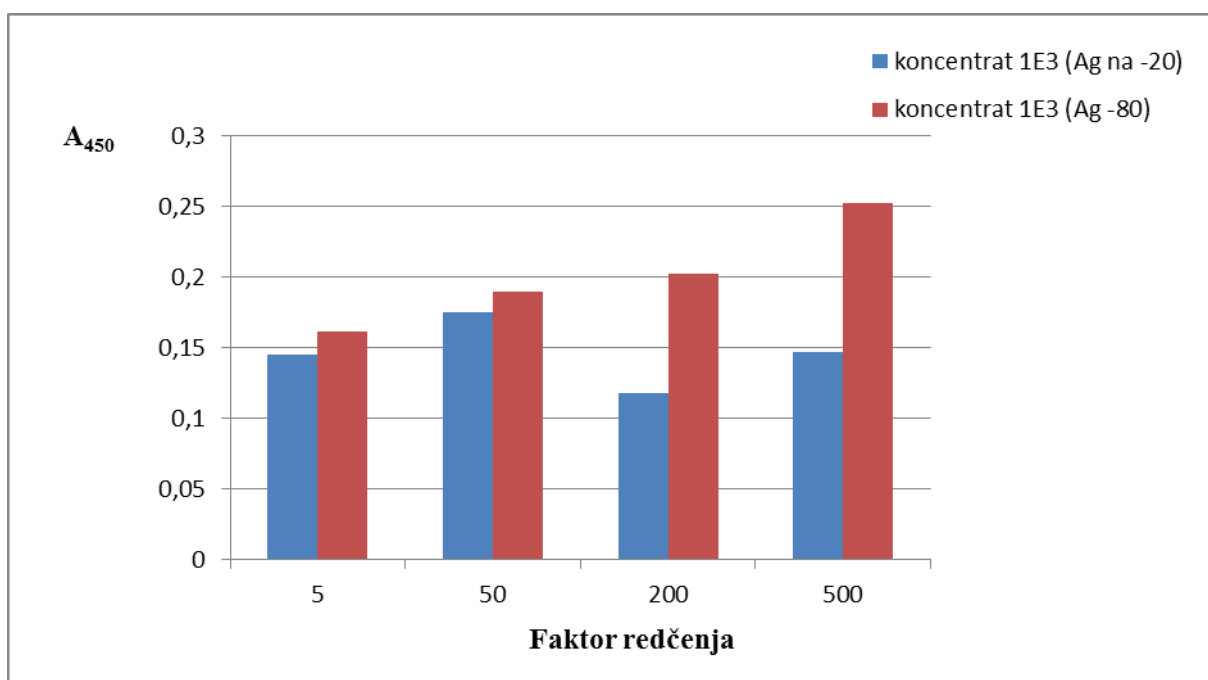
4.4 TEST ELISA ZA OCENO VPLIVA TEMPERATURE SHRANJEVANJA ANTIGENA NA UČINKOVITOST NJIHOVE VEZAVE S PROTITELESI

(Pro)katepsin S, ki smo ga kasneje pri merjenju koncentracije katepsina S v serumskih vzorcih uporabili kot standard, smo imeli shranjen pri dveh različnih temperaturah. Prvi je bil shranjen na -20°C , drugi pa na -80°C . Zanimalo nas je, ali temperatura shranjevanja Ag vpliva na učinkovitost vezave Ab z Ag. To smo preverili še pred izvedbo afinitetne kromatografije, s testom ELISA. Kot vir primarnih Ab smo uporabili koncentrat hibridomskega gojišča. Uporabili smo naslednji testni sistem:

Koncentrat hibridomskega gojišča 1E3 po ultrafiltraciji	Redčitvena lestvica (1:5, 1:50, 1:200, 1:500)
Ag (prokatepsin S, shranjen na -20°C)	$C_{\text{začetna}} = 0,8 \text{ mg/mL}$ $C_{\text{končna}} = 61,6 \text{ mg/mL}$
Ag (prokatepsin S, shranjen na -80°C)	$C_{\text{začetna}} = 0,8 \text{ mg/mL}$

	$C_{\text{končna}} = 61,6 \text{ mg/mL}$
Sekundarno Ab (konjugirano s HRP)	$R = 1:9000$

Po končanih inkubacijah in dodatku substrata TMB, smo izmerili absorbance pri 450 nm. Primerjali smo jakost signala v vdolbinicah kjer smo uporabili (pro)katepsin S, shranjen na -20°C z jakostjo signala v luknjicah, kjer smo uporabili (pro)katepsin S, shranjen na -80°C . Ugotovili smo, da se le te niso bistveno razlikovale, zato smo v nadaljevanju kot standard uporabljali (pro)katepsin S, shranjen na -20°C .



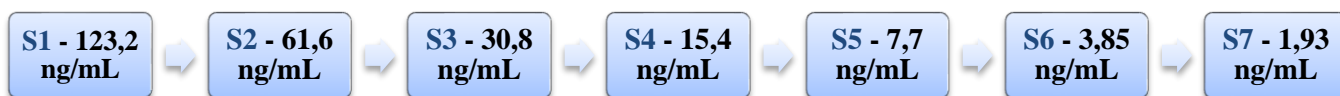
Slika 4-3: Ocena vpliva T shranjevanja Ag na učinkovitost vezave Ag z Ab. Na podlagi A_{450} ni vidnih pomembnih razlik v učinkovitosti tvorbe kompleksa Ab-Ag če sta uporabljena dva Ag, shranjena pri različni T.

