

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA OZVALDIČ

**RAZVOJ CELIČNEGA MODELA
ZA ŠTUDIJ VLOGE KATEPSINA X PRI LUSKAVICI**

**DEVELOPMENT OF THE CELL MODEL
TO STUDY THE ROLE OF CATHEPSIN X IN PSORIASIS**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom dr. Zale Jevnikar.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Janku Kosu za pomoč pri načrtovanju in izdelavi diplomske naloge.

Posebna zahvala gre somentorici dr. Zali Jevnikar za pomoč, svetovanje in vodenje diplomske naloge.

Hvala vsem ostalim članom katedre za Farmaceutvsko biologijo, ki so mi bili zmeraj pripravljeni priskočiti na pomoč.

Zahvaljujem se tudi dr. Urbanu Švajger za pripravo celic T CD4+, dr. Metki Krašna za pripravo primarnih keratinocitov in Urši Pečar Fonović za pripravo rekombinantnega katepsina X.

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila starim staršem, bratu Samu, mojemu Klemnu in vsem prijateljem, ki so me skozi celoten študij spodbujali in verjeli vame.

Največjo zahvalo namenjam staršem, ki so mi vedno stali ob strani in mi nudili vse kar so lahko.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom dr. Zale Jevnikar.

Nina Ozvaldič

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	VI
OKRAJŠAVE.....	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 Proteaze	1
1.2 Lizosomske cisteinske proteaze	2
1.3 Katepsin X.....	2
1.4 Integrini	3
1.5 LFA-1	4
1.5.1 Vpliv LFA-1 na izražanje citokinov	4
1.6 Povezava katepsina X z LFA-1	5
1.7 Luskavica.....	7
1.7.1 Predstavitev bolezni	7
1.7.2 Tipi luskavice	8
1.7.3 Patogenetsko ozadje	8
1.7.4 Vloga LFA-1 pri luskavici.....	9
1.7.4.1 Vpliv na migracijo in adhezijo limfocitov T.....	9
1.7.4.2 Vpliv na izločanje citokinov	9
1.7.5 Zdravljenje luskavice	11
1.7.5.1 Efalizumab	11
1.7.6 Katepsin X in luskavica	12
2 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Materiali.....	14
3.1.1 Reagenti	14
3.1.2 Laboratorijska oprema	15

3.1.3	Raztopine in gojišča	15
3.1.3.1	Gojišča	15
3.1.3.2	Pufri	16
3.1.4	Celične kulture.....	17
3.1.5	Celice.....	17
3.1.5.1	Suspenzijske celice (limfociti T)	17
3.1.5.2	Pritrjene celice (keratinociti).....	18
3.1.6	Delo s celicami	18
3.1.6.1	Odmrzovanje celic	18
3.1.6.2	Gojenje celic	18
3.1.6.3	Štetje in zamrzovanje celic.....	19
3.1.6.4	Aktivacija celic s PMA in ionomicinom	19
3.1.6.5	Priprava kondicioniranih gojišč	19
3.2	Postavitev celičnih modelov in vrednotenje proliferacije celic	20
3.2.1	Test MTS	20
4	REZULTATI.....	21
4.1	Postavitev celičnih modelov in vrednotenje proliferacije celic	21
4.1.1	Vpliv modulatorjev katepsina X na proliferacijo limfocitov T	22
4.1.2	Vpliv modulatorjev katepsina X na proliferacijo keratinocitov	24
4.1.3	Vpliv kondicioniranih gojišč limfocitov T na proliferacijo keratinocitov.....	25
5	RAZPRAVA	28
6	SKLEPI.....	32
	LITERATURA.....	33

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Reagenti, ki smo jih uporabili pri praktičnem delu.....	14
Preglednica II: Uporabljena laboratorijska oprema.	15
Preglednica III: Uporabljeni modulatorji.	20
Preglednica IV: Kondicionirana gojišča.	20
Preglednica V: Celični modeli.	21

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura prokatepsina in izražanje katepsina X v sesalskih celičnih linijah	3
Slika 2: Osnovne konformacije LFA-1	5
Slika 3: Poenostavljen model fine regulacije LFA-1 s katepsinom X.	7
Slika 4: Imunopatogeneza luskavice	10
Slika 5: Prikaz delovanja efalizumaba in modulatorjev katepsina X na različne konformacije LFA-1	12
Slika 6: Vpliv modulatorjev na proliferacijo celic Jurkat.	22
Slika 7: Vpliv modulatorjev na proliferacijo primarnih celic T CD4+.	23
Slika 8: Vpliv modulatorjev na proliferacijo aktiviranih primarnih celic T CD4+.	23
Slika 9: Vpliv modulatorjev na proliferacijo celic NCTC2544.....	24
Slika 10: Vpliv modulatorjev na proliferacijo primarnih keratinocitov.....	25
Slika 11: Vpliv kondicioniranih gojišč celic Jurkat na celice NCTC2544.	26
Slika 12: Vpliv kondicioniranih gojišč celic Jurkat na primarne keratinocite.....	26
Slika 13: Vpliv kondicioniranih gojišč celic T CD4+ na primarne keratinocite.	27
Slika 14: Vpliv kondicioniranih gojišč aktiviranih celic T CD4+ na primarne keratinocite.	27

POVZETEK

Luskavica je kompleksna kronična vnetna avtoimunska kožna bolezen. Etiologija luskavice še ni povsem raziskana, kar onemogoča razvoj zdravil. Učinkovita so biološka zdravila, ki preprečujejo povezovanje integrina LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) na limfocitih T z adhezijsko molekulo ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) na antigen predstavitevni celicah in keratinocitih. LFA-1 je β_2 integrinski transmembranski receptor, ki je močno izražen na limfocitih T in prek interakcije z ICAM-1 omogoča aktivacijo limfocitov T, transmigracijo prek endotelija in potovanje v tkivu. Cisteinska karboksipeptidaza katepsin X s cepitvijo LFA-1 vpliva na prehod med aktivnima konformacijama z vmesno in visoko afiniteto do ICAM-1. Z uravnavanjem aktivnosti katepsina X bi lahko pri avtoimunskih boleznih, kot je luskavica, specifično regulirali afiniteto LFA-1 do ICAM-1. V okviru diplomskega dela smo želeli razviti enostaven in učinkovit celični model proliferajočih limfocitov T in keratinocitov za študij vloge katepsina X pri luskavici. Primarne celice in stabilne linije limfocitov T ter keratinocite smo obdelali z različnimi modulatorji katepsina X in ovrednotili vpliv katepsina X na proliferacijo celic. Poleg tega smo analizirali vpliv kondicioniranih gojišč limfocitov T, ki so bili obdelani z modulatorji katepsina X, na proliferacijo keratinocitov ter izbrali najprimernejše celične modele za nadaljne študije. Potrdili smo hipotezo, da modulacija katepsina X vpliva na sproščanje citokinov limfocitov T, ki spremenijo proliferacijo keratinocitov. V prihodnosti bi bilo smiselno raziskati, ali so omenjene spremembe odvisne le od regulacije LFA-1 s katepsinom X, ali so vključeni še drugi molekularni mehanizmi.

ABSTRACT

Psoriasis is a complex chronic inflammatory autoimmune skin disease. Its etiology is not completely understood, which limits the development of efficient drugs. Biological drugs, that prevent the binding of LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) on T lymphocytes with the adhesion molecule ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) on antigen presenting cells and keratinocytes, show a great potential for effective treatment. LFA-1 belongs to the β_2 integrin subfamily of transmembrane receptors and is abundantly expressed by T lymphocytes. The interaction of LFA-1 with ICAM-1 enables T lymphocyte activation, transmigration across the endothelium and migration through the tissue. The cysteine carboxypeptidase cathepsin X cleaves the β_2 integrin subunit of LFA-1 and modulates LFA-1 affinity, enabling the transition among LFA-1 conformations with intermediate and high affinities for ICAM-1. Specific regulation of cathepsin X activity would allow us to control the affinity of LFA-1 for ICAM-1 in autoimmune diseases such as psoriasis. The aim of our work was to develop a simple and effective cell model of proliferating T lymphocytes and keratinocytes that could be used to study the role of cathepsin X in psoriasis. Primary cells and stable T lymphocyte and keratinocyte cell lines were treated with various cathepsin X modulators and the impact of cathepsin X on cell proliferation was evaluated. In addition, we have analyzed the effect of the T lymphocyte conditioned media on the proliferation of keratinocytes after treatment of T lymphocytes with cathepsin X modulators. The most responsive cell models were selected for further studies. Our results confirmed the hypothesis that modulation of cathepsin X in T lymphocyte influences the release of cytokines which alter the proliferation of keratinocytes. In future studies it will be necessary to examine whether the observed changes depend only on the regulation of LFA-1 with cathepsin X or other molecular mechanisms are involved.

OKRAJŠAVE

a.k.	aminokislina
APC	antigen predstavitvena celica
Arg	arginin
Asp	asparaginska kislina
c	koncentracija
Cis	cistein
DMSO	dimetil sulfoksid
EGF	epidermalni rastni dejavnik
FCS	telečji fetalni serum
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
His	histidin
ICAM-1	medcelična adhezijska molekula-1
IFN- γ	interferon- γ
IL-2	interlevkin-2
IL-4	interlevkin-4
IL-5	interlevkin-5
IL-6	interlevkin-6
IL-10	interlevkin-10
IL-12	interlevkin-12
IL-13	interlevkin-13
K-SFM	gojišče za rast kožnih epiteljskih celic
LFA-1	limfocitni funkcijski antigen-1 (lymphocyte function associated antigen-1)
MAC-1	makrofagni antigen-1 (macrophage antigen-1)
MEM	minimalno esencialno Eaglovo gojišče
mL	mililiter
nM	nanomol/l
P	stopnja statistične značilnosti (signifikanca)
PBS	fosfatni puffer z dodatkom NaCl

PMA	forbol 12-miristat 13-acetat
pt	protitelo
rcatX	rekombinantni katepsin X
RPMI	Roswell Park Memorial Institute gojišče
SD	standardna deviacija
TCR	T celični receptor
TNF- α	faktor tumorske nekroze- α
Trp	triptofan
UL	luknjica (v mikrotitrski plošči)
VCAM-1	žilnocelična adhezijska molekula-1
μ L	mikroliter
μ M	mikromol/l

1 UVOD

1.1 Proteaze

Proteaze, ki jih poznamo tudi pod imeni proteinaze, peptidaze ali proteolitični encimi, so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v polipeptidni verigi. Po encimski klasifikaciji spadajo v razred hidrolaz, ki pri delovanju uporabljajo molekule vode za nukleofilni napad na karbonilno skupino v amidni vezi. Glede na mesto cepitve peptidne vezi delimo proteaze na eksopeptidaze in endopeptidaze. Eksopeptidaze delimo glede na mesto delovanja (karboksipeptidaze ali aminopeptidaze) in glede na velikost odcepljenih fragmentov (mono-peptidaze, dipeptidaze...). Sodobni sistem delitve proteaz (baza podatkov MEROPS) upošteva evolucijsko sorodnost in mehanizem delovanja in deli proteaze na klane, te pa na družine, zato lahko najdemo v isti družini encime z ekso- in endopeptidazno aktivnostjo. Glede na kemijsko skupino, odgovorno za katalizo, so proteaze razdeljene na več razredov: aspartatne proteaze, cisteinske proteaze, metaloproteaze, serinske proteaze, treoninske proteaze in proteaze z neznanim katalitskim mehanizmom (1, 2).

