

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANŽE DREMELJ

**PROUČEVANJE VLOGE KATEPSINA X V CELICAH ČLOVEŠKEGA
ADENOKARCINOMA PROSTATE (PC3)**

**STUDY OF CATHEPSIN X's ROLE IN HUMAN PROSTATIC
ADENOCARCINOMA CELLS (PC3)**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko naložbo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka in somentorstvom asist. dr. Zale Jevnikar.

ZAHVALA

Za pomoč pri načrtovanju raziskovalnega dela in pregled naloge se iskreno zahvaljujem mentorju doc. dr. Bojanu Doljaku.

Posebne zahvale veljajo doc. dr. Bojanu Doljaku za vodenje in pomoč pri izvedbi raziskovalnega dela ter za vse napotke, prilagodljivost in večni optimizem. Prav tako gredo zahvale somentorici asist. dr. Zali Jevnikar za strokovno mnenje in vodenje poteka raziskovalnega dela.

Hvaležen pa sem tudi svojim najbližnjim, ki so mi stali ob strani ves čas študija in me vzpodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka in somentorstvom asist. dr. Zale Jevnikar.

Anže Dremelj

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1 PROTEAZE	1
1.2 CISTEINSKI KATEPSINI	2
1.3 PREDSTAVITEV IN POSEBNOSTI KATEPSINA X	3
1.4 INTEGRINI – SIGNALNI RECEPTORJI	5
1.5 POVEZAVA KATEPSINA X Z INTEGRINI	8
1.6 KATEPSIN X IN CELICE PC3 RAKA PROSTATE	9
2. NAČRT DELA IN DELOVNE HIPOTEZE.....	11
3. MATERIALI IN METODE	12
3.1 MATERIALI.....	12
3.1.1 BIOLOŠKI REAGENTI	12
3.1.2 NEBIOLOŠKI REAGENTI.....	13
3.1.3 RAZTOPINE IN GOJIŠČA	15
3.1.4 CELIČNI LINIJI U937 IN PC3	18
3.1.5 LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE.....	19
3.2 METODE	20
3.2.1 GOJENJE HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ.....	20
3.2.2 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTITELESA.....	21
3.2.3 GOJENJE CELIČNIH LINIJ	24
3.2.4 IMUNOCITOKEMIJA	25
3.2.5 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA	28
3.2.6 TEST ELISA	29
3.2.7 PRETOČNA CITOMETRIJA	32
3.2.8 AKTIVNOST KATEPSINA X V PRISOTNOSTI PEPTIDOV PROREGIJE	34
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	35
4.1 IZOLACIJA MONOKLONSKEGA PROTITELESA PROTI KATEPSINU X	35
4.2 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA.....	36
4.3 PRETOČNA CITOMETRIJA	39
4.4 PREPOZNAVANJE PEPTIDOV PROREGIJE PROKATEPSINA X S STRANI PROTITELES 3B10 IN 2F12	43
4.5 AKTIVNOST KATEPSINA X V PRISOTNOSTI PEPTIDOV PROREGIJE	46
4.6 AKTIVACIJA PROKATEPSINA X Z DTT	48
5. SKLEP	51
6. LITERATURA	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Uporabljena laboratorijska oprema in aparature.....	19
Preglednica II: Postopek izvajanja direktnega in indirektnega testa ELISA.....	31

KAZALO SLIK

<i>Slika 1-1:</i> Shematski prikaz terciarne strukture prokatepsina X	4
<i>Slika 1-2:</i> Celična invazija v ECM	7
<i>Slika 1-3:</i> Signalizacijska pot integrina $\alpha V\beta 3$ v celicah raka prostate	10
<i>Slika 3-1:</i> Gojiščna plošča s celicami	24
<i>Slika 3-2:</i> Priprava kokulture U937 in PC3 za fluorescenčno mikroskopijo.....	26
<i>Slika 3-3:</i> Gelska kromatografska kolona s protitelesom 3B10-488	28
<i>Slika 3-4:</i> Različni tipi testa ELISA	29
<i>Slika 3-5:</i> Peptidi p#1, p#2 in p#3 v primerjavi s proregijo prokatepsina X	30
<i>Slika 3-6:</i> Princip delovanja pretočnega citometra	33
<i>Slika 4-1:</i> Odvisnost absorbance od koncentracije katepsina X za protitelesi 2F12-a in 2F12-b, določena z direktnim testom ELISA	36
<i>Slika 4-2:</i> Lokalizacija katepsina X v celičnih izrastkih celic PC3	37
<i>Slika 4-3:</i> Celica PC3 s psevdopodijem po tretiranju s PMA.....	37
<i>Slika 4-4:</i> Kolokalizacija katepsina X in integrinov z verigo $\beta 3$ v celicah PC3	38
<i>Slika 4-5:</i> Kolokalizacija katepsina X in integrinov z verigo $\beta 2$ v celicah PC3	39
<i>Slika 4-6:</i> Vpliv fiksacije na prisotnost celokupnega katepsina X in prokatepsina X na površini celic PC3	40
<i>Slika 4-7:</i> Izraženost integrinov $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 3$ na površini celic PC3	41
<i>Slika 4-8:</i> Vpliv različnih dodatkov v rastnem gojišču na prisotnost celokupnega katepsina X in prokatepsina X na površini celic PC3	41
<i>Slika 4-9:</i> Vezava protitelesa 3B10-488 na celice PC3 po dodatku prokatepsina X in katepsina X v gojišče, glede na čas inkubacije	43
<i>Slika 4-10:</i> Prepoznavanje peptidov p#1, p#2 in p#3 s strani protitelesa 3B10-HRP s testom direktna ELISA.....	44
<i>Slika 4-11:</i> Prepoznavanje peptidov p#1, p#2 in p#3 s strani protitelesa 2F12-a z indirektnim testom ELISA	46
<i>Slika 4-12:</i> Aktivnosti katepsina X glede na različne koncentracije dodanih peptidov p#1 in p#3	47
<i>Slika 4-13:</i> Aktivnosti katepsina X glede na različne koncentracije dodanih peptidov p#1 in p#3 ter dodatkom DTT tik pred meritvijo	48
<i>Slika 4-14:</i> Aktivnost prokatepsina X glede na različne koncentracije DTT in spremenjen aktivacijski pufer	49
<i>Slika 4-15:</i> Aktivnost prokatepsina X, aktiviranega z DTT, in katepsina X, aktiviranega s katepsinom L	50

OKRAJŠAVE

A	absorbanca
Ab	protitelo (»Antibody«)
Abz	<i>ortho</i> -aminobenzojska kislina
Ag	antigen
AK	aminokisline
BSA	goveji serumski albumin (»Bovine serum albumin«)
c _k	končna molarna koncentracija
Da	dalton, enota relativne molekulske mase (1Da = 1/12 teže ogljikovega izotopa ¹² C)
DMEM	Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu
Dnp	2,4-dinitrofenil
DTT	ditiotreitol – redoks reagent
EAB	aktivacijski pufer (»Enzyme activation buffer«)
ECM	zunajcelični matriks
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina
EGF	epidermalni rastni dejavnik
EGF-R	receptor za epidermalni rastni dejavnik
ELISA	imunsko-encimski test na trdni podlagi (»Enzyme-linked immunosorbent assay«)
FAK	fokalna adhezijska kinaza (»focal adhesion kinase«)
FCS	telečji fetalni serum
HRP	hrenova peroksidaza (»horse-radish peroxidase«)
HUVEC	človeška endotelna celica popkovne vene (»human umbilical vein endothelial cell«)
ICAM-1	medcelična adhezijska molekula-1
Ig	imunoglobulin
LFA-1	antigen, povezan z limfocitno funkcijo-1 (»lymphocyte function-associated antigen-1«)
mAb	monoklonsko protitelo (»monoclonal antibody«)
MAC-1	makrofagni antigen-1
MEM	minimalno esencialno Eaglovo gojišče
min	minuta
MTP12	gojiščne ploščice z 12 vdolbinicami
MTP24	gojiščne ploščice z 24 vdolbinicami
Mw	molekulska masa

n.d.	ni določeno
NF-κB	jedrni transkripcijski dejavnik κB (»nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells«)
PBS	fosfatni pufer z dodatkom NaCl (»phosphate buffered saline«)
PFA	paraformaldehid
PI-3 kinaza	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PIP ₃	fosfatidilinozitol (3,4,5)-trisfosfat
PKB/Akt	proteinska kinaza B
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat forbolni ester, tumorski promotor
RPMI	gojišče, imenovano po Roswell Park Memorial Inštitutu
TMB	3,3',5,5'-tetrametil-benzidin
Tris	2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol ($C_4H_{11}NO_3$)
UV	ultravijolična svetloba
γ_k	končna masna koncentracija

POVZETEK

Lizosomska cisteinska proteaza katepsin X je v visokih koncentracijah prisotna v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3), vendar njegova vloga v njih še ni poznana. V diplomskem delu smo najprej poskušali identificirati tarče, s katerimi bi katepsin X v celicah PC3 lahko interagiral, in ugotoviti prisotnost in razporeditev (pro)katepsina X, tako v celicah PC3, kot na njihovi površini. Prav tako smo žeeli okarakterizirati prokatepsin X, zlasti njegovo proregijo, ki tvori kovalentno vez s cisteinom aktivnega mesta. Zanimalo nas je, če lahko aktiviramo prokatepsin X, ne da bi kovalentno odcepili njegovo proregijo, in če odcepljena proregija še vedno deluje inhibitorno na katepsin X.

Pri delu smo uporabljali monoklonsko protitelo 2F12, ki prepoznavata katepsin X, in mAb 3B10, ki prepoznavata (pro)katepsin X. Protitelo 2F12 smo v ta namen izolirali in očistili iz hibridomske celične linije s pomočjo afinitetne kromatografije. Pri delu smo uporabljali fluorescenčno mikroskopijo, test ELISA, pretočno citometrijo ter določanje encimske aktivnosti s specifičnim substratom za katepsin X.

Ugotovljeno je bilo, da celice PC3 tvorijo začasne izrastke, imenovane psevdopodiji, in da se na njihovih konicah (PILS) v obliki prstana nahajajo zrna s katepsinom X, ki se kolokalizirajo z integrini $\beta 2$ oz. $\beta 3$. Po dodatku prokatepsina X v rastno gojišče se le-ta veže na površino celic PC3, vezava pa se s časom še povečuje, kar potrjuje prisotnost tarče (najverjetneje integrina $\beta 3$) na plazemski membrani celic PC3. Dodatek forbolnega estra PMA poveča prisotnost (pro)katepsina X na površini celic, medtem ko signalna pot, ki jo sproža epidermalni rastni dejavnik (EGF) ne vpliva na prisotnost (pro)katepsina X na površini celic PC3. Glede na lokalizacijo na plazemski membrani, bi katepsin X lahko imel pomembno vlogo pri medcelični komunikaciji, adheziji in invazivnosti celic adenokarcinoma prostate.

Študija začetnega dela proregije prokatepsina X je pokazala, da je proregija epitop, ki ga prepoznavata protitelo 3B10. Začetni del proregije v obliki peptida s 15 aminokislinami deluje inhibitorno na katepsin X, njegovo inhibitorno delovanje pa zmanjšuje prisotnost reducenta DTT, ki preprečuje, da bi se med peptidom in aktivnim mestom tvorila disulfidna vez. Reducent DTT, prisoten v aktivacijskem pufru, lahko aktivira prokatepsin X.

ABSTRACT

The lysosomal cysteine protease cathepsin X is present in high concentrations in human prostatic adenocarcinoma cells (PC3). Role of cathepsin X in PC3 cells is still unknown. In the present work, we first tried to identify the potential targets for cathepsin X in the PC3 cells and characterised the presence and localisation of (pro)cathepsin X inside and on the surface of PC3 cells. At the same time, we tried to characterise procathepsin X, especially its proregion, that forms a covalent bond with the cysteine residue in the active site of the inactive enzyme. We were interested in activating cathepsin X without covalently breaking its proregion and in the potential inhibitory activity of the proregion towards cathepsin X. During our work, we used monoclonal antibodies 2F12 and 3B10, which recognizes the active and total (together with the inactive proform) cathepsin X, respectively. For this purpose, the 2F12 antibody was isolated and purified from a hybridoma cell line using affinity chromatography. In our research we used several techniques, including fluorescent microscopy, ELISA, flow cytometry and an *in vitro* enzyme activity determination method using a specific cathepsin X substrate.

It was found out, that PC3 cells form temporary protrusions called pseudopodia that contain granules of cathepsin X on their tips (PILS) in the form of a ring, where cathepsin X is colocalised with $\beta 2$ and $\beta 3$ integrins. With the addition of procathepsin X into the growth medium, it binds to the surface of PC3 cells in a time-dependent manner, which confirms the existence of binding targets (probably integrina $\beta 3$) on the plasma membrane of PC3 cells. The addition of the phorbol ester PMA increases the amount of (pro)cathepsin X on the surface, while the signaling pathway triggered by the epidermal growth factor (EGF) does not affect the presence of (pro)cathepsin X on the surface of PC3 cells. On the basis of its localisation on the plasma membrane, cathepsin X could have an important role in intercellular communication, adhesion and invasion of prostate adenocarcinoma cells.

The study of the N-terminal part of the procathepsin X's proregion showed that the proregion represents an epitope recognised by the 3B10 antibodies. The N-terminal part of the proregion as a 15-aminoacid peptide inhibits the activity of cathepsin X, and its inhibitory activity is lowered by the presence of the reducing agent DTT, which prevents the formation of a disulfide bond between the peptide and the active site of the enzyme. DTT, if present in the enzyme activation buffer, is able to activate procathepsin X.

1. UVOD

1.1 PROTEAZE

Proteaze (peptidaze, proteinaze, proteolitični encimi) so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v polipeptidni verigi. Glede na mesto cepitve peptidne vezi jih delimo na ekso- in endopeptidaze. Eksopeptidaze cepijo eno (monopeptidaze) ali več aminokislín (dipeptidaze, tripeptidaze, ipd.) na C-koncu (karboksipeptidaze) ali N-koncu (aminopeptidaze) polipeptidne verige. Endopeptidaze cepijo peptidno vez znotraj polipeptidne verige. Glede na katalitično aminokislino v aktivnem mestu delimo proteaze na več razredov: aspartatne, cisteinske, serinske, treoninske, metaloproteaze in proteaze z neznanim katalitskim mehanizmom. Sodobni sistem delitve proteaz (baza podatkov MEROPS) upošteva njihovo evolucijsko sorodnost in mehanizem delovanja (1,2).

Proteaze so lahko razgrajevalne in regulatorne. Razgrajevalne proteaze hidrolizirajo peptidne vezi do popolne razkrojitve tarčnega proteina, regulatorne pa s cepitvijo ene ali več specifičnih vezi vplivajo na biološko aktivnost proteinov (3). Razgrajevalne proteaze sodelujejo pri nespecifični razgradnji proteoma (celokupnega nabora proteinov v celici, tkivu ali organizmu), regulatorne pa so zadolžene za nadzorovano procesiranje encimov, receptorjev, rastnih dejavnikov in drugih proteinskih tarč. Za pravilno funkcioniranje celic, posledično pa tudi celotnega organizma, je potrebno prepleteno delovanje obeh tipov proteaz. Proteaze z razgradnjo proteinov zunaj in znotraj celic regulirajo osnovne biološke procese, kot so preoblikovanje tkiv, nastajanje novih žil, imunski odziv, reproduktivni procesi, razvoj zarodka, rast in staranje (4). Omogočajo in uravnavajo tudi invazivnost, proliferacijo in migracijo tako pri normalnih kot rakavih celicah.