4.5 MERJENJE KONCENTRACIJE (PRO)KATEPSINA S V SERUMSKIH VZORCIH S TESTOM ELISA

S testom ELISA, opisanem v poglavju 3.2.3, smo določali koncentracijo (pro)katepsina S v serumskih vzorcih bolnikov z okluzijo infrarenalne aorte. Imeli smo 69 serumskih vzorcev bolnikov, ki so bili razdeljeni v 2 skupini:

- Bolniki z aterosklerozo infrarenalne aorte (1-35)
- Bolniki z anevrizmo infrarenalne aorte (36-69)

Vsem vzorcem smo izmerili koncentracijo (pro)katepsina S, ki smo jo določili na podlagi standardne krivulje. Za izris standardne krivulje smo potrebovali različne redčitve standarda (pro)katepsina S z znano koncentracijo. Naredili smo redčitveno vrsto.



Pri izvedbi testa ELISA smo uporabili naslednji testni sistem:

Serumski vzorci bolnikov z okluzijo infrarenalne aorte (69)	R=1:2
Ag (prokatepsin S, shranjen na -20°C)	Redčitvena vrsta od 123,2 ng/mL do 1,92 ng/mL
Sekundarno Ab (konjugirano s HRP)	R= 1:9000

Serumske vzorce bolnikov smo nanesti na dve mikrotitrski ploščici po shemi:

Mikrotitrski ploščica z vzorci 1-35 (serumski vzorci bolnikov z aterosklerozo infrarenalne aorte)

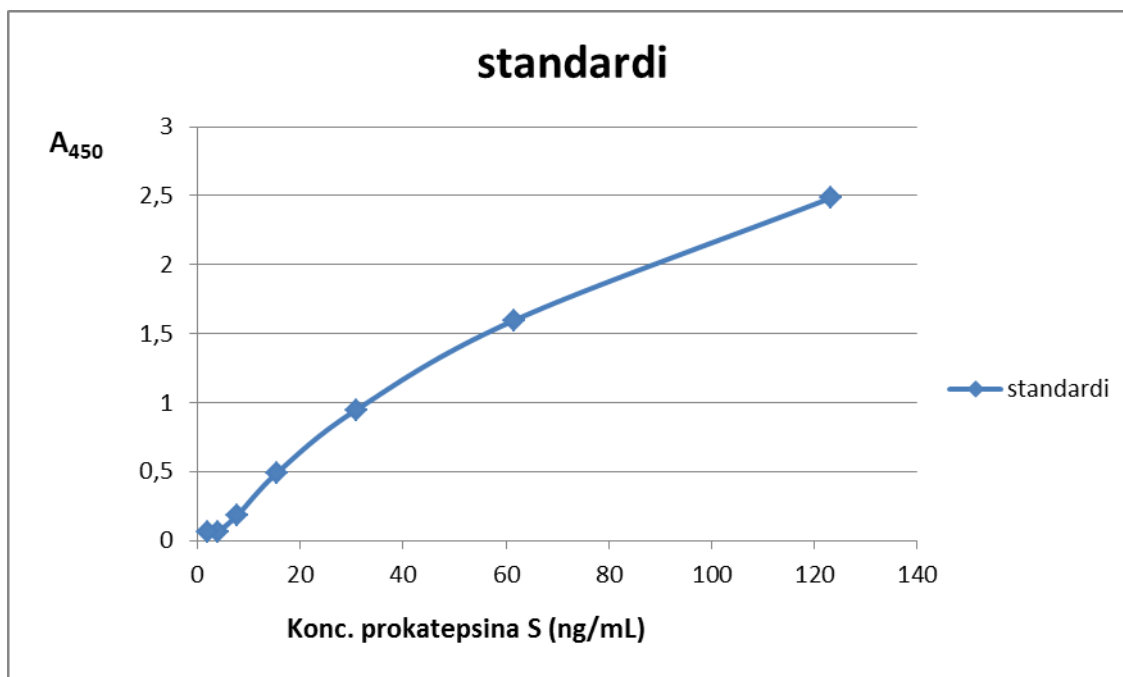
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	VZ ₁	VZ ₁	VZ ₉	VZ ₉	VZ ₁₇	VZ ₁₇	VZ ₂₅	VZ ₂₅	VZ ₃₃	VZ ₃₃
B	S2	S2	VZ ₂	VZ ₂	VZ ₁₀	VZ ₁₀	VZ ₁₈	VZ ₁₈	VZ ₂₆	VZ ₂₆	VZ ₃₄	VZ ₃₄
C	S3	S3	VZ ₃	VZ ₃	VZ ₁₁	VZ ₁₁	VZ ₁₉	VZ ₁₉	VZ ₂₇	VZ ₂₇	VZ ₃₅	VZ ₃₅

D	S4	S4	VZ ₄	VZ ₄	VZ ₁₂	VZ ₁₂	VZ ₂₀	VZ ₂₀	VZ ₂₈	VZ ₂₈		
E	S5	S5	VZ ₅	VZ ₅	VZ ₁₃	VZ ₁₃	VZ ₂₁	VZ ₂₁	VZ ₂₉	VZ ₂₉		
F	S6	S6	VZ ₆	VZ ₆	VZ ₁₄	VZ ₁₄	VZ ₂₂	VZ ₂₂	VZ ₃₀	VZ ₃₀		
G	S7	S7	VZ ₇	VZ ₇	VZ ₁₅	VZ ₁₅	VZ ₂₃	VZ ₂₃	VZ ₃₁	VZ ₃₁		
H	NK	NK	VZ ₈	VZ ₈	VZ ₁₆	VZ ₁₆	VZ ₂₄	VZ ₂₄	VZ ₃₂	VZ ₃₂		