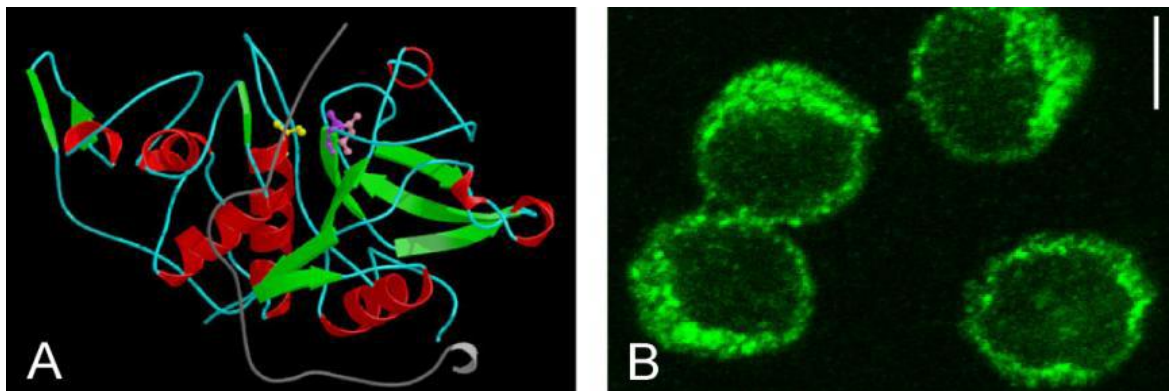
Proteaze katalizirajo specifične reakcije in omogočajo pravilno delovanje celic in posledično celotnega organizma. Z znotrajcelično in zunajcelično razgradnjo proteinov regulirajo osnovne biološke procese: preoblikovanje tkiv, nastajanje novih žil, imunski odziv, reproduktivne procese, razvoj zarodka, procesa rasti in staranja ter proces koagulacije krvi (3). Nepravilno delovanje proteaz lahko sproži številne patološke procese kot so revmatoidni artritis, kardiovaskularne bolezni, nevrodegenerativne bolezni, osteoporozo, multiplo sklerozo in raka (4). Proteolizna aktivnost v celici je strogo regulirana. Med pomembnejšimi je regulacija s specifičnimi proteinskimi inhibitorji (5).

1.2 Lizosomske cisteinske proteaze

Poznamo 11 različnih človeških lizosomskih cisteinskih proteaz ali cisteinskih katepsinov (katepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W). Cisteinski katepsini spadajo v papainsko družino lizosomskih proteaz (klan CA, družina C1, poddružina A). Večinoma gre za endopeptidaze, z izjemo katepsinov C in H, ki sta aminopeptidazi ter B in X, ki imata karboksipeptidazno aktivnost. Katepsina B in H imata tudi endopeptidazno aktivnost. Medtem, ko so katepsini B, H, L in C konstitutivno prisotni v vseh tkivih, so ostali (katepsin S, V, X, O, K, F in W) izraženi le v specifičnih vrstah celic (6). Katepsine celica sintetizira kot neaktivne encime in jih usmeri v lizosome, kjer jih aktivirajo druge proteaze, lahko pa se aktivirajo tudi avtokatalitično. Izjema je katepsin W, ki je lokaliziran v endoplazmatskem retikulumu (4). Njihova vloga ni omejena le na končno razgradnjo proteinov v lizosomih, ampak so vpleteni v več pomembnih celičnih procesov in patologij (7).

1.3 Katepsin X

Nedavno odkrit katepsin X (Slika 1A) je lizosomska cisteinska proteaza, ki sodi v družino papaina in njemu podobnih cisteinskih katepsinov. Gen se nahaja na kromosomu 20q13 in se sintetizira kot 303 aminokislin (a.k.) dolg preprokatepsin X. Po procesiranju signalnega zaporedja (preregija, 23 a.k.) in proregije (38 a.k.) nastane 242 a.k. dolg aktivni encim. Katepsin X ima nekaj edinstvenih lastnosti, ki ga ločijo od ostalih cisteinskih proteaz. Proregija katepsina X je najkrajša proregija v primerjavi z ostalimi katepsini (8, 9). Katepsin X je eksopeptidaza, ki lahko deluje kot karboksi- mono-peptidaza in dipeptidaza. Ima dodatno kratko aminokislinsko zaporedje v bližini aktivnega mesta imenovano »mini zanka«. Pomembno vlogo v zanki ima His²³, ki skupaj s Trp²⁰² omogoča vezavo karbonylne ali karboksilne skupine C-konca substrata (10, 11). Izražanje katepsina X je omejeno predvsem na celice imunskega sistema, kot so monociti, makrofagi (Slika 1B) in dendritične celice (12).



Slika 1: Struktura prokatepsina X in izražanje katepsina X v sesalskih celičnih linijah. (A) Struktura prokatepsina X. (B) Barvanje aktivnega katepsina X v monocitni celični U937, po diferenciaciji v makrofage (13). Merilo, 5 μ M.

V imunskih celicah se prokatepsin X nahaja v lizosomih, aktivna oblika pa je lokalizirana tudi ob celični membrani. Katepsin X se ni sposoben sam procesirati, zato so pri njegovi aktivaciji udeležene druge lizosomske endopeptidaze, kot je katepsin L. Okoliščine in mehanizem prenosa katepsina X na membrano še ni pojasnjen. Povečano izražanje katepsina X je značilno tudi za tumorske in imunske celice raka prostate, pozno obliko gastričnega karcinoma, posebno pri bolnikih okuženih s *H. pylori* in možganske celice bolnikov z Alzheimer-jevo boleznijo.

Katepsin X ima specifično vlogo pri procesih celičnega signaliziranja. Cepi β_2 podenoto integrinskih receptorjev in tako na različnih stopnjah regulira delovanje imunskih celic (14).

1.4 Integrini

Integrini so družina glikoziliranih, heterodimernih transmembranskih adhezijskih receptorjev in so sestavljeni iz dveh nekovalentno vezanih podenot alfa in beta. Posredujejo interakcijo med zunajceličnim okoljem ter med aktinskim citoskeletom. Celično migracijo regulirajo tako, da omogočajo medcelično adhezijo in adhezijo celic na zunajcelični matriks. Poleg tega integrini delujejo tudi kot signalni receptorji, saj posredujejo prenos signalov v obeh smereh prek plazemske membrane in tako vplivajo na celično rast, diferenciacijo in proliferacijo. Vežejo se na specifične ligande, ki so lahko molekule na površini drugih celic (ICAM-1-intercellular adhesion molecule 1, VCAM-1-

vascular cell adhesion molecule-1) ali molekule zunajceličnega matriksa (laminin, kolagen, fibrinogen, fibronektin...) (15).

1.5 LFA-1

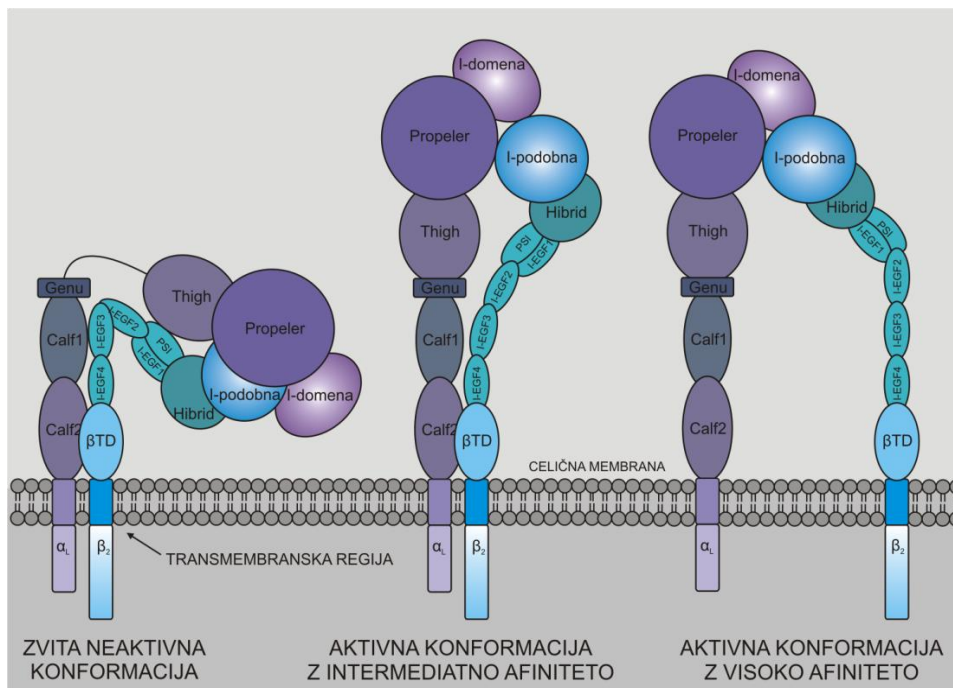
LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) je β_2 integrinski transmembranski receptor, ki je močno izražen na limfocitih T. Je heterodimerni protein z nekovalentno povezavo alfa (CD11a) in beta verige (CD18). LFA-1 je vključen v različne celične procese kot so adhezija, migracija, signaliziranje, apoptoza, citotoksičnost, sinteza citokinov in proliferacija limfocitov. Z vezavo na osnovni ligand ICAM-1, ki je na antigen predstavitevni celicah (APC), omogoča aktivacijo limfocitov T, transmigracijo prek endotelija in potovanje v tkivu (16).

LFA-1 zavzema tri različne konformacije, in sicer zvito obliko in dve iztegnjeni obliki (Slika 2). Ko limfociti T krožijo po krvi, je LFA-1 v neaktivni, zviti konformaciji, ki ni sposobna vezave na ICAM-1. Zaprta iztegnjena oblika ima vmesno afiniteto do ICAM-1, odprta iztegnjena oblika pa se lahko najmočneje veže na ICAM-1. Adhezija LFA-1 na ICAM-1 je odvisna od asociacije aktin-vezavnih proteinov s citoplazmatskim repom integrinske podenote β_2 . Za visoko-afinitetni LFA-1 je značilno, da je povezana z aktin-vezavnim proteinom talinom, ki posreduje stabilno adhezijo, medtem ko se LFA-1 z intermediatno afiniteto poveže na alfa-aktinin, kar omogoči de-adhezijo (17; Jevnikar in sod., poslano v objavo).

1.5.1 Vpliv LFA-1 na izražanje citokinov

Ena od najpomembnejših nalog interakcije LFA-1 z ICAM-1 je povezava limfocitov T na APC, kar omogoči aktivacijo T-celičnega receptorja (TCR) in sproščanje citokinov limfocitov T. Citokini so skupina majhnih molekulskih (8-25 kD) proteinov, navadno glikoproteinov, ki jih izločajo skoraj vse celice, predvsem pa limfociti in makrofagi. Uravnavajo razmnoževanje, diferenciacijo, efektorske funkcije in preživetje celic. Ko se limfociti Th (celice T CD4+) aktivirajo z ustreznim antigenom, pridobijo efektorske funkcije in začnejo izločati citokine. Na podlagi citokinov, ki jih izdelujejo, razdelimo limfocite Th na limfocite Th1 in Th2. Limfociti Th1 izdelujejo citokine IFN- γ , TNF- α , IL-

2, IL-12 in limfotoksin, ki pospešijo vnetje in uničijo znotrajcelične patogene (celična imunost). Limfociti Th2 izločajo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 in IL-13 ter spodbujajo zunajcelično uničenje parazitov (humoralna imunost). Interakcija med LFA-1 z ICAM-1 spodbuja povečano izločanje citokinov Th1, na sproščanje citokinov Th2 pa deluje inhibitorno. Mehanizem, preko katerega LFA-1 regulira Th1/Th2 odziv še ni pojasnjen (18, 19).



Slika 2: Osnovne konformacije LFA-1. α_L (vijolična) in β_2 (modra) podenoti receptorja LFA-1 sta sestavljeni iz velike zunajcelične regije, hidrofobne transmembranske domene in kratkega citoplazmatskega repa. LFA-1 lahko zavzame tri afinitetne konformacije. Zvita, neaktivna konformacija ima nizko afiniteto do liganda, medtem ko imata lahko aktivni, iztegnjeni konformaciji intermediatno ali visoko afiniteto do ICAM-1. Afiniteta do ICAM-1 je odvisna od kota med domeno hibrid in I-podobno domeno v β_2 podenoti.