Zaradi svojega izrazitega vpliva na procese znotraj in zunaj celice so proteaze strogo regulirane. Kljub temu, so pri številnih patoloških procesih dokazali njihovo prekomerno ali nepravilno delovanje. Zaradi tega imajo proteaze velik diagnostični in prognostični potencial pri različnih boleznih, zlasti pri rakavih obolenjih (5). S terapevtskega vidika predstavlja modulacija proteolitične aktivnosti ključen mehanizem za zdravljenje patoloških stanj.

1.2 CISTEINSKI KATEPSINI

Katepsini so lizosomske proteaze, ki jih delimo na serinske (catepsina A in G), aspartatne (catepsina D in E) in cisteinske proteaze (catepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W). Zaradi različne specifičnosti in drugačnih ekspresijskih vzorcev imajo različne fiziološke vloge (6). Cisteinski katepsini spadajo v papainsko družino lizosomskih proteaz (klan CA, družina C1, poddružina A), ki je največja družina in jo najdemo pri bakterijah, rastlinah, nevretenčarjih in vretenčarjih. Poznanih je enajst človeških cisteinskih katepsinov. Nosijo pomembno vlogo v lizosomskem razgrajevalnem sistemu (7,8). Nekateri katepsini so zastopani v vseh tkivih (catepsin B, H, L in C), drugi pa le v nekaterih (catepsin K, V, S, O, F, W in X), kar pri slednjih kaže na njihovo bolj specifično vlogo (6,8). Cisteinski katepsini so večinoma endopeptidaze, z izjemo katepsinov B in X, ki sta karboksipeptidazi, in katepsinov C in H, ki sta aminopeptidazi. Katepsina B in H imata lahko hkrati izraženo tudi endopeptidazno aktivnost (6).

Sprva so domnevali, da delujejo cisteinski katepsini zgolj znotraj celice v lizosому, kjer so bolj ugodni pogoji (rahlo kisel pH 5,0-6,5 in reducirajoči pogoji). Novejše raziskave so pokazale, da jih mnogo deluje tudi izven celice, v citoplazmi ali v drugih celičnih organelih, kjer je pH blizu nevtralnega. Dobro so preučene vloge katepsinov B, K in L v izvenlizosomskem okolju. Katepsin B razgrajuje izvencelični matriks tako znotraj kot izven lizosoma, medtem ko je za katepsin K znano njegovo delovanje pri remodulaciji kosti z osteoklasti (9-11).

Translacija cisteinskih proteaz se začne s sintezo prekurzorjev, velikih 30-50 kDa, ki se glikozilirajo in fosforilirajo v Golgijevem aparatu in se transportirajo v endosome preko manzo-5-fosfatnih receptorjev. Aktivni katepsini se tvorijo s proteoliznimi cepitvami med zorenjem endosomov v primarne in sekundarne lizosome (12). Izjema je katepsin W, ki je lokaliziran v endoplazemskem retikulumu. Aktivni cisteinski katepsini z molekulsko maso 22-28 kDa imajo monomerno kvartarno strukturo ter dve domeni, kjer v eni prevladujejo α -vijačnice, v drugi pa β -strukture. Drugačen je le katepsin C, ki je tetramer z molekulsko maso 200 kDa. Aktivno mesto cisteinskih katepsinov tvorita Cis25 in His195 (šteto po papainu) s tiolat-imidazolnim ionskim parom, kamor se vzdolž v iztegnjeni konformaciji veže substrat (11).

Sprva so mislili, da sodelujejo cisteinski katepsini zgolj pri predstavitev antigena, procesiranju grancimov v endo-lizosomskih veziklih in lizosomskem razgrajevanju

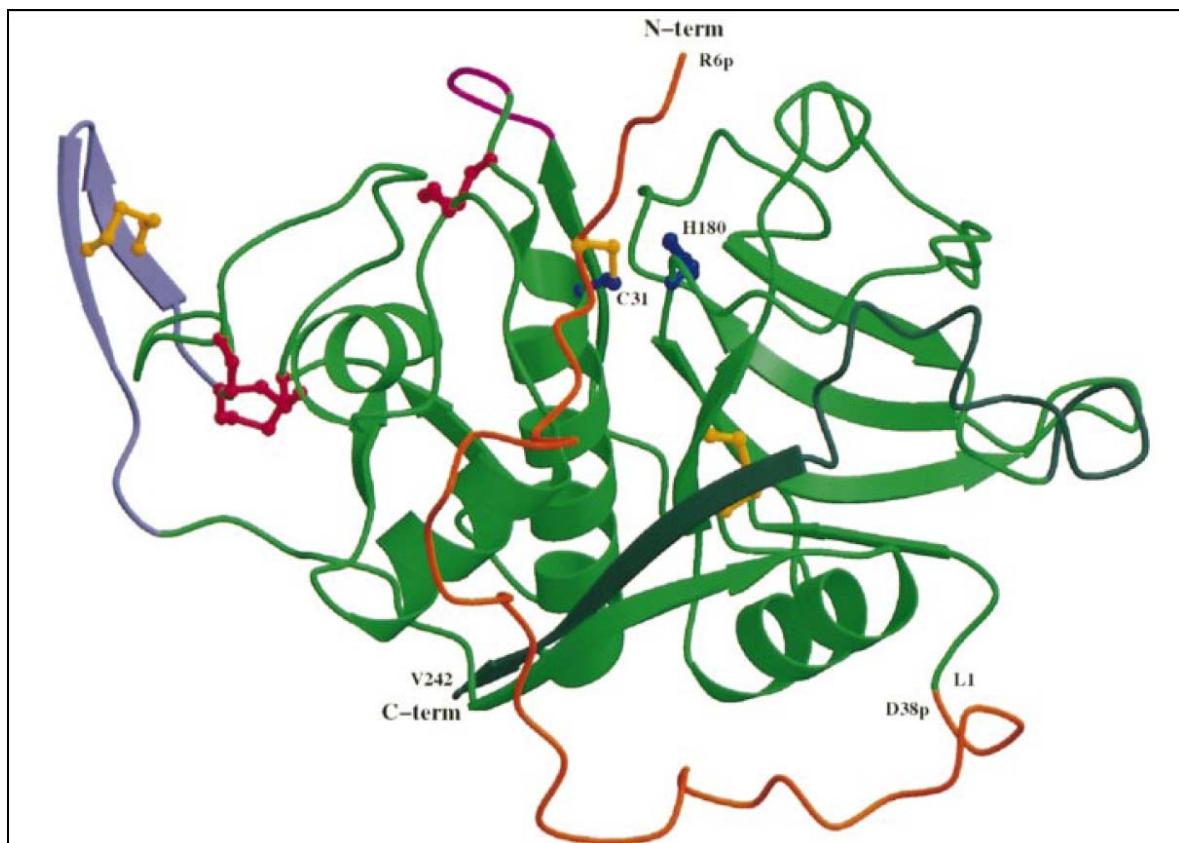
proteinov v in zunaj celic. Danes vemo, da sodelujejo tudi pri apoptozi, preoblikovanju kostnega mozga, reproduktivnih procesih, procesiranju propeptidov in hormonov, procesih diferenciacije ter povečanju gibljivosti in invazivnosti celic. Nepogrešljivi so za učinkovit imunski odziv, saj med drugim vplivajo na diferenciacijo, adhezijo in migracijo imunskih celic ter regulacijo citokinov (13). Moteno uravnavanje encimske aktivnosti katepsinov je povezano s številnimi bolezenskimi procesi, kot so ateroskleroza, revmatoidni artritis, multipla skleroza, pankreatitis, diabetes, luskavica, Alzheimerjeva bolezen, mišična distrofija, nevrološke motnje, osteoporoza, alergične reakcije, prohormonsko procesiranje in rak (9,14,15). Dokazana je bila vloga nekaterih cisteinskih katepsinov pri razgradnji znotrajceličnega in zunajceličnega matriksa, kar lahko vpliva na zgodnji razrast tumorja, tumorsko proliferacijo, angiogenezo in metastaziraje. Zaradi različnih nivojev ekspresije, procesiranja in lokalizacije nekaterih katepsinov v tumorjih pljuč, dojk, možganov, črevesja, glave in vratu, se pri teh boleznih lahko uporablajo kot prognostični in diagnostični kazalci (6).

1.3 PREDSTAVITEV IN POSEBNOSTI KATEPSINA X

Katepsin X (slika 1-1) je lizosomska cisteinska proteaza, ki po strukturi spada v družino papaina in njemu podobnih cisteinskih peptidaz. Aktivirani katepsin X je karboksipeptidaza z izraženim zgolj eksopeptidaznim delovanjem (14). Po svojem delovanju je monokarboksipeptidaza, dikarboksipeptidazne aktivnosti pa niso dokazali (16). Katepsin X najdemo tudi pod imeni katepsin Y, Z, P, B2, IV in karboksipeptidaza LB, ker so ga istočasno odkrile različne raziskovalne skupine. Gen, ki kodira za 303 aminokisline (AK) dolg preprokatepsin X, se nahaja na kromosomu 20q13. Po procesiranju signalnega zaporedja z N-terminalnega konca pre-regije (23 AK) in pro-regije (38 AK) nastane 242 AK dolg aktivni encim (7). V lizosome vstopa preko manzo-6-fosfatnih receptorjev (12).

Od papaina podobnih proteaz se razlikuje po najkrajši proregiji v družini (17). Katepsin B ima 62 AK dolgo proregijo, encimi podobni katepsinu L okoli 100 AK in katepsin F 251 AK dolgo proregijo (18). Proregija se veže kovalentno preko cisteina (Cys10p) s Cys31 v aktivnem mestu encima, kar ne spremeni konformacije aktivnega mesta, ampak stabilizira konformacijo na N-koncu katepsina X. To je prvi odkrit primer proencima, kjer je inhibicija proteolitične aktivnosti s proregijo dosežena z reverzibilno kovalentno

modifikacijo nukleofila na aktivnem mestu. Zato je proregija prokatepsina X krajsa od ostalih (14).



Slika 1-1: Shematski prikaz terciarne strukture prokatepsina X. Proregija je obarvana svetlo rjavo, aktivni encim pa zeleno s 25 AK na C-koncu (temno zeleno) in »mini zanko« (barva fuksije). Veliko vstavljenog zaporedje je obarvano vijolično, disulfidne vezi pa rdeče (konzervativne) in rumeno (unikatne). Cys31 in His180 v aktivnem mestu sta označena temno modro (19).

Aktivno mesto katepsina X, ki se nahaja med obema domenama encima, sestavlja Cys31, His180 in Asn200. His23 predstavlja sidrišče za negativno nabiti C-terminalni del substrata. Največja sprememba substratnega vezavnega mesta glede na ostale katepsine sta S1` in S2` podmesti. Za mesti S1 in S1` ni posebnih zahtev, za S2 pa so predlagali hidrofobno AK (16). Katepsin X ima tudi netipično 3 AK (*Ile-Pro-Gln*) dolgo zaporedje, tako imenovano »mini zanko« med domnevno oksianionsko luknjo Gln22 in aktivnim mestom, kar močno spremeni vezavno mesto S`. V primerjavi s katepsinom B ima katepsin X le eksopeptidazno aktivnost, kar je posledica bolj rigidne »mini zanke« ter Tyr27 in His23, ki ne morata prosti menjati pozicije (18). Zaradi prisotnosti »mini zanke« in stranskih verig His23 in Tyr27, ki se obračata proti aktivnemu mestu in znatno zmanjšata

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

S` vezavno podmesto, je Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH specifičen substrat za katepsin X (16). Zaradi orientacije His23 proti Trp202 in delnega oviranja S2` je najverjetneje zmanjšana aktivnost katepsina X za daljše substrate. Posledično je zaradi steričnega in elektrostatičnega oviranja inhibitor cisteinskih proteaz cistatin C do katepsina X manj učinkovit (18).

Na C-koncu, kjer imajo papainske proteaze centralni β -list, ki poteka skozi sredino encima, ima katepsin X 25 AK dolgo unikatno zaporedje. V strukturi najdemo še eno daljšo vstavljeni zaporedje, z zaenkrat neznano vlogo, ki sestavlja β -upogib in kaže stran od aktivnega mesta (14). Prokatepsin X pa ima unikatne še tri od šestih disulfidnih vezi glede na ostale papainske proteaze.

Večina papainskih proteaz se lahko avtoprocesira do aktivne oblike v kislem (pH 4,0-5,0) (18). Pri prokatepsinu X niso uspeli dokazati avtoaktivacije *in vitro*. Znano je, da ga aktivira katepsin L tako *in vivo* kot *in vitro* (pri reducirajočih pogojih). Vzrok za nezmožnost avtoprocesiranja je unikatna sestava proregije katepsina X, ki je ne najdemo nikjer drugje (18, 20). Proregija katepsina X vsebuje tudi zaporedje RGD, ki sodeluje pri vezavi z integrini, kar je izjema med lizosomskimi cisteinskimi proteazami (21).

Za razliko od prvih navedb, da je katepsin X široko zastopan v celicah in tkivih (17), so nove raziskave pokazale bolj restriktivno ekspresijo, in sicer v celicah imunskega sistema, kot so monociti, makrofagi in dendritične celice (22). Visoke koncentracije katepsina X so odkrili tudi v tumorskih in imunskih celicah prostate (23), črevesnih karcinomih (24), makrofagih iz črevesne sluznice bolnikov okuženih s *Helicobacter pylori* (25) in v možganih bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo (26).

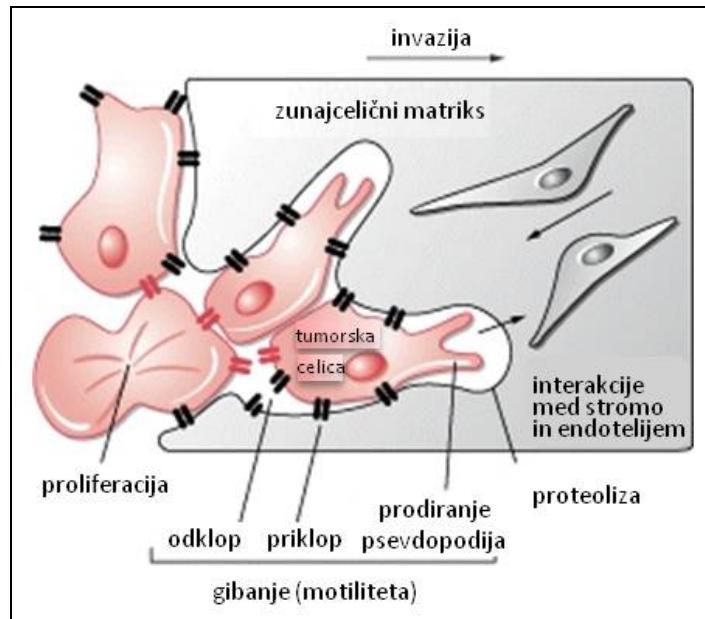
1.4 INTEGRINI – SIGNALNI RECEPTORJI

Integrini so skupina glikoziliranih, heterodimernih transmembranskih adhezijskih receptorjev, ki so sestavljeni iz dveh nekovalentno povezanih α - in β -podenot. Pri človeku tvorijo integrine različne kombinacije 18-ih α -verig in 8-ih β -verig. Najbolje so opisane poddružine integrinov β_1 (CD28), β_2 (CD18) in β_3 (CD61), ki se med seboj razlikujejo po β -verigi. Integrini se lahko vežejo na različne ligande, kot so molekule na celični površini drugih celic (npr. ICAM) ali pa se vežejo na komponente zunajceličnega matriksa (kolagen, fibrinogen, fibronektin, vitronectin, osteopontin, laminin, idr.) (27-29). Tako z adhezijo in vezavo v skupke v celici vežejo citoskeletalne in citoplazemske proteine in

komplekse zasidrajo na aktinski citoskelet. Na ta način lokalno remodulirajo aktin in tvorijo specializirane adhezijske strukture, imenovane fokalne adhezije, ki tvorijo strukturno povezavo med zunajceličnim matriksom (ECM) in aktinskim citoskeletom in so pomembni za prenos signalov (30). Integrinsko adhezijo povezujejo z različnimi celičnimi procesi, kot so rast, migracija, proliferacija in diferenciacija (31, 32). Integrini so signalni receptorji, ki prenašajo signale preko celične membrane v obe smeri (28) in modulirajo citoskeletno organizacijo znotraj celice (31).