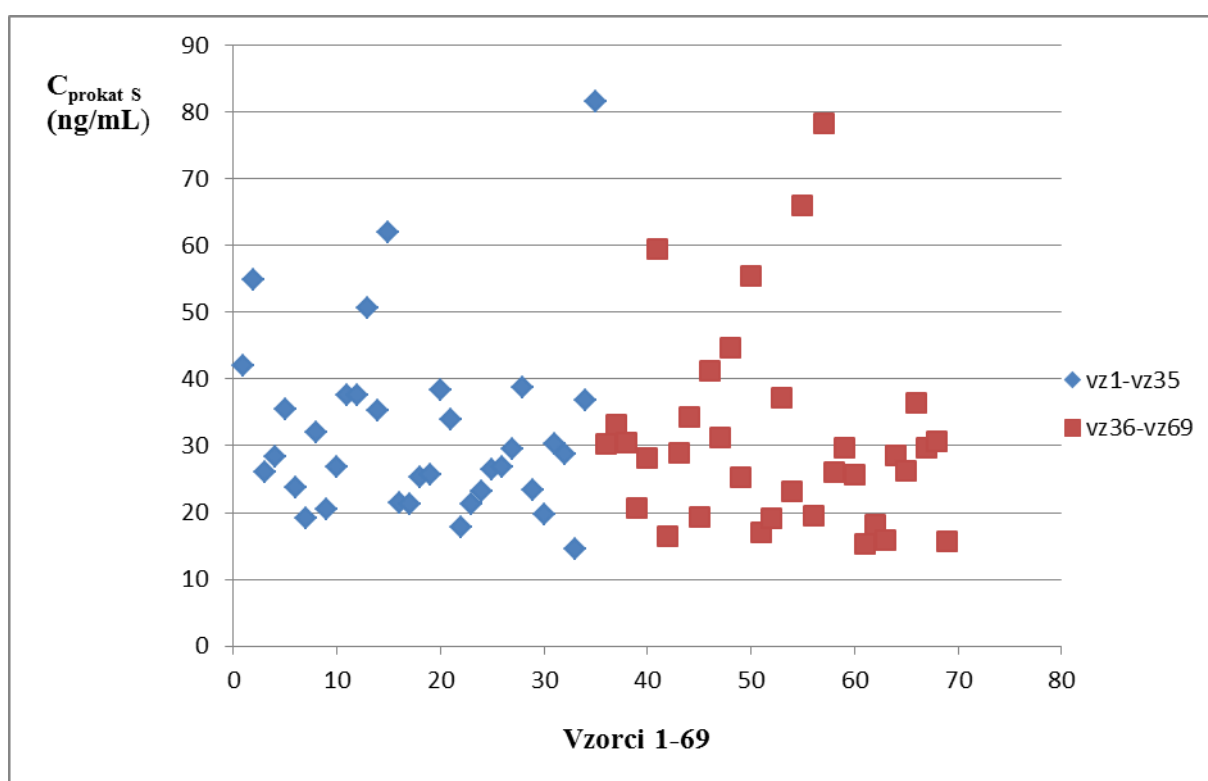
Mikrotitrna ploščica z vzorci 36-69 (serumski vzorci bolnikov z anevrizmo infrarenalne aorte)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	VZ ₃₆	VZ ₃₆	VZ ₄₄	VZ ₄₄	VZ ₅₂	VZ ₅₂	VZ ₆₀	VZ ₆₀	VZ ₆₈	VZ ₆₈
B	S2	S2	VZ ₃₇	VZ ₃₇	VZ ₄₅	VZ ₄₅	VZ ₅₃	VZ ₅₃	VZ ₆₁	VZ ₆₁	VZ ₆₉	VZ ₆₉
C	S3	S3	VZ ₃₈	VZ ₃₈	VZ ₄₆	VZ ₄₆	VZ ₅₄	VZ ₅₄	VZ ₆₂	VZ ₆₂		
D	S4	S4	VZ ₃₉	VZ ₃₉	VZ ₄₇	VZ ₄₇	VZ ₅₅	VZ ₅₅	VZ ₆₃	VZ ₆₃		
E	S5	S5	VZ ₄₀	VZ ₄₀	VZ ₄₈	VZ ₄₈	VZ ₅₆	VZ ₅₆	VZ ₆₄	VZ ₆₄		
F	S6	S6	VZ ₄₁	VZ ₄₁	VZ ₄₉	VZ ₄₉	VZ ₅₇	VZ ₅₇	VZ ₆₅	VZ ₆₅		
G	S7	S7	VZ ₄₂	VZ ₄₂	VZ ₅₀	VZ ₅₀	VZ ₅₈	VZ ₅₈	VZ ₆₆	VZ ₆₆		
H	NK	NK	VZ ₄₃	VZ ₄₃	VZ ₅₁	VZ ₅₁	VZ ₅₉	VZ ₅₉	VZ ₆₇	VZ ₆₇		

Po inkubaciji z Ag, sekundarnimi Ab in dodatku substrata TMB smo reakcijo zaustavili z 2M H₂SO₄ in izmerili absorbanco pri 450 nm. Količina nastalega produkta je sorazmerna količini Ag v vzorcu. Na podlagi sedmih redčitev standarda smo dobili standardno krivuljo. Vrednosti absorbance na Y osi predstavljajo povprečje dveh vrednosti (duplikata), kateremu je odšteta absorbanca negativne kontrole. Koncentracijo (pro)katepsina S v serumskih vzorcih je spektrofotometer določil na podlagi izrisane standardne krivulje. Dobljeno koncentracijo (pro)katepsina S v serumskih vzorcih smo morali zaradi dvakratnega redčenja množiti z 2.



Slika 4-4: Standardna krivulja pri testu ELISA. Na X osi je nanešena znana koncentracija sedmih standardov (prokatepsin S na -20°C), na Y osi pa so A. Izrisana standardna krivulja je podlaga za določitev koncentracije (pro)katepsina S v serumskih vzorcih.