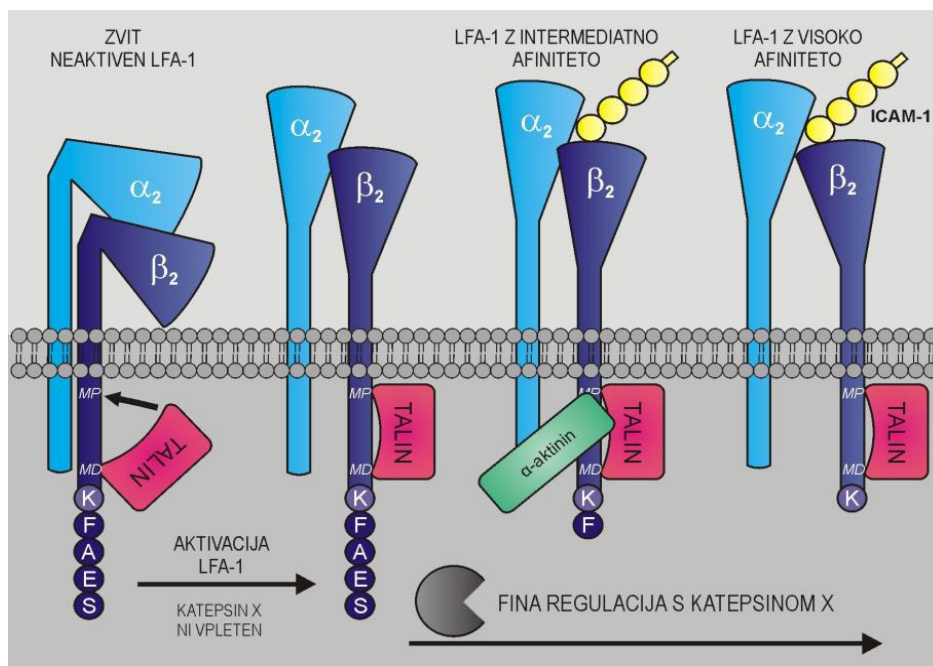
1.6 Povezava katepsina X z LFA-1

V zaporedju prokatepsina X in aktivne oblike encima se nahajata integrin-vezavna motiva RGD (Arg-Gly-Asp) in ECD (Glu-Cys-Asp), kar kaže na verjetno vlogo pri integrinskem signaliziranju in celični adheziji. Katepsin X tvori interakcije z integrini na dva poznana načina. Prokatepsin X se preko motiva RGD veže na zunajcelični del β podenote integrina $\alpha_v\beta_3$ v lamelipodijih endotelijskih celic HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)

in tako uravnava njihove adhezivne lastnosti. Katepsin X pri tem tekmuje s komponentami zunajceličnega matriksa in je vpleten v integrinsko signaliziranje, ki poteka od zunaj v notranjost celice (20). Za aktivno obliko katepsina X pa je bila dokazana močna povezava z integrinsko podenoto β_2 , ki je skupna receptorjem: LFA-1 in MAC-1 (makrofagni antigen-1). Ti receptorji so pomembni pri adheziji levkocitov in prehodu skozi endotelij, aktivaciji nevtrofilcev in monocitov, apoptozi in fagocitozi tujega materiala. Katepsin X odcepi 4 aminokislino na C-koncu citoplazmatskega dela integrinske podenote β_2 in tako regulira vezavo citoskeletnih proteinov na LFA-1, kar vpliva na afiniteto LFA-1 do liganda ICAM-1, reorganizacijo citoskeleta in migracijo limfocitov T (21).

Aktiven katepsin X ne sodeluje pri aktivaciji LFA-1 iz zvite v iztegnjeno konformacijo. Cepitev prvih treh aminokislinskih s C-konca podenote β_2 LFA-1 s katepsinom X poveča afiniteto citoplazmatskega repa β_2 za talin in α -aktinin in spodbudi nastanek konformacije LFA-1 z intermediatno afiniteto. Nadaljnja odcepitev četrte aminokislino še dodatno poveča afiniteto repa β_2 za talin, hkrati pa se pri tem zmanjša afiniteta za α -aktinin. Zadnja stopnja post-transkripcijskega procesiranja s katepsinom X privede do konformacije z visoko afiniteto do ICAM-1. Gre za alternativni način regulacije LFA-1 s cisteinsko karboksipeptidazo katepsinom X (Slika 3) (17; Jevnikar in sod., poslano v objavo).

LFA-1 nadzoruje najpomembnejše fiziološke vloge limfocitov T, zato imajo lahko nepravilnosti pri njegovem delovanju resne patološke posledice, ki vodijo do nastanka avtoimunskih in inflamatornih bolezni. LFA-1 zato predstavlja pomembno terapevtsko tarčo. Med najobetavnejše aplikacije, kjer bi lahko koristno uporabili poznavanje mehanizma delovanja katepsina X na LFA-1 spada zdravljenje luskavice.



Slika 3: Poenostavljen model fine regulacije LFA-1 s katepsinom X.

1.7 Luskavica

1.7.1 Predstavitev bolezni

Luskavica ali psoriza je kronična vnetna avtoimuna kožna bolezen. Spremembe se klinično kažejo z luskastimi, srebrnobelimi, odebljenimi in erimatoznimi kožnimi lehami, ki lahko bolijo, srbijo ali krvavijo. Značilna je za telesne predele kot so komolci, kolena, lasišče in območje križa. Pojavlja se pri 1-3 % populacije in poslabšuje kakovost življenja bolnikom. Luskavica je dedno pogojena, multifaktorsko povzročena bolezen. Etiologija luskavice in patogenetski mehanizmi še niso v celoti razjasnjeni, kar dokazuje, da gre za kompleksen sistem. Luskavica ni le »bolezen epidermisa«. Spremembe v povrhnjici so posledica imunološko pogojenih procesov v usnjici, pri katerih aktivirani limfociti T v koži sprožijo pojav bolezenskih znakov. Osnovne značilnosti so patološka proliferacija in diferenciacija keratinocitov, T-celični infiltrati v usnjici in povrhnjici in spremembe na žilah (angiogeneza, dilatacija) (22, 23).

1.7.2 Tipi luskavice

Luskavica je prisotna v različnih oblikah. Najpogostejša oblika je psoriza vulgaris ali luskavica v plakih, za katero so značilna rdeča, odebeljena, luskasta področja, ki so lahko kjerkoli po telesu. Pogosti sta tudi eritrodermična luskavica, ki prizadane celo telo in generalizirana pustularna luskavica, ki se pojavi v obliki nekužnih gnojnih mehurčkov. 30-40 % bolnikov z eritrodermično obliko razvije artropatsko luskavico in kasneje psoriatični artritis. Streptokokne okužbe pri otrocih večkrat povzročijo kapljično luskavico. Pojavlja se palmoplantarna luskavica, ki je lokalizirana na dlaneh in podplatih (22).

1.7.3 Patogenetsko ozadje

Patogenetski proces (Slika 4) sprožijo različni neznani antigeni, ki povzročijo aktivacijo APC (Langerhansove celice) v usnjici in povrhnjici preko receptorskih molekul na njihovi površini. Aktivirane posredniške celice migrirajo v regionalne bezgavke, kjer preko površinskih receptorskih molekul pride do hitre, reverzibilne reakcije predstavitve antigena limfocitom T, ki so nosilci bolezni. Nadaljna aktivacija limfocitov T poteka preko t.i. kostimulativnega signala (medcelične reakcije), v katerem pride do interakcije molekulskih receptorjev na površini APC in limfocitov T (CD40 in CD40L, CD86 in CD28, ICAM-1 in LFA-1...). Posledično se sprostijo predvsem citokini Th1, kemokini, proteaze in ostali vnetni mediatorji, ki povzročijo vnetje, razrast žil (angiogenezo) in proliferacijo keratinocitov. V nadaljevanju se sproži proliferacija posameznih aktiviranih limfocitov T (spominskih in efektorskih celic), ki preidejo v krvni obtok in povzročajo kronične izbruhe bolezni (23, 24).

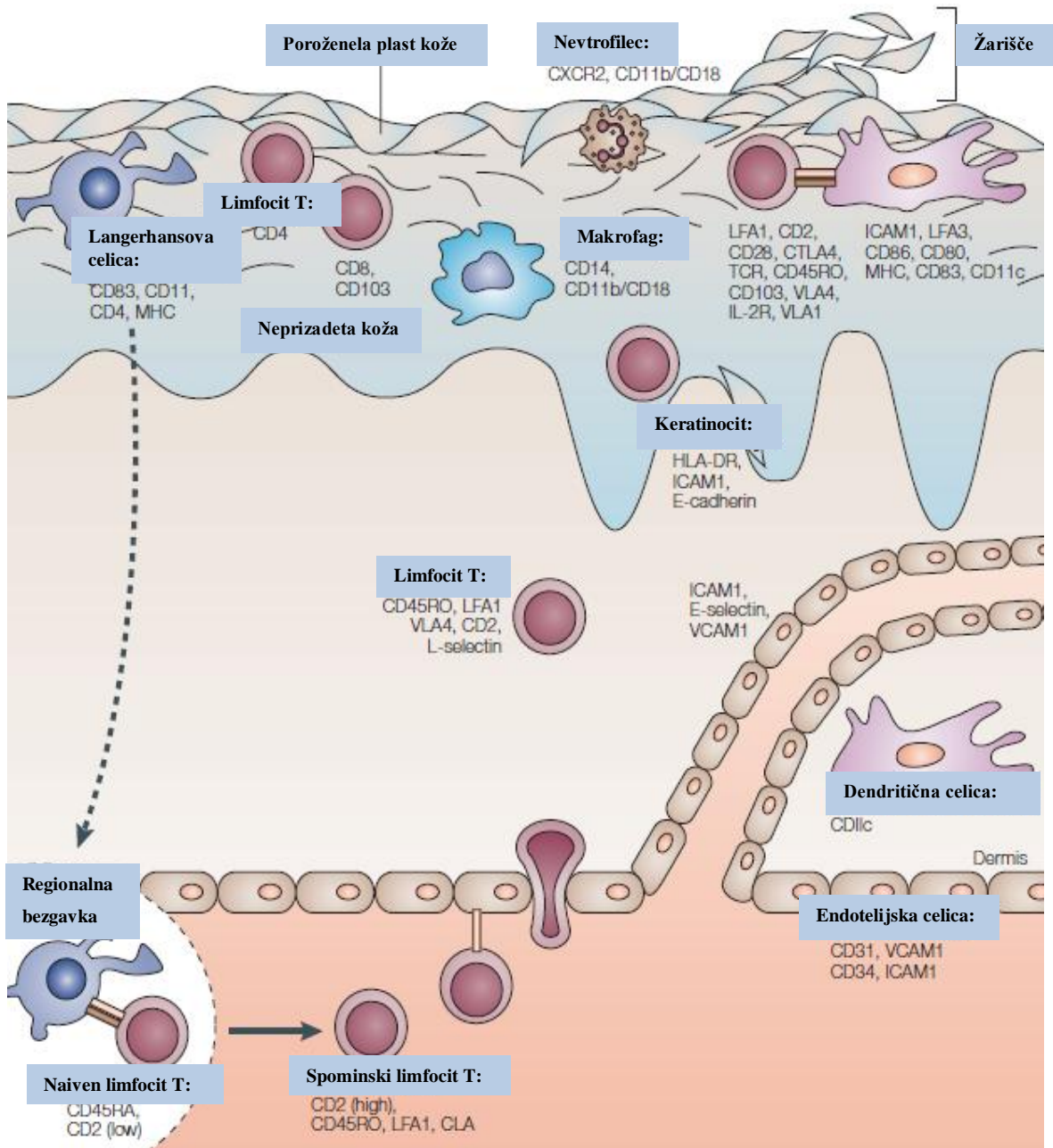
1.7.4 Vloga LFA-1 pri luskavici

1.7.4.1 Vpliv na migracijo in adhezijo limfocitov T

Migracija in adhezija limfocitov T sta temeljnega pomena na večih nivojih psoriatičnega procesa. Da pride do migracije, je v prvi vrsti pomembna adhezija LFA-1 na ICAM-1, ki je odvisna od aktivacije LFA-1 in njegove pretvorbe v visoko-afinitetno konformacijo. Pomembnejši procesi adhezije pri luskavici potekajo v bezgavkah (limfociti T-Langerhansove celice), v endoteliju (limfociti T-endotelijske celice) in v koži (limfociti T-različne APC). Interakcija LFA-1 z ICAM-1 na endotelijskih celicah omogoča transmigracijo limfocitov T preko žilnega endotelija in potovanje na kraj vnetišča-v povrhnjico. Za aktivno luskavico je značilna tudi od LFA-1 odvisna adhezija med limfociti T in keratinociti v povrhnjici (23).