Pri limfocitih T se pri procesu migracije spremeni morfologija celice v tako imenovan polariziran fenotip, sestavljen iz lamelipodija (frontalnega dela), osrednjega dela in uropodija (33). Celica se premika naprej, tako da po stabilizaciji lamelipodija preko adhezije integrinov ustvari napetost in kontraktilno silo, nato pa na zadnjem delu sprosti adhezijske interakcije. Za uspešno celično migracijo je ključna asimetrija med močjo adhezijskih interakcij na sprednjem in zadnjem delu celice, zaradi česar je nujna stroga regulacija celične adhezije, in sicer: s koncentracijo liganda, s koncentracijo integrinov, z distribucijo integrinov na celični površini, z afiniteto integrinov do ligandov in afiniteto integrinov do citoskeleta (34).

Invazija celic se pojavlja tako fiziološko kot pri malignih celicah in pomeni premik celice s pomočjo adhezije in proteolize. Celica, ki invadira v zunajcelično okolje, preko aktinske polimerizacije tvori začasne izrastke imenovane psevdopodiji (slika 1-2). Med nastankom psevdopodija se aktivirajo različne membranske proteinaze, receptorji in aktivatorji. Razgradnja matriksa je regulirana z endogenimi inhibitorji proteolize, kar omogoča boljši adhezijski oprijem in omejenost razgradnje na lokalno mikrookolje. Vsaka invazivna celica opravi krožno pot od nastanka psevdopodija, proteolize, antiproteolize, adhezije do deadhezije (35).



Slika 1-2: Celična invazija v ECM (35). Na mestu invazije so vidni začasni izrastki imenovani psevdopodijii.

1.5 POVEZAVA KATEPSINA X Z INTEGRINI

Katepsin X ima na svoji površini dve vezavni mesti za integrine: motiv RGD (Arg-Gly-Asp) na proregiji in motiv ECD (Glu-Cys-Asp) na aktivnem delu encima (17). Primarna pot vezave prokatepsina X na integrine poteka preko motivov RGD ali ECD, ki tekmujeta za aktivno zunajcelično ligandno domeno integrina, po vezavi pa se sproži signaliziranje od zunaj navznoter. Prokatepsin X se kolokalizira z integrini $\beta 3$ tako v promonocitnih celicah U937 (36), kot tudi v lamelipodiju celic HUVEC. Poleg kolokalizacije pride z integrini $\alpha_V\beta_3$ tudi do ko-imunoprecipitacije. Kolokalizacija poteče tudi med integrinom $\beta 3$ in vitronektinom, ki v svoji strukturi prav tako vsebuje motiv RGD. Kolokalizacija je vidna zgolj na membrani, kar kaže na morebitni celični transport z drugimi prenašalcii (npr. s transportnim receptorjem za prokatepsin X - lektinom ERGIC-53). Na interakcijo med prokatepsinom X in integrini $\beta 3$ vpliva koncentracija divalentnih kationov, še posebej Mn^{2+} . Vezava prokatepsina X na integrine $\alpha_5\beta_1$ ni bila dokazana (21).

Aktivna oblika katepsina X je močno povezana z integrinsko podenoto $\beta 2$, ki je skupna receptorjema LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$), in MAC-1 (CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$, 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 aminokisline na C-koncu citoplazemskega dela integrinske podenote $\beta 2$ in tako regulira vezavo citoskeletalnih proteinov na LFA-1, kar vpliva na afiniteto LFA-1 do liganda ICAM-1, reorganizacijo citoskeleta in migracijo limfocitov T (36-38). Kljub številnim raziskavam še ne poznamo točnega mehanizma za prenos (translokacijo) katepsina X na celično membrano. Vemo, da sta v lizosomih prisotni pro- in aktivna oblika katepsina X.

Katepsin X na celični površini veže tudi heparan sulfatne proteoglikane (npr. heparin), ki igrajo pomembno vlogo pri regulaciji integrinov in rastnih dejavnikov ter različnih bioloških procesov, kot so hemostaza, vnetje, angiogeneza, celična adhezija in drugi. Vezava naj bi potekala preko aktivnega mesta pro- in aktivnega katepsina X. K vezavi substratov pripomore tudi elektrostatična interakcija s His23 v »mini zanki«. Vezava heparina inhibira karboksipeptidazno aktivnost katepsina X. Heparan sulfatni proteoglikani vplivajo na proces endocitoze zunajceličnega katepsina X in nadzirajo njegov transport znotraj celice (39).

1.6 KATEPSIN X IN CELICE PC3 RAKA PROSTATE

Rak (adenokarcinom) prostate se najpogosteje pojavlja pri moških po 50-tem letu, pri črnih in tistih z dedno predispozicijo. Je najbolj pogost tip ne-kožnega raka pri starejših moških in med karcinomi, poleg pljučnega raka, povzroča najvišjo smrtnost pri moških. Na razvoj raka prostate vplivata poleg starosti še okolje in prehrana. Širi se lahko direktno z lokalnim napredovanjem (večanjem volumna) ter z žilno in limfatično invazijo. Pri žilni invaziji se rak prostate širi po krvi v oddaljene organe, najprej v kosti, zasevki se pojavijo še v pljučih, nadledvičnici in redkeje v jetrih. Na osnovi širjenja bolezni klinično razlikujemo: lokalizirani rak, ki je omejen na samo žlezo, lokalno napredovali rak, ki se je razširil v okoljno tkivo in bezgavke ter napredovali rak prostate, ki je metastaziral na druge organe (43, 44).

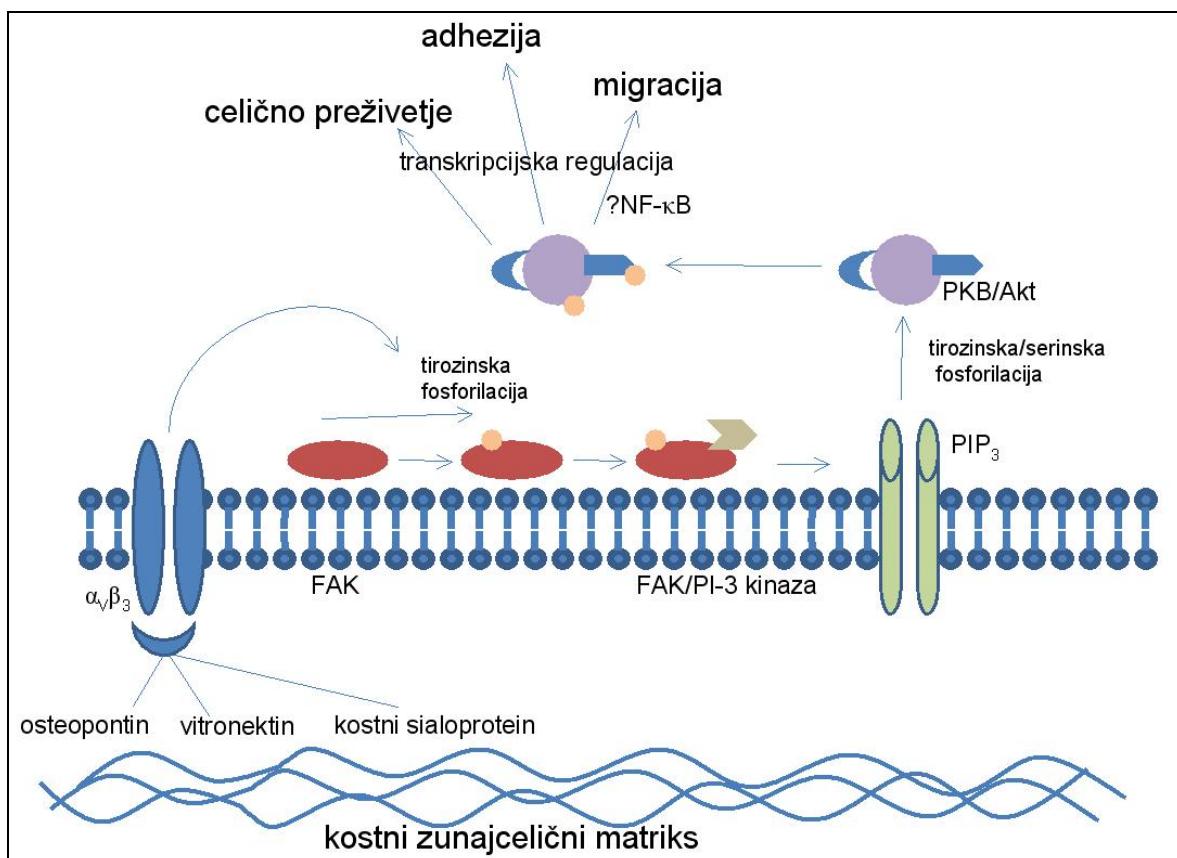
Za rak prostate so v zgodnjih in poznih fazah značilne povišane koncentracije katepsina X. Mehanizem povečanega izražanja katepsina X ni znan, kot možnosti pa navajajo alternativno izrezovanje intronov (splicing), spremembe stabilnosti mRNA ali njegove zmanjšane razgradnje. Nejasno je, ali je katepsin X udeležen pri razgradnji ECM in ali je njegova povišana koncentracija izraz povečane potrebe celic raka prostate po omejeni proteolizi nekaterih proteinov, kot so citokini ali rastni dejavniki. Vloga povišane koncentracije katepsina X pri adenokarcinomu še ni pojasnjena, sklepajo pa, da bi lahko sodeloval pri zgodnji tumorigenezi raka prostate. Ravno tako še ni določena njegova uporabna vrednost kot diagnostičnega kazalca pri zgodnjem odkrivanju raka prostate (23).

Integrin $\alpha_V\beta_3$ je izražen pri veliko primarnih in metastaznih tumorjih raka prostate, tudi celicah PC3, kjer ima ključno vlogo pri rasti tumorskih celic, metastaziranju in tumorsko povzročeni angiogenezi. Domnevajo, da je prav integrin $\alpha_V\beta_3$ odgovoren za metastaziranje rakavih celic v kostni mozeg. Adhezija, migracija in rast tumorskih celic PC3 naj bi potekala preko vitronektina in osteopontina, ki sta komponenti kostnega mikrookolja (21, 45).

Celice PC3 so pridobljene iz kostne metastaze raka prostate (46). *Zheng in sod.* so pri celicah PC3 vezanih na vitronektin in osteopontin preko integrinov $\alpha_V\beta_3$ dokazali interakcijo s fokalno adhezijsko kinazo (FAK) in aktivacijo kinaze PI-3/Akt signalnega mehanizma (slika 1-3) (47, 48). *Romanov in Goligorsky* sta dokazala, da se celice PC3 adherirajo na interlevkin-1 stimulirane celice HUVEC preko integrinov $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_1$ in

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

$\alpha_{III}\beta_1$ (49), kar pa za adhezijo celic PC3 na kostni endotelij preko integrina $\alpha_V\beta_3$ še ni dokazano. Z uporabo antagonistov integrinov $\alpha_V\beta_3$ so sprožili apoptozo angiogenih epitelnih celic in s tem tumorsko regresijo različnih tumorjev (45). Za razjasnitve povezave med prokatepsinom X in integrini so potrebne dodatne študije povezave med tumorsko invazijo, metastaziranjem in s tumorjem povzročeno angiogenezo (21).



Slika 1-3: Signalizacijska pot integrina $\alpha_V\beta_3$ v celicah raka prostate. Vezava integrinov $\alpha_V\beta_3$ z ligandi, kot so osteopontin, kostni sialoprotein (BSP) ali vitronektin, aktivira FAK, ki interagira in aktivira kinazo PI-3. Proizvodi aktivne kinaze PI-3 sprožijo premik PKB/Akt na celično membrano, kjer se aktivira in naprej fosforilira različne substrate v kaskadi. Sprožijo se različni celični odzivi, ki vplivajo na celično preživetje, adhezijo in migracijo. NF-κB je vpletjen v integrinsko $\alpha_V\beta_3$ signalizacijsko transdukcijsko pot, a njegova vloga v celicah raka prostate ni znana (45).

2. NAČRT DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Katepsin X je lizosomska cisteinska proteaza, ki je v velikih koncentracijah prisotna v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3). Njegova vloga v celicah PC3 še ni pojasnjena. Po doslej znanih podatkih, pridobljenih na drugih celicah, vpliva katepsin X na morfologijo, migracijo in adhezijo celic preko interakcije z integrini $\beta 2$ in $\beta 3$. Naš namen je preučiti prisotnost in razporeditev katepsina X in prokatepsina X v celicah PC3 in dokazati povezavo z integrini, kar bi lahko nakazalo vlogo katepsina X pri migraciji, adheziji, proliferaciji in morfologiji celic PC3.

Hipoteza diplomske naloge je, da so integrini tarče katepsina X tudi v celicah PC3. S peptidi proregije prokatepsina X bomo skušali potrditi motiv RGD kot odgovoren vezavni motiv za integrine $\beta 3$. Skušali bomo ugotoviti vpliv različnih stimulatorjev na prisotnost katepsina X in prokatepsina X v celicah PC3. Preverili bomo tudi hipotezo, da lahko prokatepsin X aktiviramo tudi brez procesiranja s katepsinom L.