Slika 4-5: Primerjava koncentracij (pro)katepsina S pri bolnikih z aterosklerozo in bolnikih z anevrizmo infrarenalne aorte. Koncentracije se pri obeh skupinah bolnikov gibljejo med 18 in 40 ng/mL. Ni pomembne razlike v koncentracijah med obema skupinama bolnikov.

Izračunana povprečna koncentracija (pro)katepsina S v serumskih vzorcih bolnikov z aterosklerozo infrarenalne aorte (vzorci 1-35) je znašala 31, 91 ng/ml. Povprečna koncentracija (pro)katepsina S v serumskih vzorcih bolnikov z anevrizmo infrarenalne aorte pa je znašala 31, 10 ng/mL. Vidimo torej, da ni bistvene razlike v koncentracijah med obema skupinama bolnikov, čeprav smo pri bolnikih z anevrizmo infrarenalne aorte pričakovali višje vrednosti.

4.6 MERJENJE AKTIVNOSTI KATEPSINA S V SERUMSKIH VZORCIH BOLNIKOV Z OKLUZIJO INFRARENALNE AORTE

S testom encimske aktivnosti, opisanem v poglavju so določili aktivnost katepsina S v serumskih vzorcih. S tem testom smo za razliko od testa ELISA, določili le aktivni katepsin S. Tako kot pri merjenju koncentracije, smo tudi tukaj imeli 69 serumskih vzorcev, razdeljenih v dve skupini:

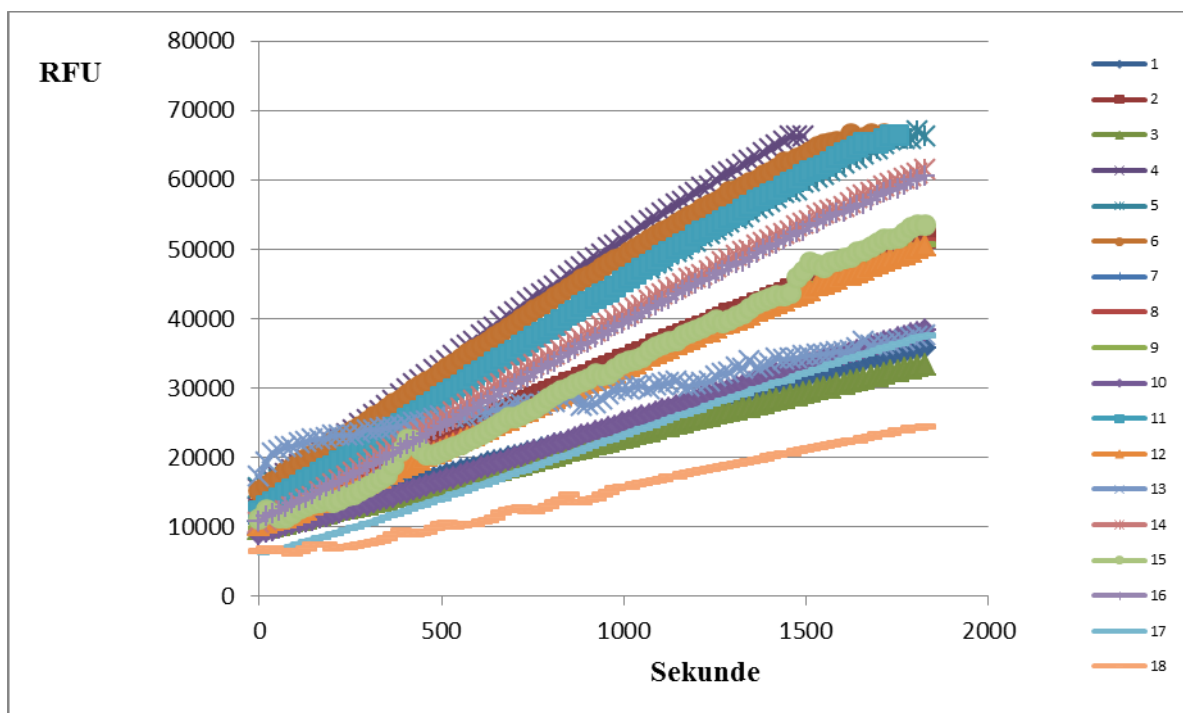
- - Bolniki z aterosklerozo infrarenalne aorte (vzorci 1-35)
- Bolniki z anevrizmo infrarenalne aorte (vzorci 36-69)

Za določitev encimske aktivnosti katepsina S smo uporabili naslednji testni sistem:

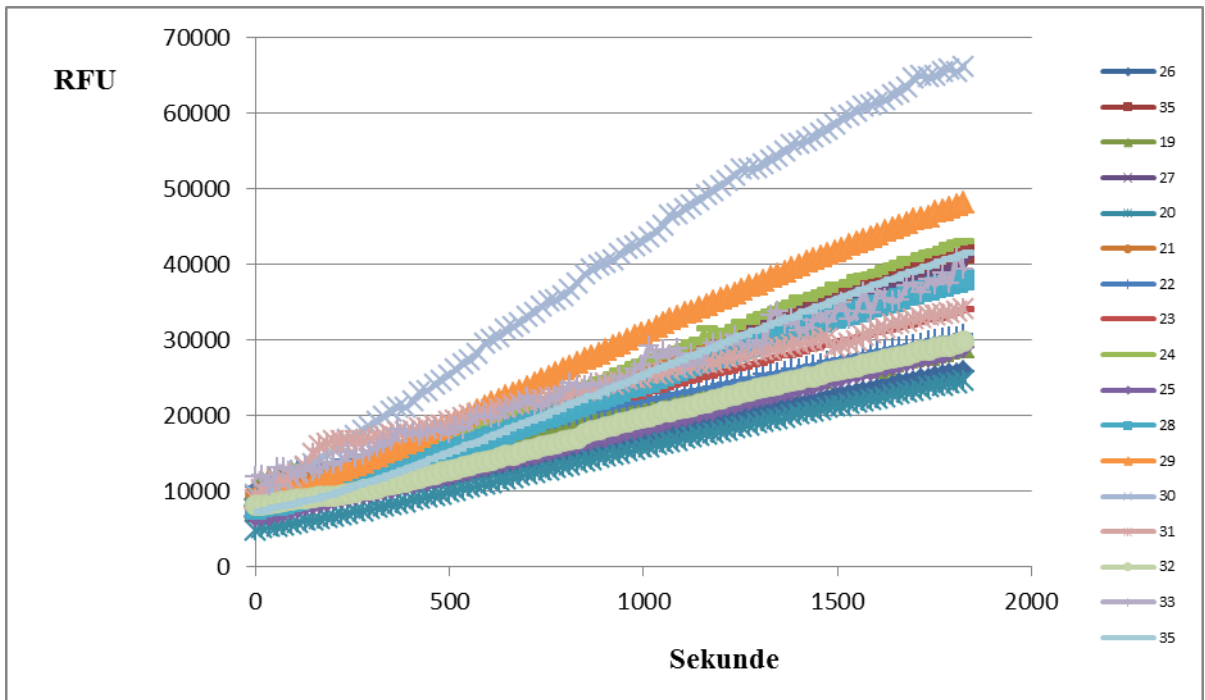
Substrat Z-VVR-AMC	R= 50x (redčimo z osnovnim pufrom)
Standard (aktivni katepsin S, shranjen na -80°C)	C _{začetna} = 13,3 μM C _{končna} = 30 nM
Serumski vzorci bolnikov (1-69)	R= 4x (redčimo v aktivacijskem pufru)

Pri testu aktivnosti smo za negativno kontrolo uporabili z aktivacijski pufer, za pozitivno kontrolo pa z aktivacijskim pufrom redčen (50x) standard katepsin S. Kontrolni in serumske vzorce smo nanašali na črno ploščico v dvojniku. Pripravili smo ustrezn volumen v osnovnem pufru redčenega substrata, pozitivno in negativno kontrolo ter serumske vzorce. V luknjice na ploščici smo nanesti substrat ter pri aparatu nanesti še kontrole in reagente ter pričeli z meritvami. Da bi se izognili netočnim rezultatom zaradi časovnega zamika nanašanja na ploščico, smo vzorce razdelili na štiri ploščice. Encim v vzorcih namreč začne pretvarjati substrat v produkt takoj po dodatku, zato je merjenje potrebno začeti čimprej.

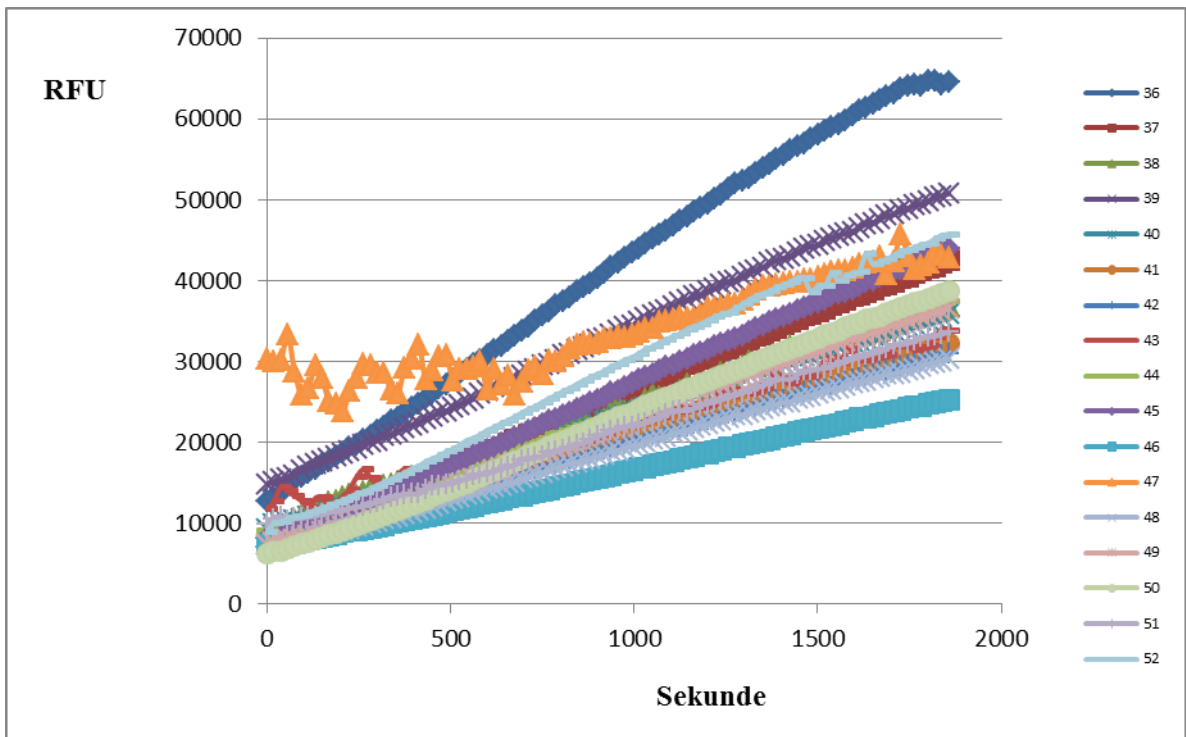
Aparat je izmeril jakost fluorescence vsakih 19 sekund, 100 ciklov in jo podal v enoti RFU (relative fluorescent unit). Dobljene vrednosti smo nanegli na graf odvisnosti jakosti fluorescence od časa. Dobljeni krivulji smo v linearnem delu določili naklon in tako dobili vrednost encimske aktivnosti z enoto RFU/s. Večji je naklon premice, večja je aktivnost encima. Fluorofor smo ekscitirali pri valovni dolžini 365 nm, emitacijska svetloba pa je znašala 440 nm. Dobili smo naslednje rezultate:



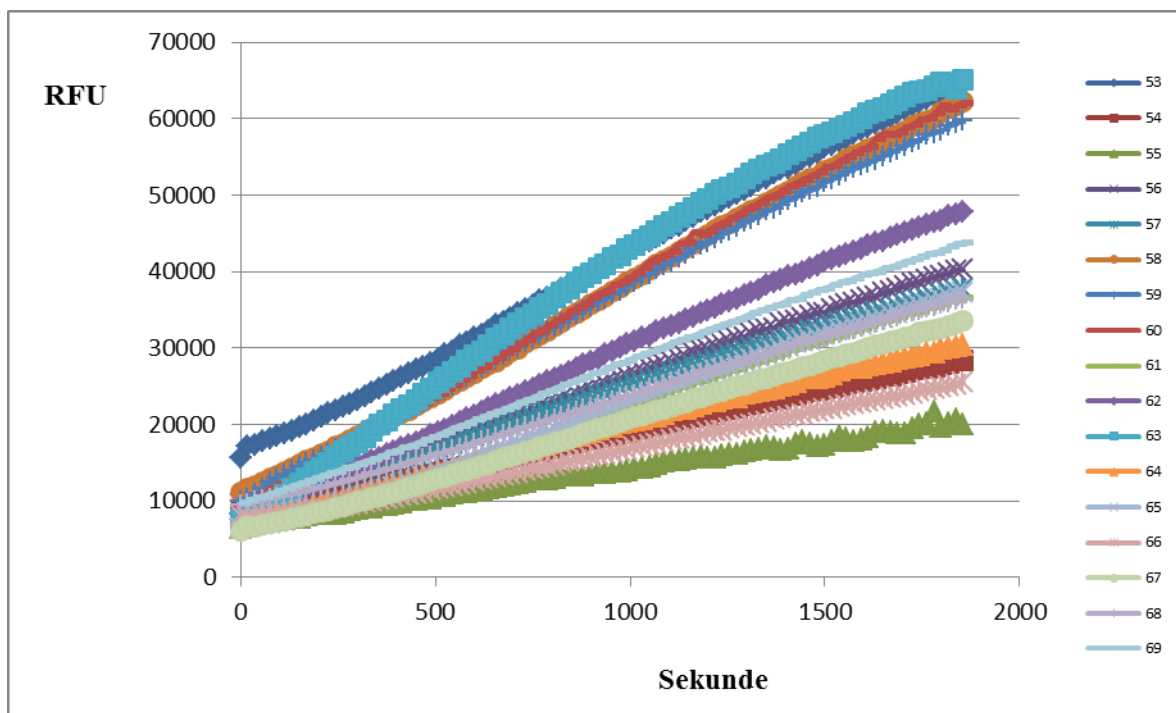
Slika 4-6: Graf hitrosti nastanka produkta z encimsko reakcijo vzorcih 1-18. Količina fluorescenčnega produkta narašča skoraj linearno. Meritev fluorescence potekajo vsakih 9 sekund. Iz premice izračunan naklon je enota za aktivnost encima.



Slika 4-7: graf hitrosti nastanka produkta z encimsko reakcijo v vzorcih 19-35.



Slika 4-8: graf hitrosti nastanka produkta z encimsko reakcijo v vzorcih 36-52.



Slika 4-9: graf hitrosti nastanka produkta z encimsko reakcijo v vzorcih 53-69.

Povprečna aktivnost Katepsina S v serumskih vzorcih bolnikov z aterosklerozo infrarenalne aorte (1-35) je znašala 18,807 RFU/s, povprečna aktivnost Katepsina S v serumskih vzorcih bolnikov z anevrizmo infrarenalne aorte (36-69) pa 17,661 RFU/s. Tako kot v koncentracijah, tudi v aktivnosti nismo dobili bistvenih razlik med obema skupinama bolnikov, čeprav smo pri bolnikih z anevrizmo infrarenalne aorte pričakovali višje vrednosti.

Zaradi zaupnosti podatkov o bolnikih, individualni podatki za serumske koncentracije (pro)Katepsina S niso objavljeni.

5. SKLEPI

Med magistrskim delom smo prišli do naslednjih sklepov:

1. S pomočjo grobe in fine filtracije ter afinitetne kromatografije smo iz hibridomske celične linije 1E3 izolirali mAb proti (pro)katepsinu S. S testom ELISA smo preverili njihovo učinkovitost oziroma zmožnost prepoznavne Ag in jo primerjali z učinkovitostjo mAb, izoliranih leta 2002. Ugotovili smo, da so približno enako učinkovita. Končna koncentracija izoliranih mAb proti (pro)katepsinu S je znašala 3,2 mg/mL. Ab prepoznajo tako aktivni kot neaktivni (pro) katepsin S.
2. S testom ELISA smo primerjali učinkovitost vezave Ab z dvema Ag, shranjena pri različni temperaturi (-20°C in -80°C). Ugotovili smo, da temperatura shranjevanja Ag pomembno ne vpliva na učinkovitost vezave Ab z Ag.
3. V serumskih vzorcih bolnikov z okluzijo infrarenalne aorte smo s testom ELISA izmerili koncentracijo (pro)katepsina S. Polovica bolnikov (1-35) je imela aterosklerozo, druga polovica (36-69) pa anevrizmo infrarenalne aorte. Pričakovali smo, da bodo imeli bolniki z anevrizmo višje vrednosti kot bolniki z aterosklerozo. Naša hipoteza ni bila potrjena, saj nismo zaznali pomembne razlike v vrednostih med obema skupinama bolnikov. Pri večini bolnikov obeh skupin so se koncentracije gibale v območju med 20 in 40 ng/mL.
4. S kinetičnim testom encimske aktivnosti smo določili aktivno obliko katepsina S. Tudi tukaj smo pričakovali višje vrednosti pri bolnikih z anevrizmo infrarenalne aorte, vendar hipoteze nismo mogli potrditi. Aktivnost katepsina S se med obema skupinama bolnikov ni bistveno razlikovala.

Izolirana protitelesa so učinkovita in pripravljena za uporabo v nadaljnjih študijah. Na osnovi dobljenih rezultatov, ki smo jih dobili s testom ELISA in testom aktivnosti ne moremo zagotovo trditi, da se vrednosti pri bolnikih z anevrizmo in aterosklerozo infrarenalne aorte pomembno ne razlikujejo. Študijo bi bilo potrebno ponoviti na večjemu številu vzorcev bolnikov in upoštevati tudi druge dejavnike ki prispevajo k povišani ravni katepsina S v krvi (zdravila, diabetes, druge vnetne bolezni itd).

6. LITERATURA

1. Rawlings N.D., Barrett A.J., and Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 2010; 40: 343–350.
2. Kos J., Vozelj S., Obermajer N. Proteaze in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci. *Farm vestn*, 2007. 58(4): 133-138.
3. Repnik U., Starr A.E., Overall C.M., and Turk B. Cysteine cathepsins activate and inactivate non-ELR chemokines. *J. Biol. Chem.* 2015; 290(22): 13800–13811.
4. Turk B., Turk D., and Turk V. Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J.* 2012; 31(7): 1630–1643.
5. Turk V., Kos J., and Turk B. Cysteine cathepsins (proteases)--On the main stage of cancer? *Cancer. Cell.* 2004; 5(5): 409–410.
6. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2006; 5(9): 785–799.
7. Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Elsevier, Academic Press. 2004.
8. Rawlings N.D., Barrett A.J., and Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 227-233.
9. Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new fontiers. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1824(1): 68-88.
10. Turk V., Turk B., Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and oppurtunities. *EMBO J.* 2001; 20 (17): 4629-4633.
11. Mohamed M.M., Sloane B.F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2006; 6: 764-775.
12. Dickinson D.P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit. Rewiev. Oral.Biol. Med.* 2002; 13(3): 238-275.
13. Zavasnik-Bergant T., Turk B. Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens.* 2006; 67 (5): 349-355.
14. Holt OJ., Gallo, F., Griffiths G.M. Regulating secretory lysosomes. *J Biochem.* 2006; 140 (1): 7-12.
15. Dell' Angelica E.C., Mullis C., Caplan S., Bonifacino J.S. Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 2000; 14 (10): 1265-1278.

16. Turk B., Turk D., Salvesen G.S. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des.* 2012; 8 (18): 1623-1637.
17. Conus S., Simon H.U. Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss Med Wkly.* 2010; 140: w13042.
18. Zavasnik-Bergant T, Turk B. Cysteine proteases: destruction ability versus immunomodulation capacity in immune cells. *Biol Chem.* 2007; 388(11):1141–1149.
19. Salvesen G.S. A lysosomal protease enters the death scene. *J Clin Invest.* 2001; 107 (1): 21-23.
20. Blomgram R., Zheng L., Stendahl O. Cathepsin-cleaved Bid Promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(5): 1213-1223.
21. Ewald S.E., Lee B.L., Lau L., Wickliffe K.E., Shi G-P., Chapman, H.A. The ectodomain of toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature.* 2008; 456 (7222): 658-662.
22. Ha S-D., Martins A, Khazaie K., Han J., Chan B.M., Kim S.O. Cathepsin B is involved in the trafficking of TNF- α -containing vesicles to the plasma membrane in macrophages. *J Immunol.* 2008; 181(1): 690-697.
23. Honey K., Rudensky A.Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(6): 472-482.
24. Chapman H.A. Endosomal proteases in antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(1): 78-84.
25. Fiebiger E., Meraner P., Weber E, Fang I.F., Stingl G., Ploegh H. Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J Exp Med.* 2001; 193(8): 881-892.
26. Pham CT., Lay TJ. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci.USA,* 1999; 96(15): 8627-8632.
27. Laforge M., Petit F., Estaquier J, Senik A. Commitment to apoptosis in CD4⁺ T lymphocytes productively infected with human immunodeficiency virus type 1 is initiated by lysosomal membrane permeabilization, itself induced by isolated expression of the viral protein Nef. *J Virol.* 2007; 81(20): 11426-11440.
28. Gelb B. D., Shi G. P., Chapman H. A., Desnick R. J. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science.* 1996; 273(5279): 1236-1238.