1.7.4.2 Vpliv na izločanje citokinov

Aktivacija limfocitov T v limfnih žlezah in reaktivacija limfocitov T z APC v usnjici in povrhnjici ter citokini, ki jih izločajo APC, spodbudijo limfocite T, da tvorijo citokine. Celice T CD4⁺ (pomagalke) in celice T CD8⁺ (citotoksične celice) izločajo IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-6 in IL-8. Ti spodbudijo keratinocite, da začnejo izražati dodatne mediatorje IL-1, IL-6, IL-8 in TNF- α , ki po avtokrini in parakrini poti sprožijo svojo proliferacijo in podaljšanje luskavičnega procesa. Pri luskavici celice T CD4⁺ po aktivaciji izločajo predvsem citokine Th1: IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-12 in limfotoksin. LFA-1 omogoča interakcijo limfocitov T z APC in tako posredno vpliva na izločanje citokinov. Poleg tega interakcija LFA-1 z ICAM-1 neposredno spodbuja izločanje citokinov Th1, ki so ključni pri luskavici (24, 25).



Slika 4: Imunopatogeneza luskavice. Prikazane so tri pomembnejše faze v patogenezi luskavice: 1) Aktivacija naivnih limfocitov T v limfnih žlezah. 2) Migriranje spominskih limfocitov T skozi endotelijske celice v tkivo. 3) Reaktivacija limfocitov T z APC (dendritične celice, makrofagi, keratinociti) v usnjici in povrhnjici (22).

1.7.5 Zdravljenje luskavice

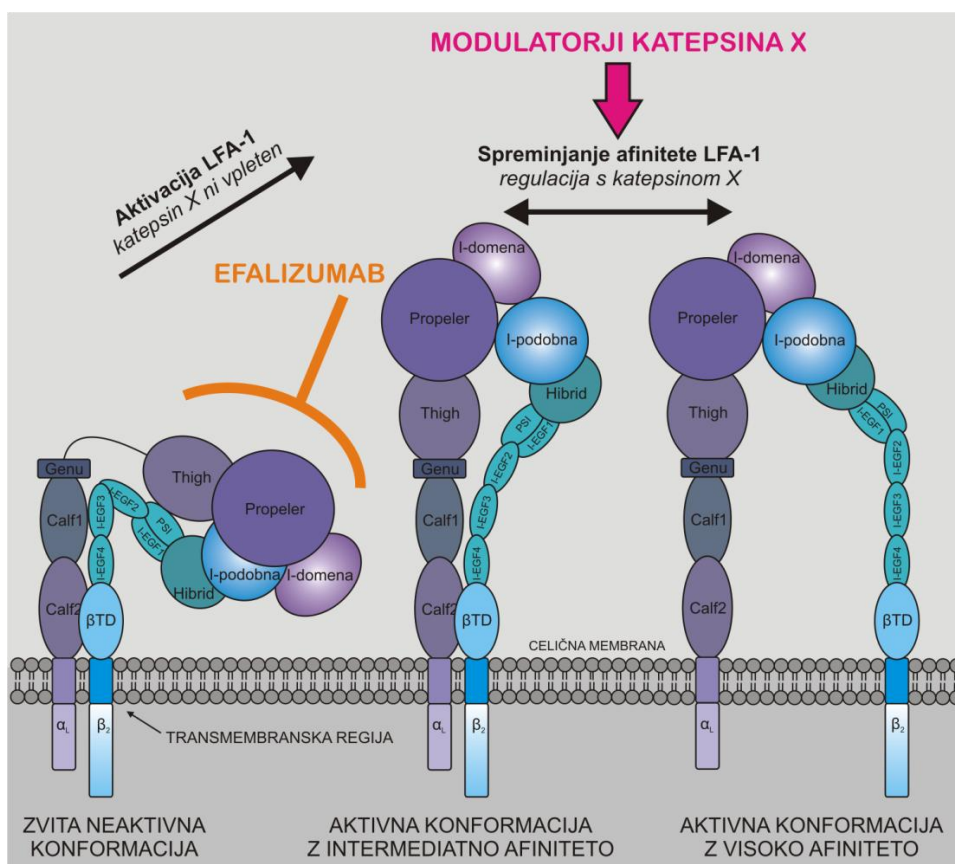
Z odkrivanjem patogeneze luskavice se odpirajo nove poti k zdravljenju le-te. Najpomembnejši dejavnik učinka zdravljenja je izboljšanje kakovosti bolnikovega življenja. Osnovno merilo pri načrtovanju zdravljenja je ocena razmerja med učinkovitostjo zdravljenja in z njim povezanimi neželenimi učinki. Še zmeraj se uporablja lokalno zdravljenje luskavice, ki zavira celično delitev keratinocitov, foto(kemo)terapija in sistemsko zdravljenje usmerjeno proti imunskim mehanizmom. Kot lokalna terapija je najpogostejše zdravljenje s kortikosteroidi in salicilno kislino; uporablja se tudi kalcipotriol, tazaroten, antralin in pripravki katrana. Foto(kemo)terapija se izvaja pri težjih oblikah luskavice. Uporablja se UVA sevanje z valovno dolžino 365 nm v kombinaciji s fotoaktivnimi furokumarini (PUVA terapija) in UVB sevanje, ki je varnejše. PUVA poveča verjetnost za nastanek malignega melanoma in drugih kožnih rakov. Za najtežje oblike luskavice je na razpolago sistemsko zdravljenje z retinoidi, metotreksatom in ciklosporinom. Metotreksat zavira obnavljanje kostnega mozga, povzroča poškodbe plodu, hepatotoksičnost in oportunistične okužbe. Tveganje ciklosporina in retinoidov je nefrotoksičnost, povišanje holesterola in verjetnost za okužbe. Zaradi številnih neželenih učinkov starejših zdravil so v ospredju biološka zdravila, ki preprečujejo nastajanje citokinov ali regulirajo LFA-1 na imunskih celicah (23, 26, 27).

1.7.5.1 Efalizumab

LFA-1 se na celicah nahaja v zviti neaktivni konformaciji ali v odprti aktivni konformaciji, ki je sposobna vezati molekulo ICAM-1. Anti-LFA-1 terapija, ki se uporablja ali razvija za zdravljenje luskavice, temelji na preprečevanju interakcije med LFA-1 in ICAM-1. Uveljavljeno humanizirano monoklonsko protitelo efalizumab (Raptiva®) se veže na LFA-1 in sterično ovira vezavo ICAM-1 ter ohranja LFA-1 v neaktivni konformaciji (Slika 5). Na ta način prepreči migracijo in druge od LFA-1 odvisne funkcije limfocitov T. Ker popolnoma omeji delovanje limfocitov T, je efalizumab močen zaviralec imunskega odziva in lahko prizadene obrambo gostitelja proti okužbam. Poveča lahko tveganje za tuberkulozno pljučnico in reaktivira latentne, kronične okužbe. Zaradi tveganja za resne neželene učinke, je bilo zdravilo Raptiva® letos umaknjeno iz tržišča.

1.7.6 Katepsin X in luskavica

Katepsin X s cepitvijo LFA-1 vpliva na prehod med aktivnima konformacijama z vmesno in visoko afiniteto do ICAM-1. Z uravnavanjem aktivnosti katepsina X, bi lahko specifično regulirali afiniteto LFA-1 do ICAM-1, s tem pa ne bi popolnoma preprečili interakcije med obema molekulama (Slika 5). Zdravljenje s pomočjo uravnavanja katepsina X, bi bilo veliko bolj specifično in manj immunosupresivno, kot uporaba obstoječih anti-LFA-1 terapevtikov.



Slika 5: Prikaz delovanja efalizumaba in modulatorjev katepsina X na različne konformacije LFA-1. Efalizumab se veže na LFA-1 in sterično ovira vezavo ICAM-1 ter ohranja LFA-1 v neaktivni konformaciji. Modulatorji katepsina X z zmanjšanjem aktivnosti katepsina X preprečijo prehod iz vmesne v visoko-afinitetno konformacijo LFA-1.

2 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

Cisteinska proteaza katepsin X regulira T-celični integrin LFA-1, ki ima ključno vlogo pri patogenezi luskavice. Namen diplomskega dela je razvoj enostavnega in učinkovitega celičnega modela proliferajočih keratinocitov za študij vloge katepsina X pri luskavici.

- a) Celično linijo limfocitov T in primarne celice T CD4+ bomo obdelali z modulatorji katepsina X in ovrednotili vpliv modulatorjev na proliferacijo limfocitov T.
- b) Celično linijo keratinocitov in primarne keratinocite bomo obdelali z modulatorji katepsina X in ovrednotili vpliv modulatorjev na proliferacijo keratinocitov.
- c) Celično linijo keratinocitov in primarne keratinocite bomo gojili v kondicioniranih gojiščih limfocitov T, ki so bili obdelani z modulatorji katepsina X in ovrednotili vpliv na proliferacijo keratinocitov.
- d) Primerjali bomo odzivnost modelov s celičnimi linijami in s primarnimi celicami ter izbrali najprimernejše modele za nadaljne študije vloge katepsina X pri aktivaciji limfocitov T in proliferaciji keratinocitov.

Naša hipoteza je, da modulacija katepsina X preko integrina LFA-1 spremeni izražanje citokinov limfocitov T, ki vplivajo na proliferacijo keratinocitov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti

Preglednica I: Reagenti, ki smo jih uporabili pri praktičnem delu.

<i>REAGENT</i>	<i>PROIZVAJALEC</i>
DMSO	GibcoBRL (Invitrogen)
EDTA (0,02%)	Promega
etanol (70%, 96%)	Riedel-deHaën
FCS	Hyclone
ionomicin	Sigma
KH ₂ PO ₄	Riedel-deHaën
L-glutamin	ICN Biomedicals Inc.
MEM	Sigma
MTS	Promega
NaCl	Kemika
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	Riedel-deHaën
neesencialne aminokisline	Sigma
nigrozin	Sigma
PBS	GibcoBRL (Invitrogen)
penicilin	Sigma
PMA	Sigma
RPMI 1640	GibcoBRL (Invitrogen)
streptomycin	Sigma
trypsin	Sigma

3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica II: Uporabljena laboratorijska oprema.

<i>OPREMA</i>	<i>TIP IN PROIZVAJALEC</i>
analizna tehtnica	EXACTA 610 EB, Tehtnica
celični inkubator	BINDER
centrifuge	Sorvall RT7 Eppendorf 5804R Eppendorf 5415R
čitalec mikrotitrskih plošč	TECAN Safire ²
hemocitometer	Blau Brand, Germany
invertni mikroskop	Nikon TMS-F
komora z laminarnim pretokom zraka	PIO SMBC 183 AV
magnetno mešalo	Roamix 550 MM, Tehtnica
vodna kopel (37°C)	Memmert
pH meter	HANNA HI9321 microprocessor pH meter
pipete	0,5-10 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl, Eppendorf
spektrofotometer	Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, Nanodrop Technologies, Inc. USA
stresalnik	Vibromix 403, Tehtnica
suhi inkubator	WTB Binder
vibracijsko mešalo (vortex)	Vibromix 104EV, Tehtnica

3.1.3 Rastopine in gojišča

3.1.3.1 Gojišča

- Kompletno gojišče RPMI (celice Jurkat, celice T CD4+)
 - 10 ml FCS
 - 1 ml L-glutamina
 - 1 ml penicilina/streptomicina
 - 88 ml advanced RPMI 1640

- Kompletno gojišče za NCTC2544
 - 10 ml FCS
 - 1 ml L-glutamina
 - 1 ml penicilina/streptomicina
 - 1 ml neesencialnih a.k.
 - 87 ml MEM

- Zamrzovalno gojišče
 - 100 µl DMSO
 - 400 µl FCS
 - 500 µl gojišča (gojišče NCTC za keratinocite, gojišče RPMI za Jurkat)

- Kompletno gojišče za primarne keratinocite (K-SFM)
 - 1 ml L-glutamina
 - 1 ml ravnega faktorja
 - 5 ml penicilina/streptomicina

Vsa gojišča do uporabe hranimo v hladilniku.

3.1.3.2 Pufri

- *PBS* (fosfatni pufer z dodatkom NaCl):
 - 1,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 - 0,24 g KH_2PO_4
 - 8,0 g NaCl
 - 0,2 g KCl

Dopolnimo z destilirano vodo do 1 l in uravnamo pH na 7,4.