Načrt dela:

1. Iz hibridomske celične linije bomo izolirali in očistili monoklonsko protitelo 2F12 proti katepsinu X.
2. Pripravljeno mAb 2F12, ki prepozna katepsin X, in mAb 3B10, ki prepozna (pro)catepsin X, bomo uporabili pri encimskoimunske testu na trdni podlagi (ELISA) za kvalitativno in (semi)kvantitativno določitev vsebnosti katepsina X.
3. Z imunocitokemičnimi testi in fluorescenčno mikroskopijo bomo s pomočjo fluorescenčno označenih protiteles opazovali razporeditev (pro)catepsina X v celicah PC3, celično morfologijo, kolokalizacijo (pro)catepsina X z integrini $\beta 2$ in $\beta 3$ ter odziv celic PC3 na kokulturo s celicami makrofagne linije U937.
4. S pretočno citometrijo bomo ugotavliali izraženost integrinov $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 3$, jakost vezave katepsina X in prokatepsina X na površino celic PC3 ter vpliv različnih aktivatorjev na prisotnost celokupnega (pro)catepsina X na površini celic PC3.
5. S peptidi, ki ustrezajo začetnemu, srednjemu in končnemu delu proregije prokatepsina X bomo ugotavliali epitop protitelesa 3B10 in določali morebitno inhibitorno delovanje na katepsin X.
6. Z različnimi koncentracijami reducenta DTT v aktivacijskem pufru bomo poskušali neencimsko aktivirati prokatepsin X.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Biološki reagenti

- Katepsin X, prokatepsin X in peptidi proregije prokatepsina X:

OZNAKA	OPIS	osn. konc.
KatX-a	katepsin X, IJS, junij 2009	0,18 mg/mL = 6,6 µM
KatX-b	katepsin X, FFA, maj 2008	0,26 mg/mL = 9,6 µM
KatX-c	katepsin X, FFA, september 2010	0,94 mg/mL = 34,6 µM
ProX-a	prokatepsin X, IJS, junij 2009	0,9 mg/mL = 28,3 µM
ProX-c	prokatepsin X, FFA, september 2010	1,45 mg/mL = 45,7 µM
p#1	začetni del proregije prokatepsina X (slika 3-5), Biosynthesis Inc., Lewisville, Texas	1,0 mg/mL
p#2	srednji del proregije prokatepsina X (slika 3-5), Biosynthesis Inc., Lewisville, Texas	1,0 mg/mL
p#3	končni del proregije prokatepsina X (slika 3-5), Biosynthesis Inc., Lewisville, Texas	1,0 mg/mL

- Protitelesa proti katepsinu X:

OZNAKA	OPIS	osn. konc.
2F12-a	mAb proti katepsinu X subklon 1C9-2F12-2H2, FFA, maj 2009	1,58 mg/mL
2F12-b	mAb proti katepsinu X subklon 1C9-2F12-2H2, FFA, izolat A.D. januar 2010	0,64 mg/mL
3B10	mAb proti prokatepsinu X/ katepsinu X subklon 5C1-3B10-2F7, IJS, junij 2007	0,95 mg/mL
3B10-HRP	mAb proti prokatepsinu X/ katepsinu X konjugirana s HRP subklon 5C1-3B10-2F7, avgust 2007	n.d.
3B10-488	mAb proti prokatepsinu X/ katepsinu X konjugirana z Alexa Fluor® 488 subklon 5C1-3B10-2F7, označena z Alexa Fluor® 488, FFA, maj 2010	0,359 mg/mL

- Ostala protitelesa:

TIP PROTITELESA	OPIS	osnovna konc.	PROIZVAJALEC
Ab proti integrinu $\beta 1$ (M-106)	kunčja poliklonska sc-8978 Lot #E2704	200 $\mu\text{g/mL}$	Santa Cruz Biotechnology
Ab proti integrinu $\beta 2$ (N-19)	kozja poliklonska sc-6624 Lot #D1709	200 $\mu\text{g/mL}$	Santa Cruz Biotechnology
Ab proti integrinu $\beta 3$ (N-20)	kozja poliklonska sc-6627 Lot #H2003	200 $\mu\text{g/mL}$	Santa Cruz Biotechnology
protikozja Ab	oslovska konjugirana z Alexa Fluor [®] 555	2 mg/mL	Invitrogen
protikunčja Ab	kozja konjugirana z Alexa Fluor [®] 555	2 mg/mL	Invitrogen
protimišja Ab	oslovska konjugirana z Alexa Fluor [®] 555	2 mg/mL	Invitrogen
protimišja Ab	kozja konjugirana s HRP	2 mg/mL	Invitrogen

3.1.2 Nebiološki reagenti

REAGENT	PROIZVAJALEC
Alexa Fluor[®] 488 karboksilna kislina, tetrafluorofenilni (TFP)ester	Invitrogen
Antifade reagent 2 mL, Prolong Gold	Invitrogen
BSA	Sigma
C₆H₅Na₃O₇ × 2H₂O (trinatrijev citrat dihidrat)	Riedel-deHaën
C₆H₈O₇ × H₂O (citronska kislina monohidrat)	Riedel-deHaën
CH₃COO₂Na (0,01 M)	Riedel-deHaën
DMEM	ICN Biomedicals Inc.
DMSO	GibcoBRL (Invitrogen)
DTT	Fluka Analytical
EDTA	Promega
EGF	Sigma
Etanol (70 %, 96 %)	Riedel-deHaën
F12	GibcoBRL (Invitrogen)
FCS	Hyclone
Formalin, 10 %	Sigma-Aldrich

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

HEPES	Sigma
KCl	Sigma
KH₂PO₄	Riedel-deHaën
L-glutamin	ICN Biomedicals Inc.
metanol	Fluka
Na₂CO₃	Kemika
Na₂HPO₄	Riedel-deHaën
Na₂HPO₄×2H₂O	Riedel-deHaën
Na₂HPO₄×12H₂O	Riedel-deHaën
NaCl	Kemika
NaH₂PO₄×1H₂O	Riedel-deHaën
NaH₂PO₄×2H₂O	Riedel-deHaën
NaN₃	Riedel-deHaën
nigrozin	Sigma
PEG 0,1 %	Sigma
penicilin	Sigma
PMA	Sigma
protein A-sefaroza	GE Healthcare
pufer PBS (po Dulbeccu)	Biowhittaker
RPMI 1640	Gibco BRL (Invitrogen)
streptomycin	Sigma
TMB	Sigma
Tris (C₄H₁₁NO₃)	Promega
Triton X-100	Sigma
Tripsin-EDTA raztopina (10×)	Sigma
Tween 20	Serva

3.1.3 Raztopine in gojišča

GOJIŠČA:

» EAGLOVO GOJIŠČE, modificirano po Dulbeccu (DMEM)

13,4 g suho gojišče DMEM

1,85 g NaHCO₃

2,38 g HEPES

Raztopimo v 1 L destilirane vode in premešamo na magnetnem mešalu ter uravnamo pH na 7,4. Tako pripravljeno gojišče steriliziramo skozi filter (0,22 µm) in čez noč shranimo pri 37 °C. Naslednji dan gojišče prenesemo v hladilnik in hranimo pri 4 °C.

» KOMPLETNO GOJIŠČE ZA HIBRIDOME=kompletni DMEM

(KDMEM = DMEM s 13 % FCS in 1 % L-glutamina)

100 mL suho gojišče DMEM

15 mL FCS

1,2 mL L-glutamin

1,2 mL penicilin/streptomicin

Premešamo in do uporabe hranimo v hladilniku pri 4 °C.

» KOMPLETNO GOJIŠČE ZA CELICE PC3:

44 % DMEM

44 % F12

10 % FCS

1 % L-glutamin

1 % penicilin/streptomicin

Premešamo in do uporabe hranimo v hladilniku pri 4 °C.

» ZAMRZOVALNO GOJIŠČE

0,75 mL nekompletno gojišče DMEM (50 %)

0,6 mL FCS (40 %)

150 µL DMSO (10 %)

Premešamo in do uporabe hranimo na ledu.

► **F12 GOJIŠČE:**

16,2 g nekompletno gojišče F12
1,176 g NaHCO₃
1 % penicilina/ streptomicina

Raztopimo v 1 L destilirane vode in premešamo na magnetnem mešalu.

► **KOMPLETNO GOJIŠČE ZA U937 CELICE:**

88-93 % RPMI gojišče
10-5 % FCS
1 % L-glutamina
1 % penicilina/streptomicina

Premešamo in do uporabe hranimo v hladilniku pri 4 °C.

► **Tripsin-EDTA v pufru PBS (0,05 % tripsin; 0,02 % EDTA)**

Raztopino tripsin-EDTA pripravimo neposredno pred uporabo iz sterilnega pufra PBS z 0,02 % EDTA in sterilne raztopine 2,5 % tripsina z EDTA. Za pripravo 5 mL odmerimo:

4,9 mL pufra PBS z 0,02 % EDTA
100 µL raztopine 2,5 % tripsina z EDTA (10x)

PUFRI:

► **Pufer A** (za vezavo Ag oz. Ab na mikrotitrsko ploščico pri testu ELISA).

1,6 mL Na₂CO₃ (15 mM)
2,94 g NaHCO₃ (35 mM)
0,2 g NaN₃ (15 mM)

Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L, s koncentrirano HCl uravnamo pH na 9,6.

► **Pufer B** (za spiranje mikrotitrsko ploščice pri testu ELISA):

8,5 g NaCl (0,15 mM)
1,34 g Na₂HPO₄×2H₂O (7,5 mM)
2,94 g NaH₂PO₄×2H₂O (2,5 mM)
0,5 g TWEEN 20 (0,05 %)

Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L in uravnamo pH na 7,2.

► **Pufer C** (za blokiranje prostih mest na mikrotitrski ploščici ter za redčenje primarnih in sekundarnih protiteles). Za pripravo 100 mL pufra C odmerimo 2 g BSA v 100 mL pufra B.

► **Pufer D** (za redčenje substrata TMB):

21 g citronske kisline (0,1 M)

17,8 g Na₂HPO₄ × 2H₂O (0,1 M)

Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L in uravnamo pH na 6,0.

► **pufer PBS** (fosfatni pufer z dodatkom NaCl):

1,8 g Na₂HPO₄ × 2H₂O

0,2 g KH₂PO₄

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

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

► **FOSFATNI PUFER pH 6,0:**

48,573 g NaH₂PO₄ × 1H₂O

17,18 g Na₂HPO₄ × 12H₂O

Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L in uravnamo pH na 6,0.

► **Aktivacijski pufer za katepsin X in L (z 10x DTT ali brez DTT)**

100 mM acetatni pufer pH 5,5

0,1 % PEG

1,5 mM EDTA

Aktivacijski pufer za katepsin X in L brez DTT dopolnimo do 10 mL s prečiščeno vodo.

PUFRI ZA IZOLACIJO IN ČIŠČENJE PROTITELES NA PROTEIN A-SEFAROZI:

► **VEZALNI PUFER** (za vezavo protiteles na afinitetno kolono; 0,14 M fosfatni pufer, pH 8,2):

- Raztopina A: 24,9 g Na₂HPO₄ × 2H₂O raztopimo v 1000 mL destilirane vode.

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

- Raztopina B: 1,9 g KH₂PO₄ raztopimo v 100 mL destilirane vode.

Raztopini A (1000 mL) dodamo raztopino B (~57 mL) do vrednosti pH 8,2.

► **ELUCIJSKI PUFER** (za elucijo protiteles; 0,1 M citratni pufer, pH 3,5):

- Raztopina A: 7,4 g C₆H₅Na₃O₇ × 2H₂O raztopimo v 250 mL destilirane vode.

- Raztopina B: 21 g C₆H₈O₇ × H₂O raztopimo v 1000 mL destilirane vode.

Raztopini B (~100 mL) dodamo raztopino A (~370 mL) do vrednosti pH 3,5.

► **PUFER ZA DODATNO SPIRANJE KOLONE PO ELUCIJI PROTITELES**

(0,1 M citratni pufer, pH = 2,5):

- Raztopina A: 7,4 g C₆H₅Na₃O₇ × 2H₂O raztopimo v 250 mL destilirane vode.

- Raztopina B: 21 g C₆H₈O₇ × H₂O raztopimo v 1000 mL destilirane vode.

Raztopini B (~1000 mL) dodamo raztopino A (~100 mL) do vrednosti pH 2,5.

► **RAZTOPINA ZA NEVTRALIZACIJO ELUIRANIH FRAKCIJ PROTITELES**

(1 M raztopina Tris pufra, pH 9,0):

Za pripravo 50 mL raztopine odmerimo 6,1 g Tris-a in ga raztopimo v 50 mL destilirane vode.

3.1.4 Celični liniji U937 in PC3

Celična linija U937 (človeške tumorske celice kostnega mozga):

Celice so pridobljene iz bolnika s histiocitnim limfomom. Celice rastejo v obliki suspenzjske kulture. Po stimulaciji s forbolnim estrom (PMA) diferencirajo do končnih monocitov/makrofagov. Celice so dober *in vitro* model za študij diferenciacije monocitov/makrofagov.

Celična linija PC3 (celice človeškega adenokarcinoma prostate):

Celice so pridobljene iz kostne metastaze IV faze prostatnega adenokarcinoma 62-letnega belca. Celice so po svojem izvoru epitelijске in rastejo pritrjene na rastno podlago. Imajo majhno aktivnost fosfataze in testosteron-5α-reduktaze. Atmosfera gojenja je 95 % zraka in 5 % CO₂, temperatura 37 °C (46).

3.1.5 Laboratorijska oprema in aparature

Preglednica I: Uporabljena laboratorijska oprema in aparature.

OPREMA	TIP in PROIZVAJALEC
analizna tehtnica	EXACTA 610 EB, Tehnica; AB104 Mettler Toledo
avtomatske pipete	e10 in e120, Biohit
avtomatske večkanalne pipete	e1200, Biohit
avtomatski spiralec za mikrotitrsko ploščo	TECAN M8/2R, Columbus Plus
celični inkubator	BINDER
celulozni filter	150 mm Schleicher&Schwell
celulozno-acetatni filter	0,8 µm, Sartorius
centrifuga	Sorvall RT7
fluorescenčni mikroskop	OLYMPUS IX81
gojiščne plastenke	25 cm ² in 75 cm ² TPP Tissue Culture Flasks
gojiščne ploščice	z 12 vdolbinicami (MTP12), z 24 vdolbinicami (MTP24), Transwell
invertni mikroskop	Nikon TMS-F
komora z laminarnim pretokom zraka	PIO SMBC 183 AV; PIO LFVP9, Iskra
konfokalni mikroskop	Carl Zeiss LSM 510
konično mešalo (vortex)	Vibromix 104EV, Tehnica
krovna stekelca (coverslips)	Alltra d.o.o., Slovenija
magnetno mešalo	Rotamix 550 MM, Tehnica; Heidolph Polymax 1040
membranski filter za ultrafiltracijo	AMICON, YM3 24 in 62 mm
mikrotitrsko ploščo iz modulov	NUNC, F8 Maxisorp loose; NUNC, 96F Nunclon Delta, Black microwell
mini centrifuga	Capsulefuge PMC-060, Tomy
objektno steklo	Thermo Scientific, Menzel Gläser
pH meter	HANNA HI9321 microprocessor pH meter
ploščica za štetje celic	Tiefe Depth Profounder 0,100 mm 0,0025 mm ² , THOMA

polavtomatske pipete	0,2-2 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL 20-200 µL; 100-1000 µL, Eppendorf; 20-200 µL, 100-1000 µL, Biohit
polavtomatske večkanalne pipete	0,5-10 µL, Biohit
posoda za filtracijo (nuča)	Sartorius
pretočni citometer	BD FACSCalibur, BD Bioscience
set za fluorescenčno označevanje	Alexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit, Invitrogen
spektrofotometer	Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies Inc.
spektrofotometer za mikrotitrsko plošče	TECAN GENios, Columbus Plus; TECAN Safire2, Columbus Plus
suhi inkubator	WTB BINDER, Nemčija
ultrafiltracijska posoda	AMICON 8010 (10 mL Pmax = 75 psi, 5,3 kg/cm ²) in 8400

3.2 METODE

3.2.1 GOJENJE HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ

Za pripravo monoklonskega protitelesa, smo uporabili hibridomsko celično linijo, ki izloča specifično monoklonsko protitelo proti katepsinu X. Hibridomska celična linija je bila pripravljena po standardnem postopku Kohlerja in Milsteina:

1. priprava limfoblastov: imunizacija miši
2. priprava tumorskih celic (mišje mielomske celice)
3. fuzija: limfoblaste in tumorske celice pomešamo
4. HAT selekcija → preživijo le stabilni hibridomi
5. kloniranje in pridobivanje stabilnih celičnih linij → osamimo klon celic s stabilnim številom kromosomov, ki izdeluje specifično monoklonsko protitelo
6. testiranje hibridomskih celic → določitev specifičnosti monoklonskega protitelesa s testom ELISA
7. potrjeno monoklonsko hibridomsko celično linijo globoko zamrznemo (50).