29. Allende L. M., García-Pérez M.A., Moreno A., Corell A., Carasol M., Martínez-Canut P., Arnaiz-Villena A. Cathepsin C gene: First compound heterozygous patient with Papillon-Lefèvre syndrome and a novel symptomless mutation. *Hum Mutat.* 2001; 17(2):152-153.
30. Chapman H.A., Riese R.J., Shi G.P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* 1997; 59: 63-88.
31. Shi G.P., Webb A.C., Foster K.E., Knoll J.H., Lemere C.A., Munger J.S., Chapman, H.A. Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *Biol. Chem.* 1994; 269: 11530-11536.
32. Nissler K., Oerhing H., Krieg R., Pierskalla A., Weber E., Wiederanders, B., Halbhuber K.J. Cytochemical demonstration of expression and distribution of non-glycosylated human lysosomal cathepsin S in HEK 293 cells. *Cell.Mol.Biol.* 2002; 48: 297-308.
33. Reiser J., Adair B., Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest.* 2010; 120(10): 3421-3431.
34. Reddy A., Caler E.V., Andrews N.W. Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca²⁺-Regulated Exocytosis of Lysosomes. *Cell.* 2001; 106(2): 157-169.
35. Cheng X.W., Kuzuya M., Nakamura K., Di Q., Liu Z., Sasaki T., Kanda S., Jin H., Shi G.P., Murohara T., Yokota M., Iguchi A. Localization of cysteine protease, cathepsin S, to the surface of vascular smooth muscle cells by association with integrin α u β 3. *Am J Pathol.* 2006; 168(2): 685–694.
36. Beers C., Burich A., Kleijmeer M.J., Griffith J.M., Wong P., Rudensky A.Y. Cathepsin S controls MHC Class II-mediated antigen presentation by epithelial cells in Vivo. *J Immunol.* 2005; 174(3): 1205-1212.
37. Conus S., Simon H. Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss. Med. Wkly.* 2010; 140: w13042.
38. Thurmond R.L, Sun S, Karlsson L, Edwards J.P. Cathepsin S inhibitors as novel immunomodulators. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005; 6(5): 473–482.
39. Schurigt U. Role of cysteine cathepsins in joint inflammation and destructon in human rheumatoid arthritis and associated animal models. *Inflamm. Res.* 2013; 61: 1021-1029.
40. Beck H., Schwarz G., Schroter C.J., Deeg M., Baier D., Stevanovic S., Weber E., Driessen C., Kalbacher H. Cathepsin S and an asparagine-specific endoprotease dominate the proteolytic processing of human myelin basic protein in vitro. *Eur J Immunol.* 2001; 31(12): 3726-3736.

41. Cheng X.W, Kuzuya M., Nakamura K, Di Q., Liu Z., Sasaki T., Kanda S., Jin H., Shi G.P., Murohara T., Yokota M., Ihuchi A. Localization of cysteine protease, cathepsin S, to the surface of vascular smooth muscle cells by association with integrin α 5 β 3. *Am J Pathol.* 2006; 168: 685-694.
42. Shimizu K., Mitchell R.N., Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vac Biol.* 2006; 26: 987-994.
43. Wang, B., Sun, J., Kitamoto, S., Yang, M., Grubb, A., Chapman, H.A., Kalluri, R., Shi, G-P., Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol. Chem.* 2006; 281(9): 6020-6029.
44. Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanaha, D., Joyce, J.A. Distinct roles fo cysteine cathepsins genes in multistage tumorigenesis. *Genes. Dev.* 2006; 20(5): 543-556.
45. Burden, R.E., Gormley, J.A., Jaquin, T.J., Small, D.M., Quinn, D.J., Hegarty, S.M., Ward, C., e tal. Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. *Clin. Cancer. Res.* 6042-6051. Burden, R.E., Gormley, J.A., Kuehn, D., Ward, C., Kwok, H.F., e tal. Inhibition of cathepsin S by Fsn0503 enhances the efficiency of chemotherapy in colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(19): 6042-6051.
46. Small, D.M., Burden, R.E., Jaworski, J., Hegarty, S.M., Spence, S., Burrows, J.F., McFarlane, C., e tal. Cathepsin S from both tumour and tumour associated cells promote cancer growth and neovascularisation. *Int. J. Cancer.* 2013; 133(9): 2102-2112.
47. Sevenich, L., Bowman, R.L., Mason, S.D., Quail, D.F., Rapaport, F., e tal. Analysis of tumour and stroma supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nat. Cell Biol.* 2014; 16(9): 876-888.
48. Zhuo, M., Wu, G., Wu, L.J. Neuronal and microglial mechanism of neuropathic pain. *Mol Brain.* 2011; 4: 31.
49. Cattaruzza F., Lyo V., Jones E., Pham D., Hawkins J., Kirkwood K., Valdez-Morales E., Ibeakamna C., Vanner S.J., Boqyo M., Bunnett N.W. Cathepsin S Is Activated During Colitis and Causes Visceral Hyperalgesia by a PAR2-Dependent Mechanism in Mice. 2011; 141(5): 1864-1874.
50. Wilkinson, R.D.A., Williams, R., Scott, C.J., Burden, R.E. Cathepsin S: therapeutic, diagnostic and prognostic potential. *Biol Chem.* 2015; 396(8): 867-882.
51. Gormley, J.A., Hegarty, S.M., O'Grady, A., e tal. The role of cathepsin S as a marker of prognosis and predictor of chemotherapy benefit in adjuvant CRC: a pilot study. *Br J Cancer.* 2011; 105(10): 1487-1494.

52. Hamm-Alvarez, S.F., Janga, S.R., Edman, M.C., e tal. Tear cathepsin S as a candidate biomarker for Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66(7): 1872-1881.
53. Lee-Dutra, A., Wiener, D.K., Sun, S. Cathepsin S inhibitors. *Expert Opin Ther Pat.* 2011; 21(3): 311-327.
54. MacIntry, A.C., Cutler, D.J. The potential role of lysosomes in tissue distribution of weak bases. *Biopharm Dru Dispos.* 1988; 9: 513-526.