- *PBS* z 0,02 % *EDTA*

3.1.4 Celične kulture

Človeške celice je težje gojiti kot kvasovke ali bakterije, saj za svoje normalno delovanje zahtevajo specifične pogoje (ustrezno temperaturo, pH, ionsko moč). Gojenje celic poteka v gojišču, ki vsebuje vse potrebno za njihovo preživetje, dodan je tudi antibiotik, da ne bi prišlo do okužbe z mikroorganizmi. Vse skupaj je postavljeno v celični inkubator, s katerim nadzorujemo temperaturo in vlago okolja. Vgrajeni so protimikrobni zračni filtri, da ne pride do vdora mikroorganizmov.

Pri delu smo uporabljali tako celične linije kot tudi primarne celice. Celične linije so stabilne celice, ki so zmožne neskončne delitve v celični kulturi ob dodajanju svežega gojišča. Primarne celične kulture pripravijo iz človeških tkiv, ki jih podvržejo delovanju različnih proteaz (tripsin, kolagenaze idr.), da se razgradijo stiki med celicami in stiki celic z matriksom. Celicam dodajo primerno gojišče in jih prestavijo v gojiščno posodo, kjer se pritrjujejo na podlago in tvorijo stike med seboj. To so pritrjene celične kulture. Nekatere celice iz krvi, vranice ali kostnega mozga se zelo slabo pritrjujejo na podlago, vendar jih vseeno lahko gojimo v kulturi. Takim kulturam pravimo nepritrjene ali suspenzijske kulture in so zelo uporabne za študij diferenciacije krvnih celic. Primarne celične kulture po nekaj celičnih delitvah prenehajo rasti, kar je izredno neugodno zlasti v študijah, ki se ukvarjajo s celičnimi delitvami. Rešitev so našli v onkogeni transformaciji (tumorske celice). Te celice lahko rastejo neskončno dolgo (celične linije) (28).

3.1.5 Celice

3.1.5.1 Suspenzijske celice (limfociti T)

- Celice **Jurkat** so pridobljene iz bolnika s T-celično levkemijo in se uporabljajo kot *in vitro* model za študij limfocitov T. Ob dodatku forbolnih estrov (PMA) se poveča izražanje citokinov.
- **Primarne človeške celice T CD4+** so z imunomagnetno izolacijo pridobljene iz človeške krvi. So celice T pomagalk in izražajo na svoji površini membranski glikoprotein CD4. Pomagajo celicam B, da izdelujejo protitelesa. Ko se aktivirajo z antigenom, izločajo številne citokine.

3.1.5.2 Pritrjene celice (keratinociti)

- **NCTC2544** je človeška keratinocitna celična linija z epiteljsko morfologijo in se uporabljajo kot *in vitro* model za študij keratinocitov.
- **Primarni človeški keratinociti** so izolirani iz vzorca zdrave človeške kože, odvzetega med plastično operacijo.

3.1.6 Delo s celicami

3.1.6.1 Odmrzovanje celic

Celične linije so bile predhodno pripravljene in shranjene v tekočem dušiku (-196°C). Odtalili smo jih v vodni kopeli na temperaturi 37°C. Celice smo prenesli v 5 ml kompletnega gojišča za določene celice in jih centrifugirali 5 min pri 1300 obratih na minuto. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v svežem gojišču, predhodno segretim na 37°C, in jih prenesli v gojiščno plastenko.

3.1.6.2 Gojenje celic

Gojenje celic vedno poteka v sterilnem okolju, pri delu z njimi uporabljamo sterilni pribor in sterilne reagente. Celice gojimo v gojiščnih plastenkah pri temperaturi 37°C, v atmosferi, nasičeni z vlago in s 5% CO₂ (celični inkubator). Pokrova gojiščne plastenke, ki je v inkubatorju, nikoli popolnoma ne zapremo. Vsake 3 do 4 dni, ko pritrjene celice (keratinociti) prerastejo 70 do 80% površine gojiščne plastenke, jih tripsiniziramo. To storimo tako, da kulturo speremo s PBS, dodamo 0,02 % EDTA v PBS pufru in tripsin; nato pa približno 10 min inkubiramo pri 37°C. Celice spremljamo pod invertnim mikroskopom in ko se razpustijo ter prosto plavajo po raztopini, dodamo sveže gojišče. S tem namreč zmanjšamo učinek tripsina. Zmes prenesemo v centrifugirko in centrifugiramo 5 min pri 2000 obratih na minuto. Supernatant odlijemo, celice pa resuspendiramo v svežem gojišču. Na tem mestu vzamemo količino celic, ki jih potrebujemo za določen eksperiment (predhodno jih preštejemo), ostale pa vrnemo v gojiščno plastenko, vse skupaj pa nazaj v inkubator. Pri suspenzijskih celicah postopek tripsinizacije ni potreben, saj se te ne priraščajo na podlago, kljub temu pa je potrebno na nekaj dni zamenjati oz. dodati sveže gojišče.

3.1.6.3 Štetje in zamrzovanje celic

Na začetku smo določili število celic na ml suspenzije. 100 μ l celične suspenzije smo dodali 100 μ l 0,2 % nigrozina, ki obarva le mrtve celice, nato pa s pomočjo citometra pod invertnim mikroskopom prešteli vse žive celice. Potem smo izračunali število celic na ml gojišča po naslednji formuli:

$$N=N' \cdot 2 \cdot 10^4 / \text{ml}$$

N.....število celic na ml gojišča

N'.....povprečno število pod mikroskopom prešteti celic

Del gojišča s celicami smo centrifugirali 5 min pri 1300 obr./min, nato odlili supernatant, celice pa resuspendirali v primernem volumnu zamrzovalnega gojišča. Ta vsebuje DMSO, ki med zamrzovanjem prepreči nastajanje kristalov, ti pa bi lahko poškodovali celice. Suspenzijo smo prenesli v vialo, ki smo jo najprej zamrzili na -70°C in pustili čez noč, nato pa shranili v tekočem dušiku.

3.1.6.4 Aktivacija celic s PMA in ionomicinom

Celice T CD4+ smo aktivirali z dodatkom PMA (forbolni ester; forbol 12-miristat 13-acetat) in ionomicina v koncentraciji 10 ng/ml.

3.1.6.5 Priprava kondicioniranih gojišč

V sklopu proučevanja regulacije katepsina X v limfocitih T in posledičnega vpliva na proliferacijo keratinocitov, smo pripravili kondicionirana gojišča. Uporabili smo celice v ustreznih gojiščih (poglavje 3.1.5 in 3.1.3.1) in modulatorje (preglednica III). Razvili smo tri sisteme kondicioniranih gojišč (preglednica IV). Po 24. urah inkubacije smo celice odstranili, supernatante oz. kondicionirane medije pa uporabili v nadaljnjih testih.

Preglednica III: Uporabljeni modulatorji.

ime	opis	koncentracija
kontrola	brez modulatorja	/
DMSO	kontrola za AMS36	sorazmerno s količino AMS36
AMS36	inhibitor katepsina X	2 μ M
CLIK148	inhibitor katepsina L	3 μ M
rcatX	rekombinantni katepsin X	100 nM

Preglednica IV: Kondicionirana gojišča.

1. sistem	celice Jurkat in modulatorji
2. sistem	celice T CD4+ in modulatorji
3. sistem	aktivirane celice T CD4+ in modulatorji

3.2 Postavitev celičnih modelov in vrednotenje proliferacije celic

Želeli smo preveriti kakšen vpliv bi imela regulacija katepsina X v limfocitih T na proliferacijo keratinocitov. Uporabili smo že omenjene celice, modulatorje, kondicionirana gojišča in aktivatorje. Preizkusili smo več različnih modelov v dveh bioloških ponovitvah (preglednica V). V vsako luknjo na mikrotitrski ploščici smo odpipetirali 10^4 celic v 100 μ L gojišča. Za vsak modulator smo porabili 5 lukenj.

3.2.1 Test MTS

Gre za neradioaktivno kolorimetrično določevanje števila živih proliferajočih celic. MTS je tetrazolijev derivat in je v celicah bioreduciran v vodotopni produkt formazan. Pretvorba MTS-a v formazan se izvede z encimom dehidrogenazo, ki je prisotna v metabolično aktivnih celicah. Količina formazana je izmerjena spektrofotometrično kot absorbanca pri valovni dolžini 490 nm. Absorbanca je direktno proporcionalna številu živih proliferajočih celic v kulturi (29).

Z MTS testom smo preverjali proliferacijo limfocitov T in keratinocitov. Po 24 in 48 urah smo v vsako luknjico dodali 10 μ L reagenta MTS in po dveh urah pomerili absorbanco nastalega formazana na spektrofotometru Tecan. MTS tvori s proliferirajočimi celicami močnejše interakcije in intenzivnejšo barvo.

Preglednica V: Celični modeli. Razvili smo 9 celičnih modelov. Pri vsakem modelu je prikazano, katere celice in katera kondicionirana gojišča smo uporabili in ali smo celice aktivirali. V vseh celičnih modelih so prisotni modulatorji.

model	celice Jurkat	kondic. gojišče celic Jurkat	celice T CD4+	kondic. gojišče celic T CD4+	celice NCTC	primarni keratinociti	modula -torji	aktivacija (PMA)
1	X						X	
2			X				X	
3			X				X	X
4					X		X	
5						X	X	
6		X			X		X	
7		X				X	X	
8				X		X	X	
9				X		X	X	X

4 REZULTATI

4.1 Postavitev celičnih modelov in vrednotenje proliferacije celic

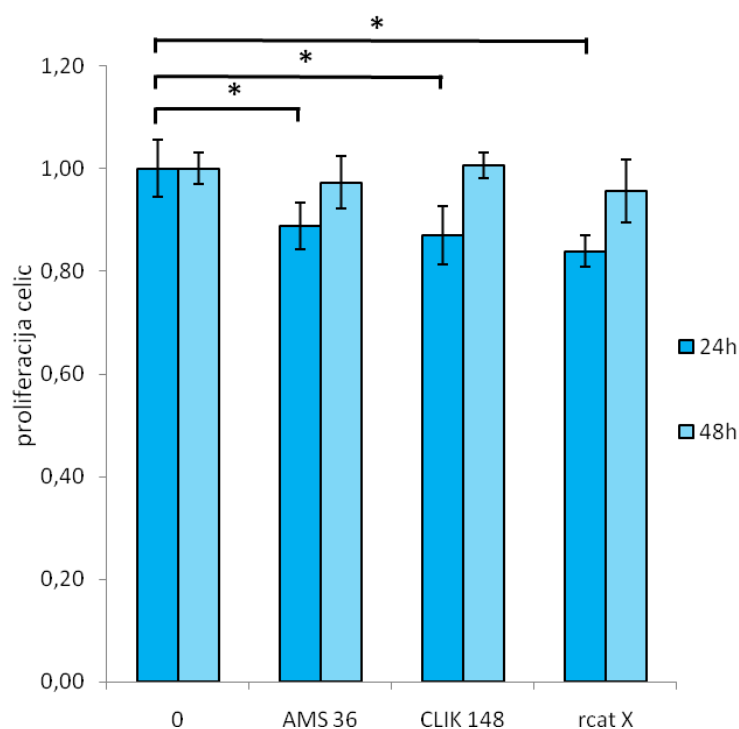
Najprej smo preverjali vpliv modulatorjev na limfocite T (na celice Jurkat, celice T CD4+ in aktivirane celice T CD4+). Zanimalo nas je, ali regulacija katepsina X vpliva na proliferacijo limfocitov T. V drugem sklopu testiranj smo preverjali vpliv modulatorjev na keratinocite (na celice NCTC2544 in primarne keratinocite). Želeli smo potrditi domnevo, da sami modulatorji katepsina X ne vplivajo na proliferacijo keratinocitov. V tretjem sklopu testiranj smo preverjali proliferacijo keratinocitov po dodatku kondicioniranih gojišč limfocitov T, ki smo jih gojili v prisotnosti modulatorjev. Zanimalo nas je, ali modulacija katepsina X povzroči sproščanje citokinov limfocitov T, ki nato spremenijo proliferacijo keratinocitov.