Odmrzovanje hibridomov

Hibridomske celice zamrznjene v tekočem dušiku (temperatura približno -197 °C) smo

odtajali v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C. Hibridome smo prenesli v 5 mL kompletnega gojišča DMEM (z dodanim 13 % FCS in 2 mM L-glutaminom) in centrifugirali 5 min pri sili 800 obr/min v centrifugirki, ohlajeni na 4 °C. Supernatant smo odstranili, usedlino s celicami pa prenesli v stekleničke z ustreznim svežim gojiščem.

Gojenje hibridomov

Hibridome smo prenesli v gojiščno plastenko (75 cm^2) in jih gojili pri sterilnih pogojih v celičnem inkubatorju v vlažni atmosferi s 5 % CO₂ pri temperaturi 37 °C. S pomočjo invertnega mikroskopa smo vsak dan opazovali rast celic. Postopoma smo dodajali gojišče in celice prenesli v dodatne platenke, ko so prerasle 70 do 80 % površine gojiščne platenke. Tako so celice ves čas v eksponentni fazi rasti. Ko smo dobili zadostno količino celic, smo jih zamrznili.

Zamrzovanje hibridomov

Najprej določimo število celic na mL suspenzije s pomočjo citometra na mikroskopu. Vzamemo 100 µL gojišča s celicami, dodamo 100 µL nigrozina, ki obarva mrtve celice, in prestejemo žive celice pod mikroskopom. Gojišče s celicami centrifugiramo 5 min pri 1'300 obr/min. Nato odlijemo supernatant, celice resuspendiramo v 0,15 mL nekompletnega gojišča DMEM in jih prenesemo v 1,5 mL vialo za zamrzovanje. Dodamo še 0,6 mL FCS in 0,15 mL DMSO. DMSO celicam dodamo zato, da med zamrzovanjem ne bi prišlo do nastanka kristalov ledu v celicah, zaradi katerih bi lahko celice lizirale. Vialo čez noč zamrznemo pri -70 °C in jo nato shranimo v tekočem dušiku pri temperaturi -197 °C.

3.2.2 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTITELESA

Filtracija suspenzije celic

Celice centrifugiramo in supernatant prefiltriramo skozi celulozni filter (črni trak), da odstranimo morebitno sluz in trdne delce. Nato filtriramo na nuči s pomočjo vodne črpalke skozi celulozno-acetatni filter s premerom por 0,8 µm. Na ta način odstranimo odmrle oz. lizirane celice. Če se membrana zamaši, jo speremo z destilirano vodo. Gojišče s protitelesom zamrznemo pri -70 °C.

Ultrakoncentracija in dializa proti vezальнemu pufru

Filtrat skoncentriramo na ultrafiltru do čimmanjšega volumna. Ultrafiltracija poteka pri nadtlaku dušika (3 bar), pri stalnem mešanju 100 obr/min z ultrafiltratom YM3 pri temperaturi 4 °C. Ultrafiltrator deluje po principu potiskanja manjših molekul iz vzorca skozi polprepustno membrano. Tako gredo voda in manjše molekule skozi pore membrane, večje makromolekule, odvisno od velikosti por, pa ostanejo na površini membrane. V našem primeru so mejne vrednosti pore YM3 3000 MW (51).

Koncentrirano raztopino protitelesa dializiramo proti vezальнemu pufru (0,14 M fosfatni pufer, pH = 8,2). Na ta način raztopino v ultrafiltru razsolimo in ji uravnamo pH. Tako pripravljen vzorec zamrznemo pri –20 °C in je pripravljen za afinitetno kromatografijo.

Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je vrsta adsorpcijske kromatografije, ki se med drugim uporablja za čiščenje protiteles. Molekule iz vzorca se ob prehodu skozi kolono specifično in reverzibilno vežejo na ligand, ki je kovalentno vezan na nosilec. Ligand ostane med celotnim postopkom vezan na nosilec, medtem ko se molekule iz vzorca eluirajo s spiranjem kolone ob spremenjenih pogojih (pH, temperatura, ionska moč, pufer z denaturanti). Na ta način dobimo posamezne frakcije, v katerih se nahaja želena molekula iz vzorca (52).

Uporabili smo kolono z nosilcem protein A-sefaroz. Protein A je 40-60 kDa velik protein, izoliran iz celične stene bakterije *Staphylococcus aureus* in veže Fc regijo IgG imunoglobulinov. Protitelo eluiramo z zniževanjem pH ter količino protitelesa določimo z merjenjem absorbance pri 280 nm (53, 54).

Postopek izvajanja afinitetne kromatografije:

1. Kolono speremo z 10-kratnim volumnom vezalnega pufra pH = 8,2. Tako odstranimo raztopino azida.
2. Očiščen protein A-sefarozo zmešamo z našim vzorcem, ki ga predhodno odtalimo. Vse skupaj prelijemo v 50 mL centrifugirko in rahlo stresamo 1,5 ure pri sobni temperaturi, da pride do vezave protitelesa na ligand.
3. Gel z vzorcem po inkubaciji prelijemo nazaj v kolono in počakamo, da se posede.

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

4. Kolono spiramo z vezalnim pufrom, dokler ne dosežemo vrednost absorbance 0,01. Rdečo tekočino (flowthrough), ki izteče iz kolone shranimo na -20 °C. Na ta način odstranimo nevezane snovi.
5. Kolono spiramo z elucijskim pufrom s pH 3,5. Frakcije po 3 oz. 6 mL zbiramo v čašo in vsaki posamezni frakciji izmerimo absorbanco. Frakcije z visoko absorbanco združimo in s Tris pufrom (pH = 9,0) uravnamo na pH 7,0.
6. Kolono spiramo še z elucijskim pufrom (pH 2,5), dokler ne pade absorbanca frakcije pod 0,01.
7. Kolono 3-krat speremo z vezavnim pufrom (z dodatkom 0,03 % azida, v primeru, da je dlje časa ne bomo uporabili) in shranimo v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

Dializa proti pufru PBS

Združene frakcije z najvišjo absorbanco z ultrafiltracijo skoncentriramo do volumna 1-2 mL. Tej koncentrirani raztopini protitelesa trikrat dodamo pufer PBS v razmerju 1:2 in dializiramo proti pufru PBS s pH 7,2.

Sterilna filtracija

Protitelo filtriramo z injekcijsko brizgalko skozi sterilni filter s porami 0,22 µm. Prefiltriranemu vzorcu izmerimo absorbanco pri 280 nm.

Določanje koncentracije protitelesa 2F12

Koncentracijo protitelesa določimo spektrofotometrično. Za protitelo IgG pri ekstinkcijskem koeficientu 1,35 mL/cm mg in dolžini kivete 1 cm velja:

$$c_{mAb} = A_{280} \cdot f_{mAb}$$

$$m_{mAb} = A_{280} \cdot 1/\epsilon \cdot V$$

c_{mAb}: koncentracija protitelesa v mg/mL **f_{mAb}**: faktor protitelesa: $1/\epsilon = 0,7407$

m_{mAb}: masa protitelesa v mg **ε_{mAb}**: ekstinkcijski koeficient 1,35 mL/cm mg

A₂₈₀: absorbanca pri valovni dolžini 280 nm **V_{mAb}**: volumen frakcije v mL

3.2.3 GOJENJE CELIČNIH LINIJ

Gojenje celic poteka v sterilnem okolju in pri sterilnih pogojih. Pri delu uporabljamo sterilni pribor in sterilne reagente. Uporabljamo gojiščne plostenke s površino 25 cm^2 in 75 cm^2 , za hibridomske celice pa tudi plostenke s površino 150 cm^2 . Celice gojimo pri temperaturi $37\text{ }^\circ\text{C}$ v atmosferi nasičeni z vLAGO in s 5 % CO₂ v celičnem inkubatorju. Ko pritrjene celice prerastejo 70 do 80 % površine gojiščne plostenke, celice tripsiniziramo, tako da kulturo speremo s puferom PBS (3 mL v male plostenke, 6 mL v velike), dodamo pufer PBS z 0,02 % EDTA (2,5 mL v male plostenke, 5 mL v velike) in tripsin (0,05 % končna koncentracija) in približno 10 min inkubiramo pri $37\text{ }^\circ\text{C}$. Celice spremljamo pod invertnim mikroskopom. Ko se celice razpustijo in prosto plavajo po raztopini, dodamo gojišče (2,5 mL v male plostenke, 5 mL v velike) in s tem inaktiviramo tripsin. Zmes prenesemo v centrifugirko in centrifugiramo 5 min pri 1500 obr/min. Supernatant odlijemo, celice pa resuspendiramo v 1 mL gojišča ter prenesemo na gojiščno ploščo z 12 oz. 24 vdolbinicami (MTP12 oz. MTP24) in v novo plostenko s svežim gojiščem. Za željeno končno število celic v vdolbinici (2×10^4 oz. 1×10^5) pred centrifugiranjem celice prestejemo, preračunamo število celic v 1 mL in odmerimo količino suspenzije celic v posamezno vdolbinico ter dodamo zadostno količino gojišča.



Slika 3-1: Gojiščna plošča s celicami (55).

Celice **PC3** gojimo v gojišču DMEM/F12 (1:1) z dodanim serumom (10 % FCS), 1 % L-glutaminom in 1 % antibiotikom (penicilin/streptomicin).

Celice **U937** gojimo v gojišču RPMI z dodanim serumom (5-10 % FCS), 1 % L-glutaminom in 1% antibiotikom (penicilin/streptomicin)

3.2.4 IMUNOCITOKEMIJA

Imunocitokemija je pogosto uporabljena laboratorijska tehnika za prepoznavanje specifičnih peptidov ali proteinskih antigenov v notranjosti ali na površini celic s pomočjo protiteles. Na antogene vezano protitelo nato detektiramo z različnimi metodami. Označevalec za protitelo je lahko fluorescenčno barvilo, encim ali radioaktivni izotop. Nastali kompleks lahko opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom ali z avtoradiografijo. Imunocitokemične metode so lahko **direktne** ali **indirektne**. Pri direktni metodi na primarno protitelo vežemo izbran označevalec (fluorokrom), pri indirektni metodi pa na antigen vežemo neoznačeno primarno protitelo, na primarno protitelo pa nato še označeno sekundarno protitelo. Pod fluorescenčnim mikroskopom lahko tako opazujemo posredno ali neposredno označen antigen (56).

Priprava celic za fluorescenčno mikroskopijo

Celice nacepimo na krovna stekelca 3 dni pred pričetkom barvanja. Vse stopnje barvanja izvajamo pri sobni temperaturi.

1.) Fiksacija celic in blokiranje prostih vezavnih mest:

- če celice niso dobro pritrjene, ne odstranujemo gojišča,
- v vsako od vdolbinic MTP24 dodamo 500 µL 10 % formalina Sigma-Aldrich™ (57) v pufru PBS za fiksiranje celic in pustimo 45 min,
- speremo s 500 µL pufra PBS (pH = 7,4).

2.) Permeabilizacija celic:

- celicam dodamo 500 µL 0,1 % raztopine Triton X-100 v pufru PBS in permeabiliziramo 10 min,
- speremo s 500 µL pufra PBS.

3.) Blokiranje prostih vezavnih mest:

- celicam dodamo 500 µL pufra PBS s 3 % BSA in inkubiramo 30 min pri sobni T; goveji serumski albumin blokira prosta vezavna mesta na krovnem stekelcu.

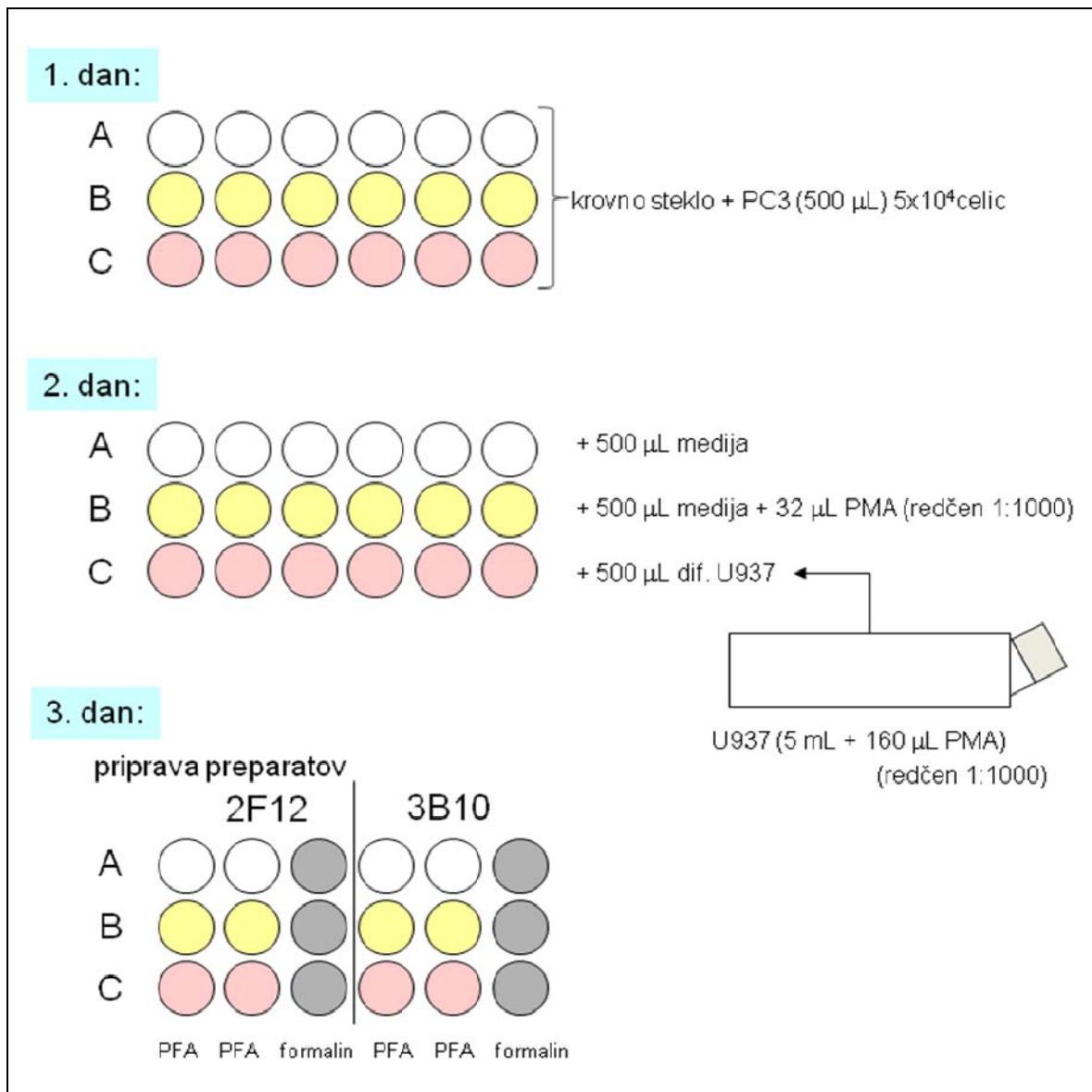
4.) Barvanje s primarnima protitelesoma 2F12 in 3B10:

- primarno monoklonsko protitelo redčimo v pufru PBS s 3 % BSA do končne koncentracije 10 µg/mL in v vsako vdolbinico dodamo 140 µL raztopine protitelesa,
- inkubiramo 90 min pri sobni T,
- 3-krat speremo s 500 µL pufra PBS.