Proliferacijo celic smo ovrednotili z MTS testom, kjer smo merili absorbanco kromogenega produkta formazana. Absorbanca je direktno proporcionalna številu živih proliferajočih celic v kulturi. Grafi predstavljajo proliferacijo celic. Rezultati so povprečja

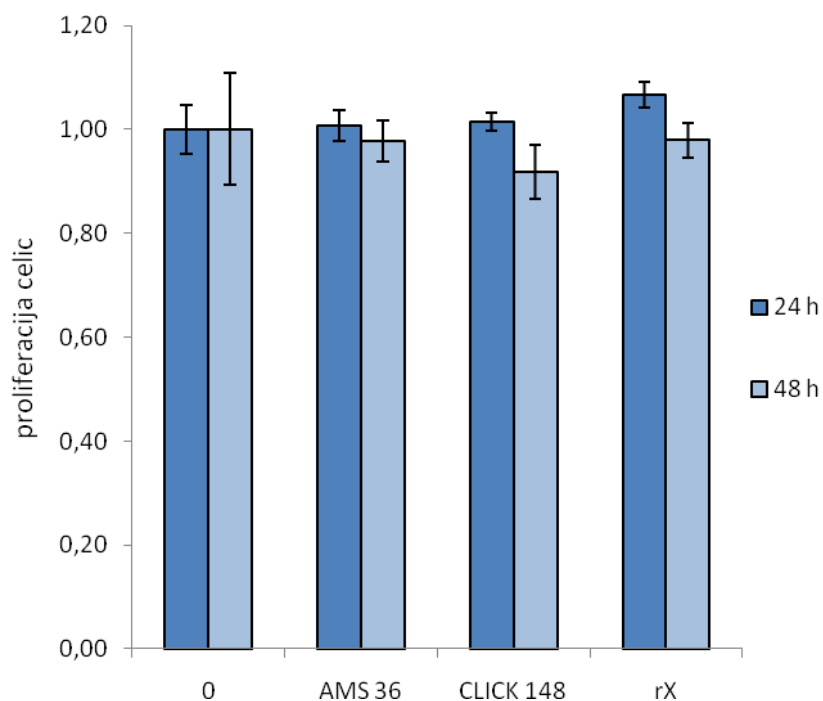
dveh bioloških ponovitev \pm SD in so normalizirani na kontrolo brez modulatorjev. Oznaka * ponazarja, da so razlike statistično značilne ($P < 0.05$).

4.1.1 Vpliv modulatorjev katepsina X na proliferacijo limfocitov T (model 1, 2 in 3)

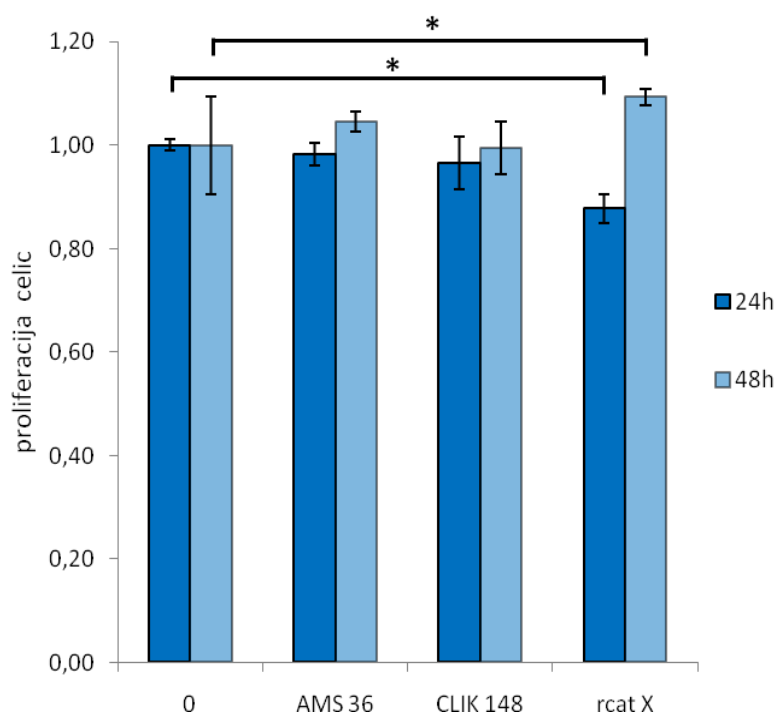
Regulacija aktivnosti katepsina X z inhibitorjema AMS36 in CLIK148 ter dodatek rekombinantnega katepsina X (rcatX) so v 24 urah rahlo znižali proliferacijo celic Jurkat (model 1), vendar se je efekt po 48 urah izgubil. Pri neaktiviranih celicah T CD4+ (model 2) nismo zaznali vpliva modulatorjev katepsina X na proliferacijo. Ko smo celice T CD4+ aktivirali s PMA (model 3), smo zasledili diferencialni vpliv rcatX, ki po 24 urah značilno zmanjša, po 48 urah pa poveča proliferacijo aktiviranih celice T CD4+ v primerjavi s kontrolo.



Slika 6: MODEL 1–Vpliv modulatorjev na proliferacijo celic Jurkat.



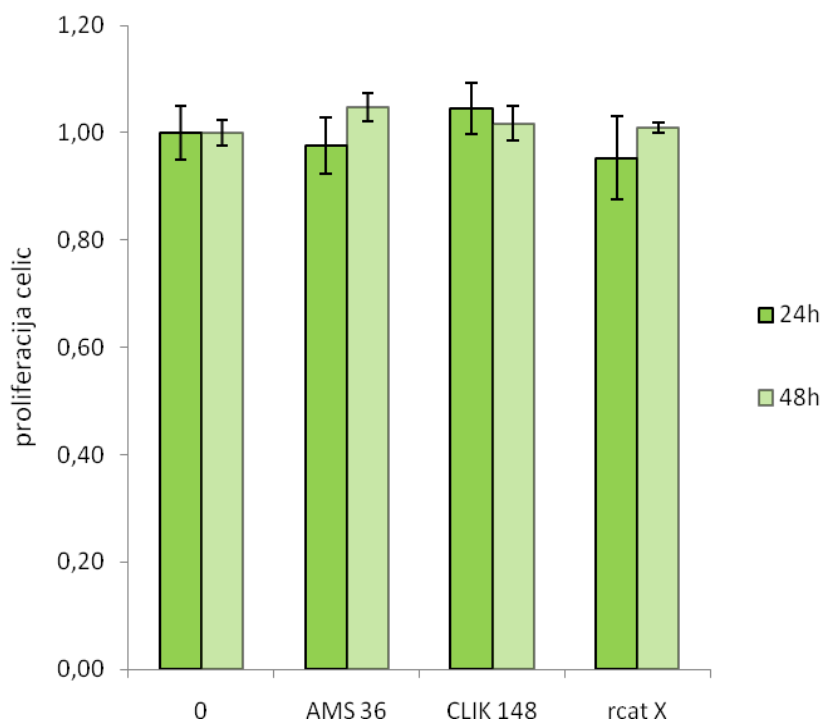
Slika 7: MODEL 2–Vpliv modulatorjev na proliferacijo primarnih celic T CD4+.



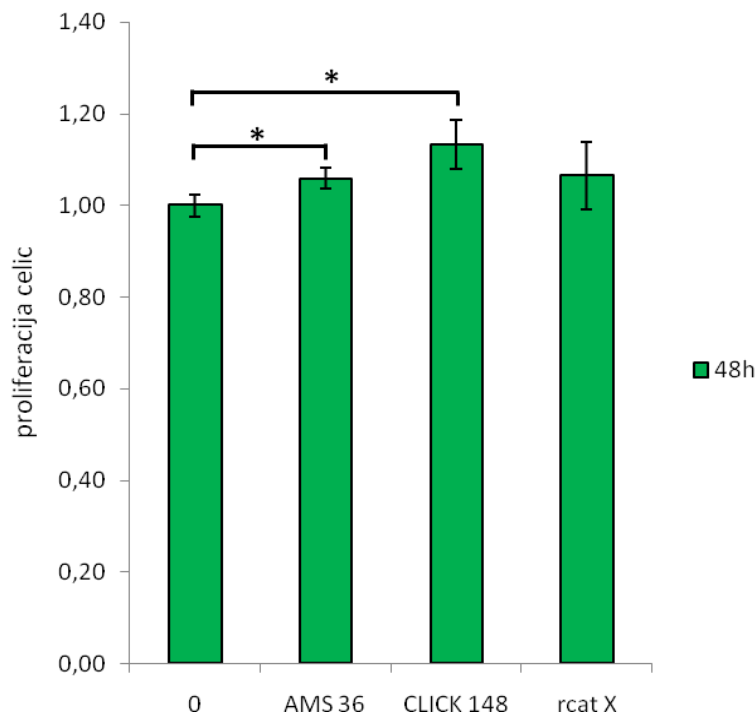
Slika 8: MODEL 3–Vpliv modulatorjev na proliferacijo aktiviranih primarnih celic T CD4+.

4.1.2 Vpliv modulatorjev katepsina X na proliferacijo keratinocitov (model 4, 5)

Regulacija katepsina X pri keratinocitih 2544 ni imela nobenega vpliva na njihovo proliferacijo (model 4). Zanimivo je, da je inhibicija z AMS36 in CLIK148 povečala proliferacijo primarnih keratinocitov (model 5).



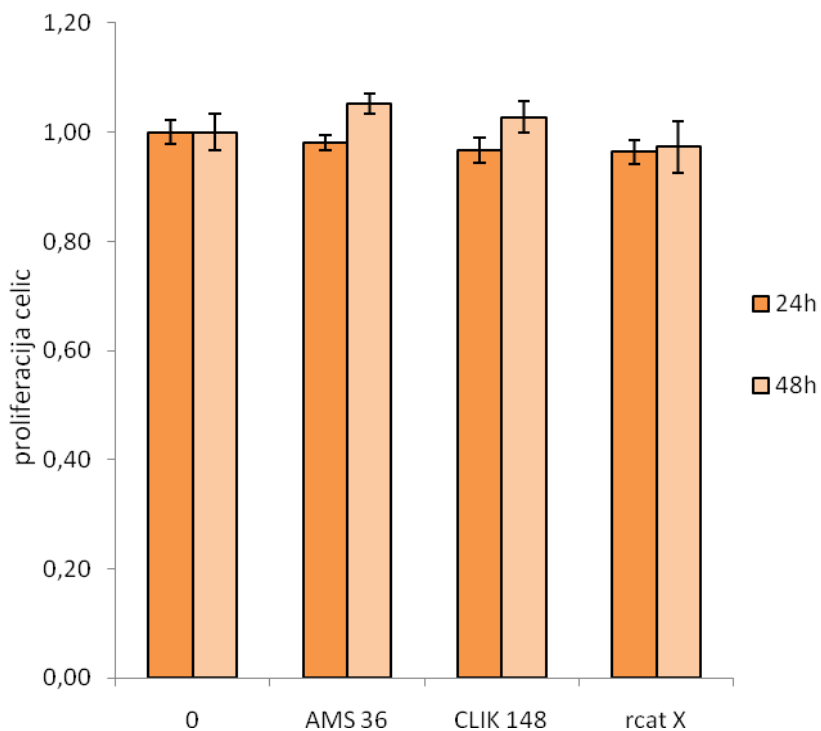
Slika 9: MODEL 4–Vpliv modulatorjev na proliferacijo celic NCTC2544.