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

5.) Barvanje s sekundarnim protimišjim protitelesom, označenim z Alexa Fluor® 555:

- sekundarno protitelo redčimo v pufru PBS s 3 % BSA v razmerju 1:1000 in v vsako vdolbinico dodamo 140 µL raztopine protitelesa,
- inkubiramo 90 min pri sobni T,
- 3-krat speremo s 500 µL pufra PBS.



Slika 3-2: Priprava kokulture U937 in PC3 za fluorescenčno mikroskopijo.

Krovna stekelca s celicami s pinceto previdno vzamemo iz vdolbinic in jih položimo na toaletni papir, da se osušijo. Na objektno steklo nanesemo majhno kapljico Antifade reagenta za zaščito pred razbarvanjem fluorescenčno označenega protitelesa. Krovno stekelce s celično stranjo poveznemo čez kapljico in nežno pritisnemo, da izpodrinemo

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

odvečni reagent. Krovno stekelce oblepimo z lakovom za nohte, da preprečimo izhlapevanje in odtekanje reagenta. Tako pripravljeni preparati so primerni za fluorescenčno mikroskopijo in so obstojni več tednov, če jih hranimo v temi v hladilniku na 4 °C.

Pri preparatih, kjer smo imeli poleg celic PC3 še kokulture U937 celic, smo postopali pri pripravi nekoliko drugače. Pri točki 1. smo uporabili 4 % paraformaldehid oziroma 10 % formalin Sigma-Aldrich™. Pri 4. in 5. točki pa smo namesto 140 µL dodali po 200 µL protitelesa.

Fluorescenčno označevanje mAb 3B10 z Alexa Fluor® 488

Z zelenim fluorescenčnim barvilm (fluorokromom) smo označili monoklonsko protitelo 3B10 (subklon 5C1-3B10-2F7), ki prepoznavajo tako prokatepsin X kot katepsin X. Za označevanje protitelesa smo uporabili komercialni kompleks Alexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit s fluorokromom Alexa Fluor® 488, ki ima absorpcijski vrh pri 494 nm in ekscitacijski vrh pri 519 nm (58). Na voljo smo imeli ~ 800 µL mAb 3B10, s koncentracijo 0,95 mg/mL.

Raztopini protitelesa v pufu PBS (postopek prilagojen za 1 mg IgG; optimalno 0,5 mL, γ = 2 mg/mL) dodamo 50 µL 1M raztopine NaHCO₃. Pripravljeno raztopino prenesemo v vialo z označevalcem Alexa Fluor® 488 in inkubiramo 1 uro pri sobni T ob konstantnem mešanju z magnetnim mešalom. Raztopino pustimo čez noč na 4 °C v temnem prostoru. Potem na pripravljeni koloni za gelsko kromatografijo ločimo označeno protitelo od nevezanega označevalca. Kolono speremo z elucijskim pufom in obe frakciji ločeno zberemo v viali. Raztopini konjugiranega protitelesa izmerimo absorbancijo pri A₂₈₀ in A₄₉₄. Koncentracijo označenega protitelesa 3B10-488 izračunamo po enačbi:

$$c_{3B10-488} = [A_{280} - (A_{494} * 0,11)] / 203\,000 \quad [\text{mol/L}]$$

203'000 cm⁻¹M⁻¹ molarni ekstinkcijski koeficient IgG

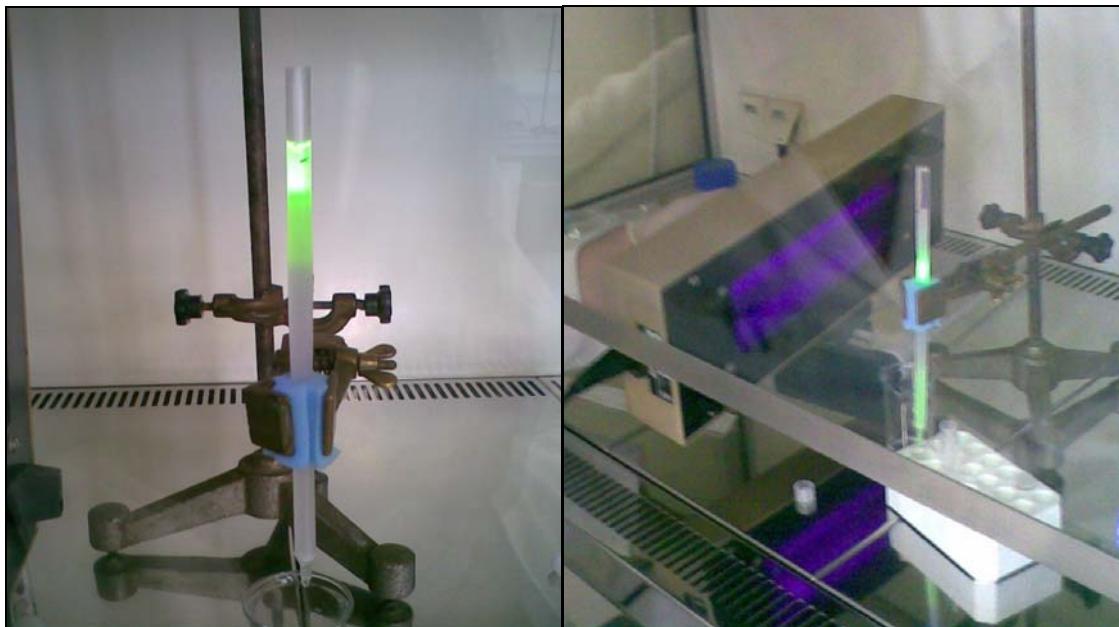
0,11 korekcijski faktor za upoštevanje absorbcije barvila pri A₂₈₀.

Stopnjo označenosti protitelesa izračunamo po enačb:

$$(A_{494} * \text{faktor redčenja}) / (71\,000 * c_{3B10-488})$$

71'000 cm⁻¹M⁻¹ molarni ekstinkcijski koeficient barvila Alexa Fluor® 488 pri 494 nm.

Za 1 mol protitelesa je optimalna stopnja označenosti 4-9 molov barvila Alexa Fluor® 488. Vialo z označenim protitelesom v pufru PBS pH 7,2 z ~2 mM NaN₃ shranimo na 4 °C, zaščiteno pred svetlobo. Za daljše hranjenje, razdelimo protitelo na manjše volumne in zamrznemo na -20 °C. Na sliki 3-3 sta vidni ločeni lisi nevezanega označevalca od označenega protitelesa 3B10-488.



Slika 3-3: Gelska kromatografska kolona s protitelesom 3B10-488. Zgornja fluorescenčna lisa je nevezano barvilo Alexa Fluor® 488, spodnja lisa pa z barvilom označena protitelesa 3B10-488.

3.2.5 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

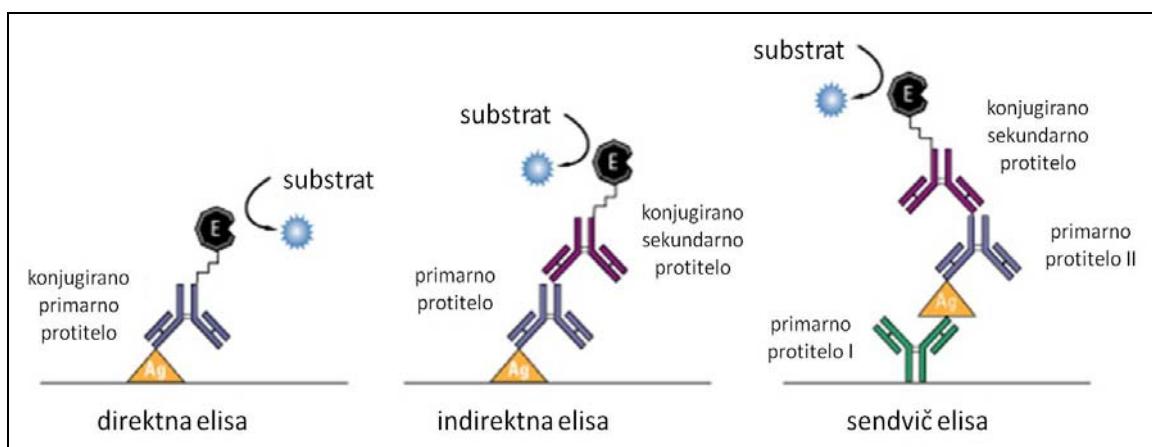
Fluorescenčni mikroskop je izpopolnjen svetlobni mikroskop, ki se lahko uporablja tudi za opazovanje predmetov, v katerih so fluorescenčne molekule (59). Te snovi absorbirajo svetlobo s krajšo valovno dolžino (vzbujevalna svetloba), oddajajo pa svetlobo z daljšo valovno dolžino (emitirana svetloba). Fluorescenčna snov je v preparatu lahko naravno navzoča - gre za avtofluorescenco (npr. klorofil, vitamin A); pogosto pa z njo preparat obarvamo (npr. fluorescein izotiocianat - FITC, tetrametil rodamin - TMR). Mikroskop ima za vir kratkovalovne svetlobe živosrebrno žarnico. Ker je vzbujevalna svetloba za oči škodljiva, je pred okularjem še zaporni filter, ki jo prestreže, zato je vidno polje temno. Skozi optiko mikroskopa je prepuščena le emitirana svetloba, ki jo oddajajo fluorescenčne molekule.

Fiksirane preparate postavimo na premično mizico in med objektiv ter preparat damo kapljico imerzijskega olja, ki zmanjša odbojni kot žarkov, ki presvetljujejo preparat. Na fluorescenčnem mikroskopu lahko spreminjamо številne parametre, ki naredijo sliko ostro, kontrastno in pravilno osvetljeno.

3.2.6 TEST ELISA

Encimskoimunski test ali **test ELISA** (angleško: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) je občutljiva biokemijska metoda, ki se uporablja za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu. Danes poznamo številne različice te metode, s katerimi lahko kvalitativno in (semi)kvantitativno določimo antigene in protitelesa v vzorcu (60, 61).

Za določanje prisotnosti specifičnih protiteles v vzorcu s pomočjo antigena uporabljamo indirektni test ELISA. Direktni ali sendvič test ELISA pa sta prirejena za kvantitativno določanje antigenov v vzorcu. Pri vseh izvedbah testa ELISA nazadnje dodamo na protitelo vezan encim, ki omogoči spremembo barve substrata in detekcijo prisotnosti preiskovanega protitelesa ali antigena. Detekcijo omogoči encimska reakcija, ki jo katalizira na protitelo konjugirana hrenova peroksidaza (HRP), ki pretvori substrat TMB in H_2O_2 v temno modro obarvan produkt. Množina nastalega produkta je sorazmerna množini protitelesa oz. indirektno množini antigena v vzorcu. Encimsko reakcijo HRP prekinemo z dodatkom H_2SO_4 . Nastali produkt kvantificiramo spektrofotometrično pri 450 nm.



Slika 3-4: Različni tipi testa ELISA (62).

Direktni test ELISA

Direktni test ELISA smo izvedli z namenom preveriti aktivnost našega protitelesa proti katepsinu X. Na trdno podlago najprej adsorbiramo primarno protitelo I (Ab I) (v našem primeru 2F12 ali 3B10) raztopljeni v pufru A (pH 9,6) čez noč pri temperaturi +4 °C. Na primarno Ab I vežemo antigen (v našem primeru katepsin X). Na tako imobiliziran antigen nato vežemo drugo primarno Ab II (v našem primeru 2F12 ali 3B10), ki je lahko konjugirano ali pa ne. Če primarno Ab II ni konjugirano, nanj vežemo s HRP konjugirano sekundarno Ab. Pri posameznih testih smo zaradi optimizacije postopka le-tega nekoliko spremenili, spremembe pa smo opisali v poglavju 4.1.

Indirektni test ELISA

Z indirektnim testom ELISA smo želeli kvantificirati jakost vezave monoklonskih protiteles 2F12 in 3B10 na peptide p#1, p#2, p#3; prokatepsin X in katepsin X. 14 AK dolga zaporedja peptidov p#1, p#2 in p#3 ustrezajo zaporedju proregije prokatepsina X, poleg tega je zaradi boljše vezave na nosilec pri vzporednem projektu imunizacije miš, temu zaporedju na C-konec dodana aminokislina cistein.