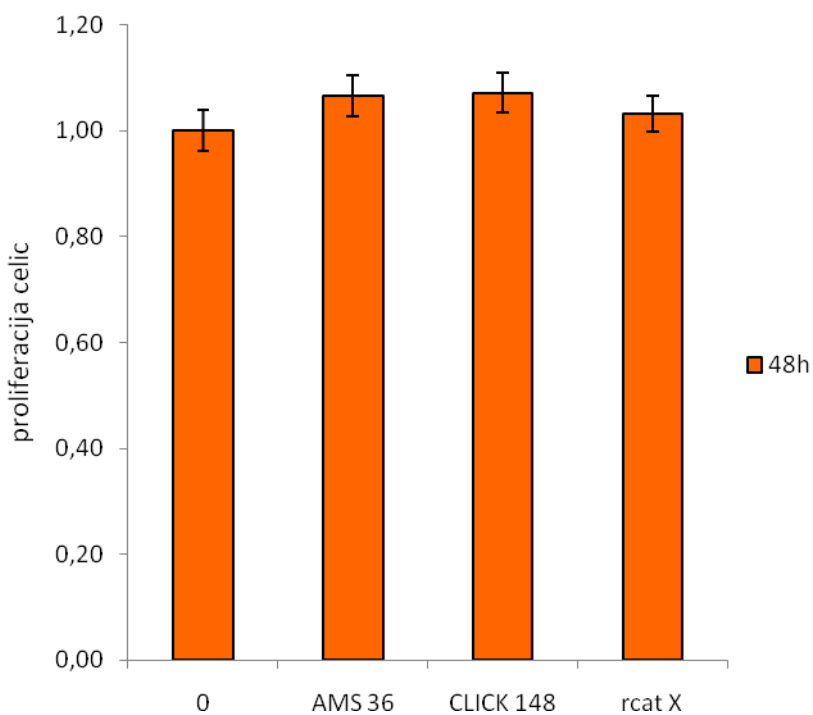
Slika 10: MODEL 5–Vpliv modulatorjev na proliferacijo primarnih keratinocitov.

4.1.3 Vpliv kondicioniranih gojišč limfocitov T na proliferacijo keratinocitov (model 6, 7, 8 in 9)

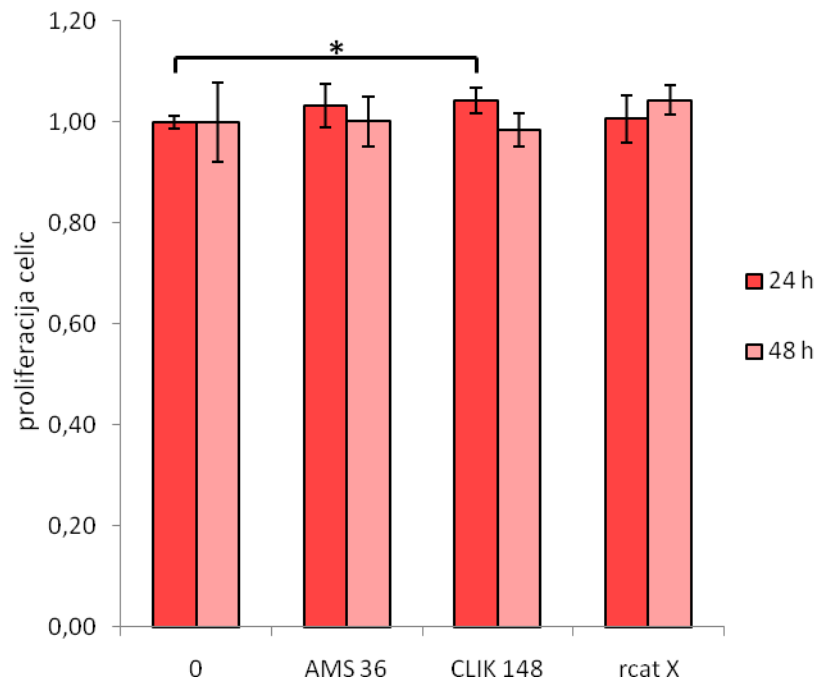
Kondicionirana gojišča celic Jurkat, ki smo jih gojili v prisotnosti modulatorjev katepsina X, niso imela vpliva na proliferacijo celic NCTC2544 in primarnih keratinocitov (model 6 in 7). Kondicionirana gojišča neaktiviranih celic T CD4+ prav tako niso spremenila proliferacije primarnih keratinocitov (model 8). Za najobetavnejši model se je izkazal model 9, kjer smo primarnim keratinocitom dodali kondicionirana gojišča aktiviranih celic T CD4+. Podobno kot pri aktiviranih celicah T CD4+ je kondicionirano gojišče, ki smo ga pridobili po dodajanju rcatX aktiviranim celicam T CD4+, najprej zmanjšalo (24 ur) nato pa povečalo (48 ur) proliferacijo keratinocitov. Povečana proliferacija primarnih keratinocitov zaradi inhibicije katepsina X pri kondicioniranem gojišču aktiviranih celic T CD4+ (AMS36 in CLIK148) sovпада z rezultati modela 5, zato ne moremo izključiti direktnega učinka inhibitorjev na primarne keratinocite.



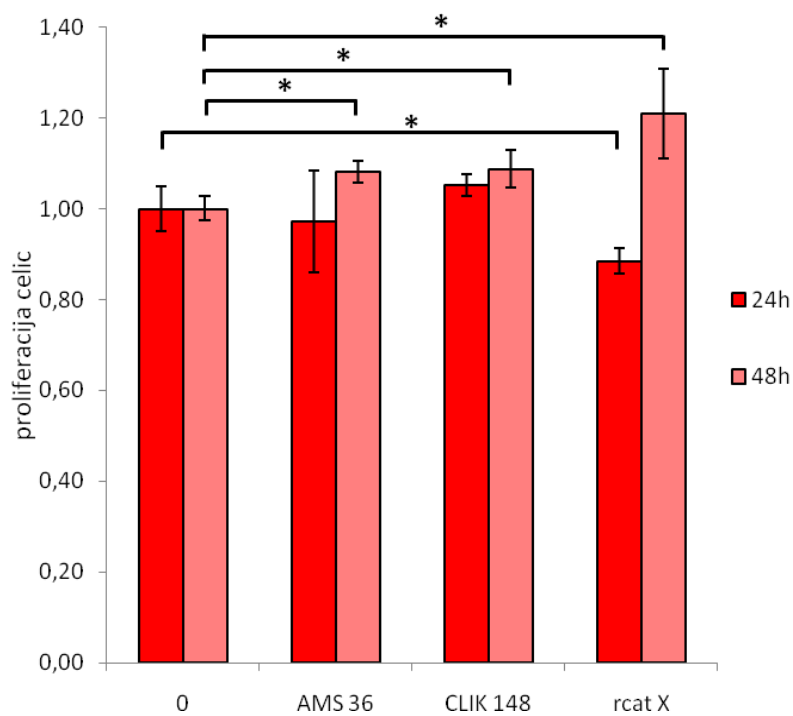
Slika 11: MODEL 6–Vpliv kondicioniranih gojišč celic Jurkat na celice NCTC2544.



Slika 12: MODEL 7–Vpliv kondicioniranih gojišč celic Jurkat na primarne keratinocite.



Slika 13: MODEL 8–Vpliv kondicioniranih gojišč celic T CD4+ na primarne keratinocite.



Slika 14: MODEL 9–Vpliv kondicioniranih gojišč aktiviranih celic T CD4+ na primarne keratinocite.

5 RAZPRAVA

Luskavica je zelo kompleksna kronična vnetna avtoimunska kožna bolezen, ki prizadene približno 2,5 % ljudi. Etiologija luskavice še ni povsem raziskana. Nepoznavanje pravega vzroka za nastanek luskavice onemogoča razvoj učinkovitih zdravil. Zato znana zdravila zaenkrat le blažijo simptome oziroma omejujejo bolezenski proces, ki zapleteno poteka na molekularnem in celičnem nivoju. V ospredju so biološka zdravila, ki preprečujejo povezovanje integrinskega receptorja LFA-1 na limfocitih T z adhezijsko molekulo ICAM-1 na APC in keratinocitih, posledično pa zmanjšujejo infiltracijo limfocitov T v psoriatična področja in sproščanje citokinov IL-2, IFN- γ in TNF- α , ki stimulirajo prekomerno proliferacijo keratinocitov (24). Monoklonsko protitelo efalizumab se veže na LFA-1 in ga blokira v neaktivni konformaciji, kar pa zavre celotni imunski odziv in lahko povzroči nastanek kroničnih okužb. Zaradi številnih neželenih učinkov, ki jih povzročajo obstoječa zdravila, predstavljajo novi, bolj specifični regulatorji LFA-1 privlačno alternativo.

LFA-1 na limfocitih T, ki so nosilci bolezni, je ključen pri luskavici. V bolezenski proces se vpleta na dveh nivojih. Kot adhezijska molekula omogoča migracijo limfocitov T v telesu in povezavo limfocitov T z APC v imunsko sinapso. Poleg tega vpliva na aktivacijo limfocitov T, ki vodi do sproščanja psoriatičnih citokinov. Vpliv na aktivacijo limfocitov T je lahko posreden, tako da omogoča nastanek imunske sinapse ali neposreden. Ker je katepsin X vključen v regulacijo LFA-1, lahko predpostavimo, da ima določen vpliv na bolezenski proces luskavice. Katepsin X ima zaradi modulacije afinitete LFA-1 najverjetneje najpomembnejšo vlogo na nivoju migracije limfocitov T in interakcije z APC. Vpliv katepsina X na sproščanje citokinov in aktivacijo limfocitov T pa še ni raziskan. V okviru diplomske naloge smo želeli postaviti celične modele, ki nam bodo omogočili študij vloge katepsina X pri aktivaciji limfocitov T in proliferaciji keratinocitov.

Znano je, da katepsin X vpliva na migracijo in morfološke spremembe limfocitov T prek interakcije z integrinom β_2 LFA-1 (30). Katepsin X ne sodeluje pri aktivaciji LFA-1 iz zvite v iztegnjeno konformacijo, ampak vpliva na prehajanje med iztegnjenima konformacijama z vmesno in visoko afiniteto do ICAM-1. Postopna cepitev aminokislin s

C-konca podenote β_2 s katepsinom X privede do konformacije LFA-1 z visoko afiniteto (17; Jevnikar in sod., poslano v objavo). Z inhibicijo katepsina X ne bi prišlo do nastanka visoko-afinitetnega LFA-1, hkrati pa imunski odziv ne bi bil v celoti zavrt, saj regulacija katepsina X ne vpliva na aktivacijo LFA-1. Ta domneva daje iztočnico za preizkušanje regulacije katepsina X pri avtoimunskih boleznih kot je luskavica.

Pri našem delu smo katepsin X regulirali z različnimi modulatorji. AMS36 je specifični epoksisukcinilni inhibitor katepsina X, ki naj bi vplival na zmanjšanje afinitete integrina β_2 LFA-1. Znano je, da je cisteinska endopeptidaza katepsin L vključena v aktivacijo katepsina X iz pro- v aktivno obliko (31). CLIK148 je inhibitor katepsina L in tako posredno zmanjša nivo aktivnega katepsina X. Rekombinanten katepsin X (rcatX) je z biotehnološkimi procesi pridobljen katepsin X in naj bi imel obraten učinek kakor omenjena inhibitorja. Predpostavljamo, da bi dodajanje rekombinantnega aktivnega katepsina X spodbudilo nastajanje visoko-afinitetnega LFA-1. Ta konformacija je ključna za aktivacijo in proliferacijo naivnih limfocitov T. Inhibicija nastanka konformacije LFA-1 z visoko afiniteto prepreči sproščanje IL-2 in proliferacijo limfocitov T po aktivaciji TCR (32). Neposredni vpliv modulatorjev katepsina X na proliferacijo limfocitov T in keratinocitov ter posredni vpliv na proliferacijo keratinocitov v kondicioniranih gojiščih limfocitov T, ki so bili obdelani z modulatorji, smo ovrednotili v treh sklopih testiranj.

V prvem sklopu smo opazovali vpliv modulatorjev katepsina X na proliferacijo limfocitov T. Uporabljali smo celično linijo limfocitov T Jurkat in primarne limfocite T CD4+. Zanimalo nas je, ali lahko modulacija katepsina X vpliva na proliferacijo neaktiviranih limfocitov T. Zanimivo, se je pri celicah Jurkat proliferacija zmanjšala po dodatku AMS36, CLIK148 in rcatX po 24 urah, učinek po 48 urah ni bil več opazen (model 1). Proliferacija neaktiviranih primarnih limfocitov T CD4+ je bila popolnoma neodvisna od modulacije katepsina X (model 2). Naši rezultati so pokazali, da modulacija katepsina X pri neaktiviranih celicah Jurkat in T CD4+ dolgoročno (po 48 urah) ne vpliva na proliferacijo limfocitov T. Katepsin X sam verjetno ne aktivira limfocitov T in tako ne vpliva na sproščanje citokinov. Rezultati so bili pričakovani, saj je znano, da začnejo limfociti T množično izločati citokine in proliferirati šele po aktivaciji (33). Limfocite T CD4+ smo stimulirali s PMA (forbolni estri; forbol 12-miristat 13-acetat), ki posredno povzroči nespecifično aktivacijo TCR in stimulira sintezo citokinov (IFN- γ , IL-2 in IL-4),

ki naj bi bili pomembni za aktivacijo in proliferacijo limfocitov T (31, 32). Pričakovano, je stimulacija s PMA spodbudila proliferacijo limfocitov T v primerjavi z neaktiviranimi celicami. Dodatek modulatorjev AMS36 in CLIK148 ni spremenil proliferacije aktiviranih limfocitov T. Po dodatku rcatX pa smo opazili značilno znižanje proliferacije po 24 urah in pričakovano povišanje po 48 urah (model 3), ker naj bi rcatX spodbudil nastajanje visoko-afinitetnega LFA-1, ki je ključen za aktivacijo in proliferacijo naivnih limfocitov T. Za primerjavo smo aktivirali tudi celice Jurkat in monocite v makrofage, a so bili manj odzivni od primarnih limfocitov T (rezultati niso prikazani). Znižanja proliferacije celic Jurkat in aktiviranih primarnih limfocitov T CD4⁺ po 24 urah inkubacije z rcatX še ne znamo pojasniti.

V drugem sklopu testiranj smo želeli preveriti, ali modulacija katepsina X neposredno vpliva na proliferacijo keratinocitov. Pri celicah NCTC2544 ni bilo značilnih sprememb (model 4). Presenetljivo, se je po 48 urah povečala proliferacija primarnih keratinocitov v prisotnosti AMS36 in CLIK148 (model 5). Nedavne raziskave kažejo, da zmanjšanje aktivnosti katepsina L poveča proliferacijo keratinocitov, tako da nadzoruje reciklacijo rastnega faktorja EGF (34). Vloga katepsina X pri keratinocitih še ni raziskana. Neposreden učinek inhibitorjev AMS36 in CLIK148 na primarne keratinocite je prisoten, zato smo ga upoštevali pri ovrednotenju neposrednega učinka ob dodajanju kondicioniranih gojišč limfocitov T primarnim keratinocitom. Dodajanje rcatX ni imelo vpliva na proliferacijo keratinocitov.

V zadnjem sklopu testiranj smo keratinocitom dodali kondicionirana gojišča limfocitov T, ki smo jih gojili 24 ur v prisotnosti modulatorjev katepsina X. Predpostavljali smo, da kondicionirana gojišča vsebujejo citokine, ki so jih limfociti T sproščali v okolje v odvisnosti od modulacije katepsina X. Poleg tega smo upoštevali, da lahko kondicionirana gojišča vsebujejo tudi presežke modulatorjev katepsina X, ki bi lahko neposredno vplivali na proliferacijo keratinocitov. Pri modelu 6, kjer smo celice NCTC2544 gojili v kondicioniranih gojiščih celic Jurkat, do značilnih razlik ni prišlo. Pravtako, ni bilo večjih sprememb pri modelu 7 in 8 (gojenje primarnih keratinocitov v kondicioniranih gojiščih celic Jurkat in v kondicioniranih gojiščih celic T CD4⁺). Verjetno je, da neaktivirani limfociti T tudi po modulaciji katepsina X ne sproščajo citokinov, in tako do proliferacije keratinocitov ne pride. Ko smo primarne keratinocite gojili v kondicioniranih gojiščih s

PMA stimuliranih primarnih celic T CD4⁺ (model 9), smo zaznali precejšnje znižanje proliferacije keratinocitov po dodatku rcatX po 24 urah in povišanje po 48 urah, kar sovпада z modelom 3. Možno je, da rcatX stimulira sproščanje določenih citokinov, ki v prvi stopnji delujejo inhibitorno, dolgoročno pa stimulirajo proliferacijo limfocitov T in keratinocitov. V prihodnosti bi bilo smiselno analizirati, kateri citokini so regulirani z rcatX, in sicer s PCR v realnem času in s pretočno citometrijo. Pravitako bi bilo potrebno potrditi, da rcatX vpliva na sproščanje citokinov in proliferacijo preko regulacije LFA-1 na limfocitih T.

Inhibitorja AMS36 in CLIK148 sta povečala proliferacijo primarnih keratinocitov po 48 urah. Ker smo pri modelu 5 dokazali, da AMS36 in CLIK148 sama po sebi vplivata na proliferacijo keratinocitov, ne moremo izključiti možnosti, da je do povečane proliferacije pri modelu 9 prišlo zaradi neposrednega učinka inhibitorjev iz kondicioniranih gojiščih. To domnevo podpira tudi dejstvo, da AMS36 in CLIK148 ne vplivata na proliferacijo aktiviranih primarnih celic T CD4⁺ (model 3).

Kot najodzivnejši celični model za študij vloge katepsina X pri aktivaciji limfocitov T, se je izkazal model s PMA stimuliranih primarnih limfocitov T CD4⁺ (model 3). Najodzivnejši celični model za študij vpliva modulacije katepsina X pri limfocitih T na proliferacijo keratinocitov je model 9. Oba modela bomo uporabljali pri raziskovanju vloge katepsina X pri luskavici v nadaljnjih raziskavah. Poleg tega smo v diplomski nalogi pokazali, da je vloga katepsina X pri luskavici zelo kompleksna in najverjetneje vključuje različne molekularne mehanizme pri različnih vrstah celic.

6 SKLEPI

Razvili smo enostaven in učinkovit celični model proliferajočih keratinocitov za študij vloge katepsina X pri luskavici.

- a) Celično linijo limfocitov T in primarne celice T CD4+ smo obdelali z modulatorji katepsina X in ovrednotili vpliv modulatorjev na proliferacijo limfocitov T.
- b) Celično linijo keratinocitov in primarne keratinocite smo obdelali z modulatorji katepsina X in in ovrednotili vpliv modulatorjev na proliferacijo keratinocitov.
- c) Celično linijo keratinocitov in primarne keratinocite smo gojili v kondicioniranih gojiščih limfocitov T, ki so bili obdelani z modulatorji katepsina X, in ovrednotili vpliv na proliferacijo keratinocitov.
- d) Primerjali smo odzivnost modelov s celičnimi linijami in s primarnimi celicami ter izbrali najprimernejše modele za nadaljne študije aktivacije limfocitov T in proliferacije keratinocitov.

Potrdili smo hipotezo, da modulacija katepsina X pri limfocitih T vpliva na proliferacijo keratinocitov. Izkazalo se je, da je vloga katepsina X bolj kompleksna kakor smo pričakovali. Mehanizem delovanja katepsina X pri aktivaciji limfocitov T in proliferaciji keratinocitov bo potrebno pojasniti z nadaljnimi raziskavami.

LITERATURA:

- 1) Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 227-233.
- 2) Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Elsevier, Academic Press, London, 2004.
- 3) Jedinak A, Maliar T: Inhibitors of proteases as anticancer drugs. *Neoplasma* 2005; 52(3): 185-92.
- 4) Obermajer N, Doljak B, Kos J: Cysteine cathepsins: regulators of antitumour immune response. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6(12): 1295-309.
- 5) Schweiger A: Biokemijska karakterizacija in fiziološka vloga katepsina H pri malignih obolenjih, Doktorska dizertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 1999.
- 6) Turk V, Kos J, Turk B: Cysteine cathepsins (proteases)-on the main stage of cancer. *Cancer Cell* 2004; 5: 409-410.
- 7) Mohamed MM, Sloane BF: Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(10): 764-75.
- 8) Nägler D, Menard R: Human cathepsin X, a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett* 1998; 434: 135-139.
- 9) Santamaria A, Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Lopez-Otin C: Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* 1998; 273: 16816-16823.
- 10) Gunčar G, Klemenčič I, Turk B, Turk V, Karaoglanovič-Carmona A, Juliano L, Turk D: Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure Fold Des* 2000; 8: 305-313.
- 11) Klemenčič I, Carmona AK, Cezari MHS, Juliano MA, Juliano L, Gunčar G, Turk D, Križaj I, Turk V, Turk B: Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5404-5412.
- 12) Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Zavašnik-Bergant V, Langerholc T, Štefe I, Turk B, Werle B, Golouh R, Jeras M, Turk M: Carboxypeptidases cathepsins X and B display

- distinct protein profile in human cells and tissues. *Experimental Cell Research* 2005; 306: 103–113.
- 13) <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/structure?mid=C01.013>
- 14) Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N: The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell adhesion and migration* 2009; 3(2): 164-166.
- 15) Humphries JD, Byron A, Humphries MJ: Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006; 119: 3901-3.
- 16) Xingyuan M, Wenyun Z, Tianwen W: Leukocyte Funktion-Associated Antigen-1: Structure, Function and Application Prospects. *Protein&Peptide Letters* 2006; 13: 397-400.
- 17) Jevnikar Z, Obrmajer N, Pečar-Fonović U, Karaoglanovic-Carmona A, Kos J: Cathepsin X cleaves the β_2 integrin cytoplasmic tail of LFA-1 inducing the intermediate affinity form of LFA-1 and α -actinin-1 binding. *European Journal of Immunology* 2009; 39(11): 3217-3227.
- 18) Salomon B, Bluestone AJ: Cutting Edge: LFA-1 Interaction with ICAM-1 and ICAM-2 Regulates Th2 Cytokine Production. *J Immunol* 1998; 161: 5138-5142.
- 19) Varga G, Nippe N, Balkow S, Peters T, Wild KM, Seeliger S, Beissert S, Krummen M, Roth R, Sunderkötter C, Grabbe S: LFA-1 Contributes to Signal I of T-Cell Activation and to the Production of Th1 Cytokines. *Journal of Investigative Dermatology* 2010; 130: 1005-1012.
- 20) Lechner AM, Assfalg-Machleidt I, Zahler S, Stoeckelhuber M, Machleidt W, Jochum M, Nägler DK: RGD dependent binding of procathepsin X to integrin α v β 3 mediates cell-adhesive properties. *J Biol Chem* 2006; 281(51): 39588-97.
- 21) Obermajer N, Svajger U, Bogyo M, Jeras M, Kos J: Maturation of dendritic cells depends on proteolytic cleavage by cathepsin X. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 1306-15.
- 22) Gottlieb BA: Psoriasis: Emerging Therapeutic strategies. *Drug discovery, Nature Reviews* 2005; 4: 19-34.
- 23) Miljković J: Luskavica: etiologija in zdravljenje. *Farmacevtski vestnik* 2006; 57: 106-109.
- 24) Das PR, Jain KA, Ramesh V: Current concepts in the pathogenesis of psoriasis. *Indian Journal of Dermatology* 2009; 54(1): 7-12.
- 25) Kristl J: Rekombinantni človeški proteini-nov nabor učinkovin za zdravljenje luskavice. *Med razgl* 2005; 44: 171-182.

- 26) Kristl J: Nove učinkovine za zdravljenje luskavice. *Farmacevtski vestnik* 2006; 57: 110-115.
- 27) Kristl J: Prevladujoče učinkovine za zdravljenje luskavice. *Farmacevtski vestnik* 2006; 57: 196-202
- 28) Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscherr A, Ploegh H, Matsudaira P: *Molecular cell biology*, W. H. Freeman and Company, New York, 2008: 196-197, 380-386, 395-399.
- 29) http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf_404
- 30) Jevnikar Z, Obermajer N, Bogyo M, Kos J: The role of chatepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *Journal of Cell Science* 2008; 121(16): 2652-2661.
- 31) Sivaraman J, Nägler DK, Zhang R, Ménard R, Cygler M: Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol* 2000; 295: 939–951.
- 32) Wang Y, Li D, Nurieva R, Yang J, Sen M, Carreño R, Lu S, McIntyre BW, Molldrem JJ, Legge GB, Ma Q: LFA-1 affinity regulation is necessary for the activation and proliferation of naive T cells. *J Biol Chem* 2009; 284(19): 12645-53.
- 33) Carter LL, Zhang X, Dubey C, Rogers P, Tsui L, Swain SL. Regulation of T cell subsets from naive to memory. *J Immunother* 1998; 21(3): 181-7.
- 34) Reinheckel T, Hagemann S, Dollwet-Mack S, Martinez E, Lohmüller T, Zlatkovic G, Tobin DJ, Maas-Szabowski N, Peters C: The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. *J Cell Sci* 2005; 118(15): 3387-95.