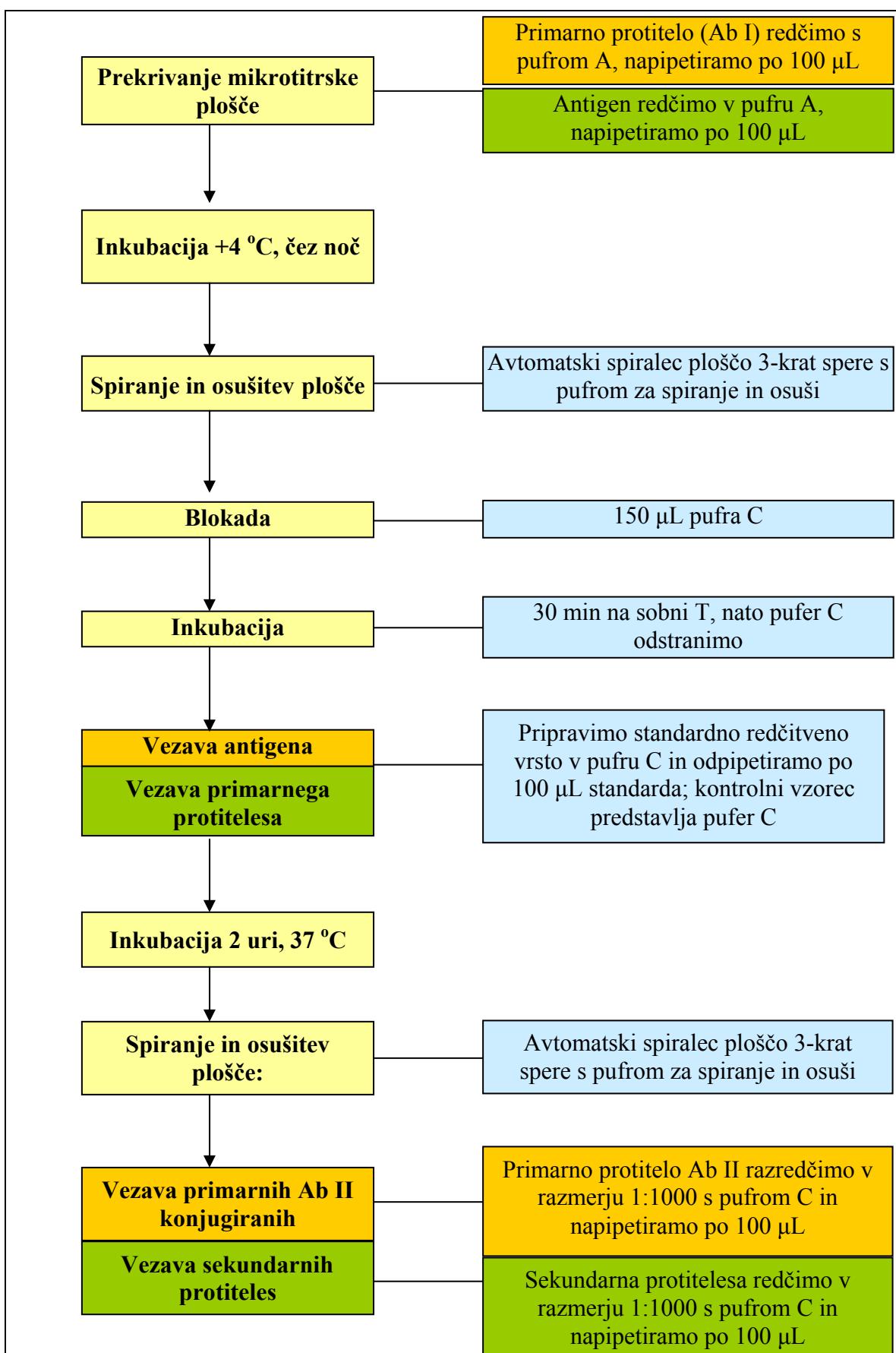
proregija prokatepsina X:	GLYFRRGQT CYRPL<u>RGDGLAPLG</u>RSTYPRPHEY
p #1 :	GLYFRRGQT CYRPL<u>C</u>
p #2 :	<u>YRPLRGDGLAPLGRC</u>
p #3 :	APLGRSTYPRPHEY<u>C</u>

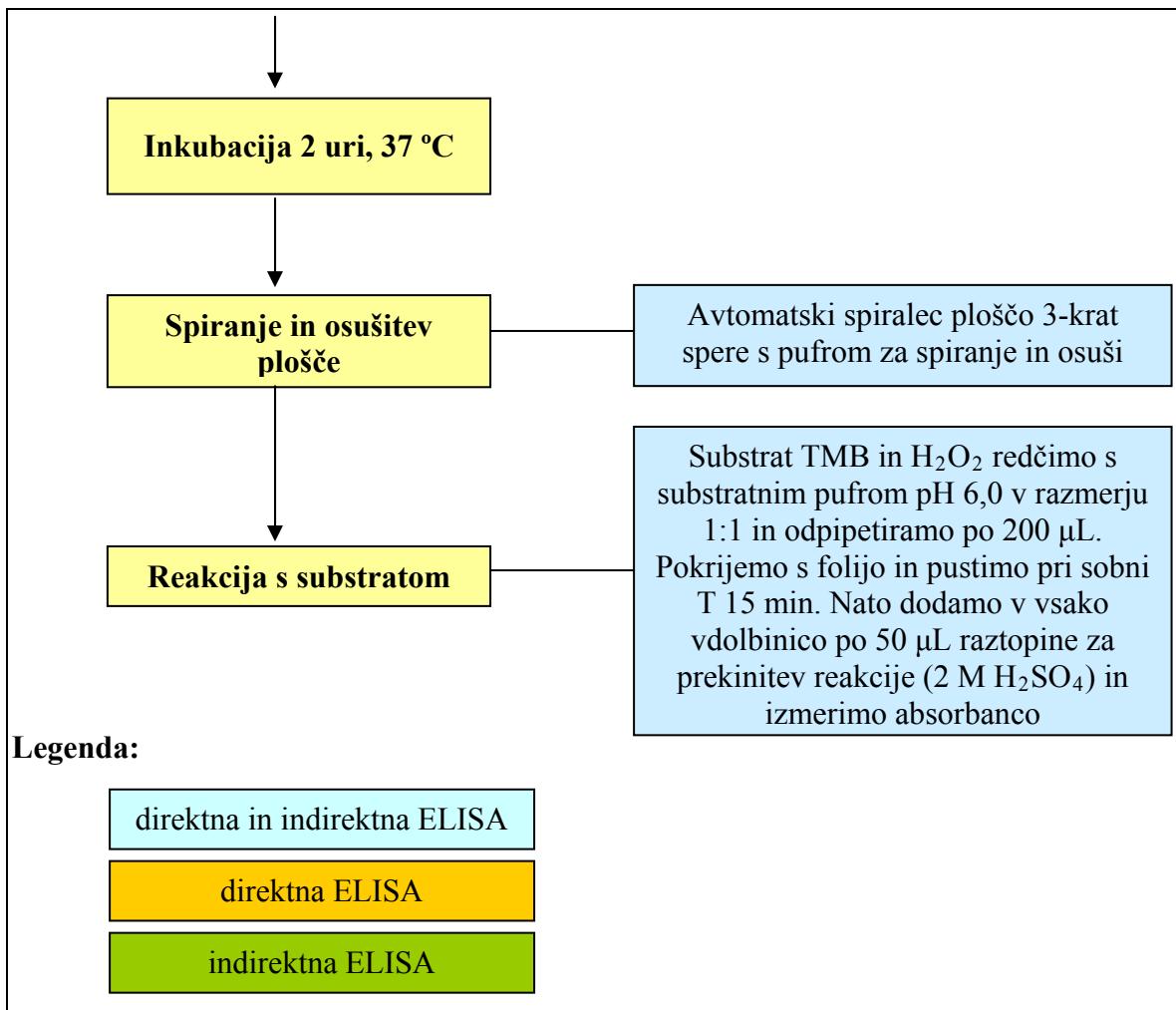
Slika 3-5: Peptidi p#1, p#2 in p#3 v primerjavi s proregijo prokatepsina X. Molske mase peptidov so 1833.16 (p#1), 1643.93 (p#2) in 1746.96 (p#3) Označeni so zaporedje RGD in končni cisteini.

Pri indirektnem testu ELISA je antigen adsorbiran na trdno podlago. Ob dodatku primarnega protitelesa (v našem primeru 2F12 in 3B10), nastane kompleks antigen-protitelo, ki ga detektiramo s sekundarnim protitelesom, kovalentno označenimi s HRP. Namesto primarnega in konjugiranega sekundarnega protitelesa smo uporabili zgolj s HRP konjugirano primarno protitelo. Pri posameznih testih smo zaradi optimizacije postopka le-tega nekoliko spremenili, spremembe pa smo opisali v poglavju 4.4.

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

Preglednica II: Postopek izvajanja direktnega in indirektnega testa ELISA.





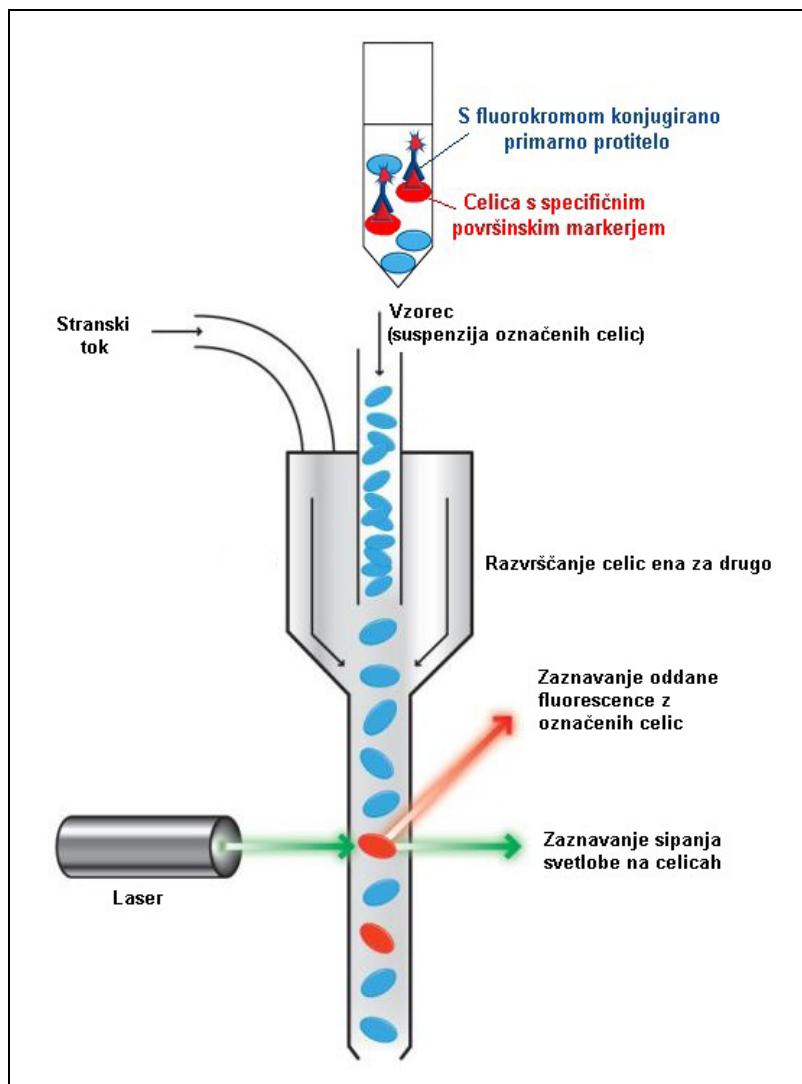
3.2.7 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je metoda za merjenje specifičnih molekul (označevalcev, markerjev) na ali v celicah/delcih v tekočih vzorcih. V osnovi je metoda podobna fluorescenčni mikroskopiji. Razlikuje se v tem, da je odčitavanje odstotka obarvanih celic avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Metoda omogoča merjenje vsake celice, ki v tankem curku potuje skozi pretočni citometer. Svetlobni žarek, ki zadene celico, se odbije ali lomi ali pa jo absorbirajo na protitelesu kovalentno vezani fluorokromi, ki nato oddajajo svetlobo višjih valovnih dolžin. Spremembe intenzitete svetlobe beleži sistem fotosprejemnikov. S pretočnim citometrom merimo tudi sipanje svetlobe na celicah, kar nam pove kakšne velikosti in granuliranosti so posamezne celice.

S kombiniranjem dobljenih podatkov lahko v vzorcu ločimo posamezne populacije celic, določimo njihov delež, opazujemo specifični označevalci le na posamezni populaciji, ipd. Pretočni sistem sestavlja pretočna komora, skozi katero tečejo celice v izotonični tekočini.

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

Ob prehodu snopa žarkov posamezna celica odda signal. Dva fotodetektorja merita odboj ali lom svetlobe, eden iz smeri vira, drugi pa pravokotno na smer vpadne svetlobe. Sipanje zaradi uklona svetlobe na robovih celice zazna prednji detektor sipanja (»Forward Scatter«, FSC). Jakost signala na FSC je v korelaciiji z velikostjo celice. Sipanje zaradi odboja svetlobe meri stranski detektor sipanja (»Side Scatter«, SSC) in je odvisno od granuliranosti celice. Večje celice so na grafu bolj desno, bolj granulirane pa bolj zgoraj.



Slika 3-6: Princip delovanja pretočnega citometra (63).

S pretočno citometrijo je mogoče analizirati tudi celice, obarvane z več fluorescenčnimi barvili hkrati. Celice lahko barvamo z več monoklonskimi protitelesi hkrati in tako ugotovimo katere kombinacije antigenov so izražene na posamezni populaciji celic (63, 64).

S pretočno citometrijo smo analizirali celice PC3, po izpostavitvi različnim aktivatorjem/

inhibitorjem.

Priprava celic PC3 za pretočno citometrijo po standardnem postopku brez fiksacije

Iz plostenke s celicami PC3 odstranimo gojišče, speremo s pufrom PBS in inkubiramo v pufru PBS s 0,02 % EDTA brez tripsina, največ 30 min. Če se celice ne odlepljajo, jih nežno postrgamo s celičnim strgalom. Celice resuspendiramo z vorteksiranjem in preživele prestejemo pod mikroskopom (100 μ L celic redčenih 1:1 z nigrozinom, ki mrtve celice obarva črno). Resuspendirane celice iz falkonke centrifugiramo 5 min pri 3'000 obr/min. Supernatant odlijemo in dodamo PBS do končne koncentracije 2×10^5 celic/40 μ L ter jih razpipetiramo v epruvetke. Vzorcem dodamo 10 μ L protitelesa v PBS (100 μ g/mL), kontrolam pa enak volumen PBS. Inkubiramo 45 min na ledu in temi. Nato celice speremo z 2 mL PBS, centrifugiramo 5 min pri 3'000 obr/min in odlijemo supernatant. V primeru, da ne uporabimo konjugiranega primarnega protitelesa, dodamo še konjugirano sekundarno protitelo. Na koncu celice resuspendiramo v 250 μ L PBS in hranimo na ledu in temi. Pretočno citometrijo opravimo čimprej, najkasneje pa v 45 min, saj nefiksirane celice hitreje odmirajo.

3.2.8 AKTIVNOST KATEPSINA X V PRISOTNOSTI PEPTIDOV PROREGIJE

Aktivnost katepsina X smo merili v prisotnosti prej omenjenih peptidov, ki ustreza proregiji prokatepsina X. Kot potencialni inhibitor katepsina X smo uporabili peptid p#1, kot kontrolo pa peptid p#3. Aktivni katepsin X, ki ima monokarboksipeptidazno aktivnost, cepi peptidno vez substrata Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH na mestu Glu-Lys. Nastali fluorescenčni produkt Lys(Dnp)-OH kvantificiramo spektrofotometrično. Zaradi optimizacije postopka, smo spremajali vrstni red dodanih reagentov in pa končno razmerje med dodanimi reagenti. Prav tako smo reakcijo spremljali v aktivacijskem pufru z ali brez dodanega ditiotreitolu (DTT), to je reducenta, ki reducira (in s tem prekine) disulfidne vezi. Končne koncentracije uporabljenih reagentov:

- substrat: 5 μ M
- katepsina X: 10 nM
- peptid p#1, p#3: 200 μ M, 20 μ M in 2 μ M.

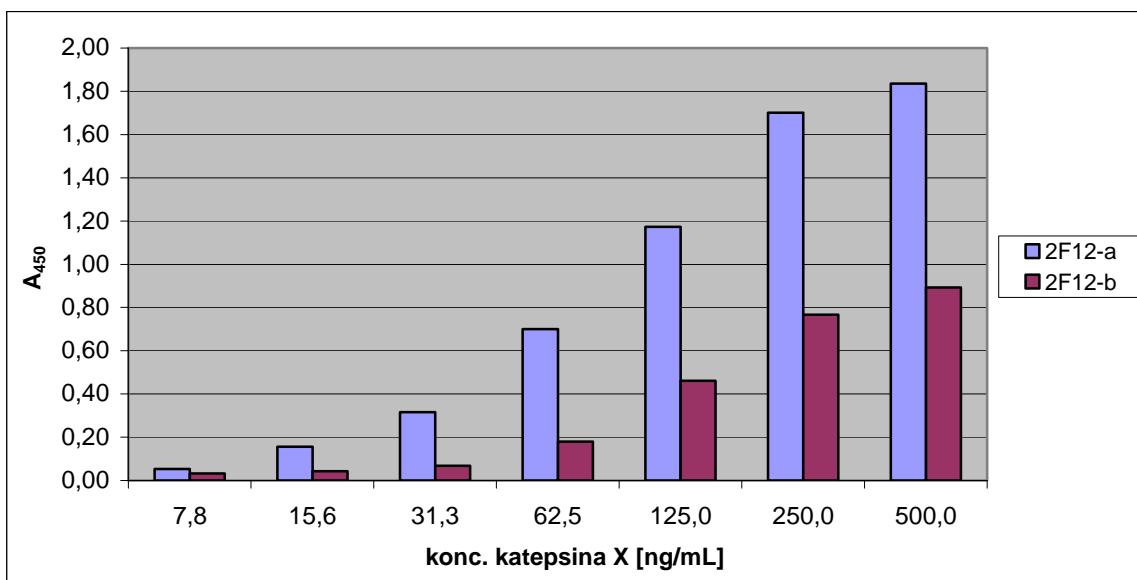
4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZOLACIJA MONOKLONSKEGA PROTITELESA PROTI KATEPSINU X

Kot je opisano v poglavju 3.2.2, smo s pomočjo afinitetne kromatografije izolirali in očistili monoklonsko protitelo proti katepsinu X (2F12-b). Protitelo smo s kolone sprali z elucijskim pufom pH 3,5 in takoj nevtralizirali z 1M Trisom. Frakcije, ki so imele A_{280} višjo od 0,08 smo združili, ostale pa zavrgli. Združene frakcije smo skoncentrirali z ultrafiltratorjem in dializirali napram PBS. Končnemu volumnu ~ 1 mL smo določili koncentracijo 0,64 mg/mL. Vzrok za nizek izplen protitelesa je najverjetneje visoka pasaža hibridomske linije, ki ne proizvaja protitelesa več tako učinkovito kot doslej. Kakovost protitelesa 2F12-b smo preverili z direktnim testom ELISA in jih primerjali z odzivi nazadnje izoliranega protitelesa 2F12-a. Pri tem smo uporabili sledeči testni sistem:

1.	primarno Ab I	2F12-a	$R=1:567, \gamma_k=2,78 \mu\text{g/mL}$
		2F12-b	$R=1:230, \gamma_k=2,78 \mu\text{g/mL}$
2.	Ag	KatX-a	redčitvena vrsta γ_k : od 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do 7,8 ng/mL, čas inkubacije 90 min
3.	konjugirano primarno Ab II	3B10-HRP	$R=1:1000$

S testom smo v izolatu potrdili prisotnost funkcionalnih mAb 2F12, ki prepoznavajo katepsin X in pri tem dajejo koncentracijsko odvisen odziv (slika 4-1). Pri enaki nominalni koncentraciji protiteles 2F12-a in 2F12-b (2,78 $\mu\text{g/mL}$) je novo izolirano protitelo v povprečju 2,9-krat manj učinkovito od protitelesa izoliranega maja 2009 (2F12-a).

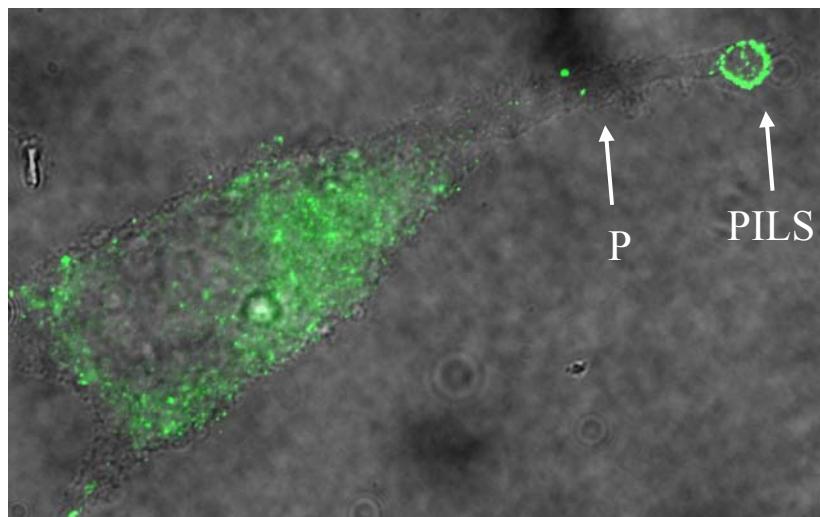


Slika 4-1: Odvisnost absorbance od koncentracije katepsina X za protitelesi 2F12-a in 2F12-b, določena z direktnim testom ELISA. Z naraščajočo množino katepsina X narašča tudi odziv (A_{450}). Nominalna končna koncentracija uporabljenih protiteles 2F12-a in 2F12-b, določena spektrofotometrično, je identična ($2,78 \mu\text{g/mL}$). Zaradi manjše učinkovitosti izoliranega protitelesa 2F12-b, le-ta dajejo manjše odzive kot protitelo 2F12-a.

4.2 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

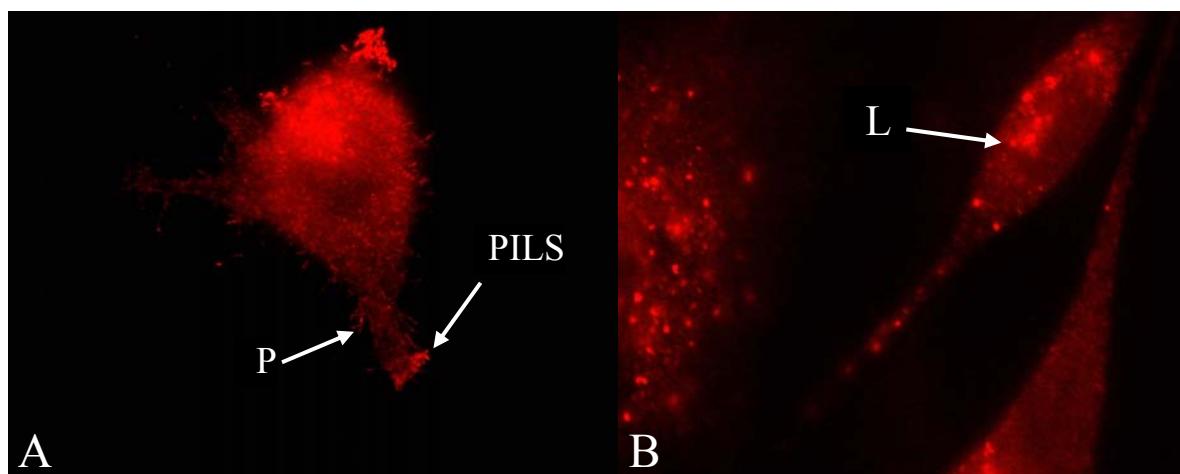
Pod fluorescenčnim mikroskopom smo opazovali celice PC3, permeabilizirane s Tritonom X-100 in barvane s primarnima protitelesoma 2F12-a in 3B10. Kot fluorokrom sta bila uporabljeni Alexa Fluor® 555 (rdeča fluorescencija) in Alexa Fluor® 488 (zelena fluorescencija), vezana na sekundarno protitelo, ki prepoznavata obe vrsti mišjih primarnih protiteles.

Na celicah PC3 so bili pri vseh preparatih vidni debelejši izrastki (psevdopodiji), ki so iz celice izraščali na enem/dveh mestih (slika 4-2). Celice so psevdopodije tvorile tudi kadar so bile izpostavljene diferenciaciji s PMA (slika 4-3). Zlasti v konicah psevdopodijev je zaznati povečano lokalizacijo katepsina X v obliki prstana. Priseskom podobne strukture so že bile opisane in so bile poimenovane PILS (podosomu ali invadopodiju podobne strukture) (65). V omenjenih strukturah so pri teh celicah identificirali lokalizirane metaloproteaze, ki so sodelovali pri razgradnji kolagena in ECM. Z β -aktinom bogati psevdopodiji so pri nekaterih tumorskih celicah osnovni način motilitete, ki tumorski celici omogoča invazijo (66). Vloga katepsina X v konicah psevdopodijev celic PC3 še ni znana.



Slika 4-2: Lokalizacija katepsina X v celičnih izrastkih celic PC3. Označeni so psevdopodiji (P) in njihove podosomu ali invadopodiju podobne strukture (PILS). Barvano s protitelesom 2F12-a proti katepsinu X.

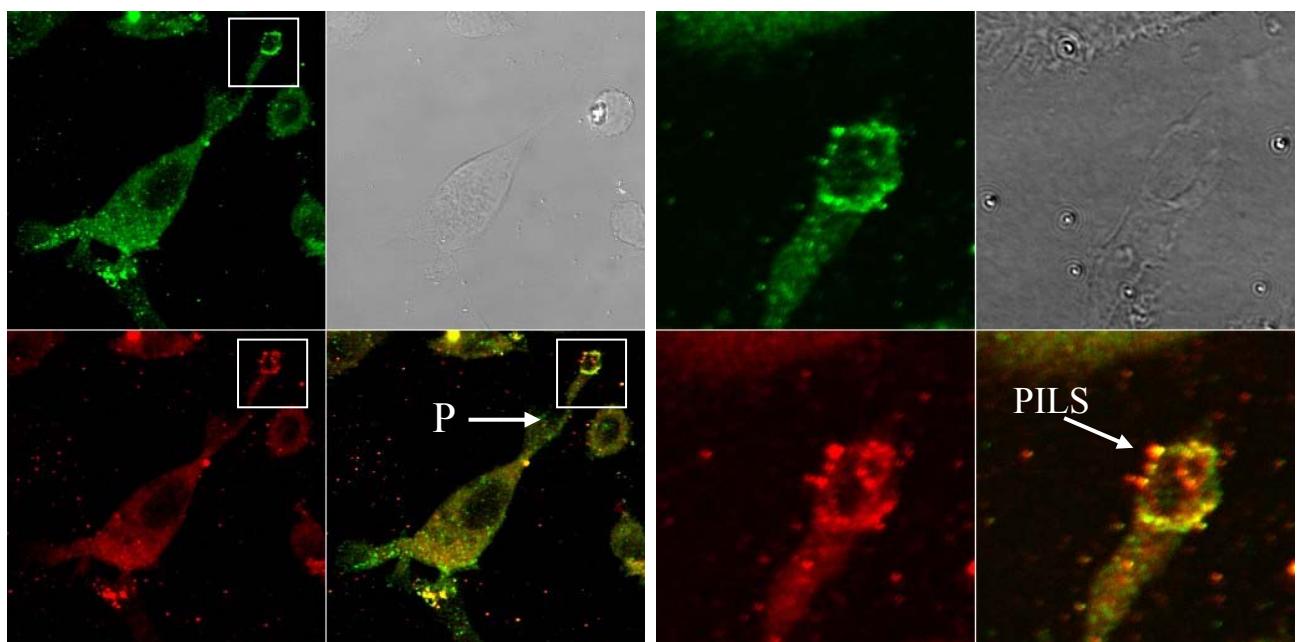
Medtem, ko je aktivna oblika katepsina X prisotna predvsem v izrastkih (slika 4-3 A, barvano z mAb 2F12), pa je prokatepsin X v citoplazmi celic PC3 razporejen zrnato, saj je skladiščen v lizosomih (slika 4-3 B, barvano z mAb 3B10). Iz lizosomov se prokatepsin X prenese (translocira) na konico psevdopodijev in se med ali po translokaciji tudi aktivira.



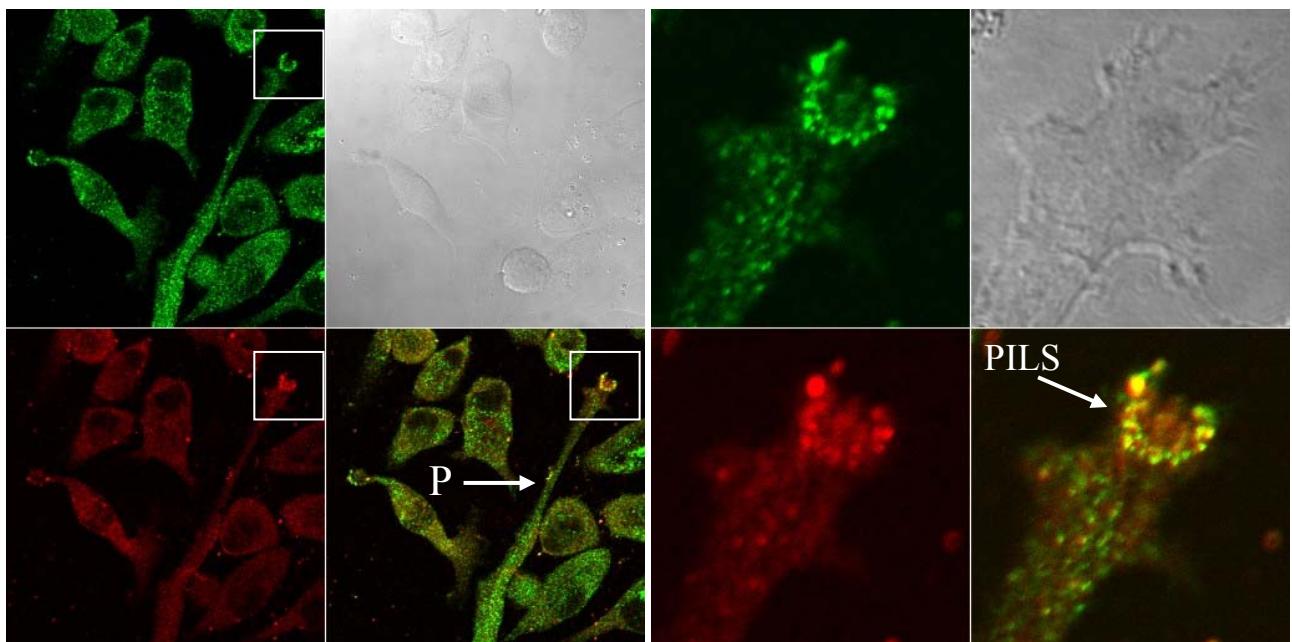
Slika 4-3: Celica PC3 s psevdopodijem (P) po tretiranju s PMA. Na konici psevdopodija (PILS) je vidna povečana lokalizacija katepsina X, v citoplazmi celic pa za lizosome značilna zrnata razporeditev prokatepsina X (L). Barvano s protitelesom 2F12-a proti katepsinu X (A) in protitelesom 3B10 proti (pro)katepsinu X (B).

S konfokalnim mikroskopom smo v celicah PC3 preverili tudi kolokalizacijo katepsina X in integrinov z verigo $\beta 2$ oz. $\beta 3$. Katepsin X se najbolje kolokalizira tako z integrini z

verigo β 3 (slika 4-4) kot z integrini z verigo β 2 (slika 4-5) v konicah psevdopodijev (PILS), kjer so integrini, podobno kot katepsin X, kot zrnca razporejeni v obliki prstana. Glede na znano vlogo integrinov pri medcelični komunikaciji in adheziji, njihova lokalizacija v konici psevdopodija ni presenetljiva. S psevdopodijami namreč celice med invazijo komunicirajo z okoliškimi celicami in na takšen način najverjetneje tudi določijo tip celičnega okolja v katerega prodirajo. Prokatepsin X, ki ima dve vezavnii mesti za integrine (RGD na proregiji in ECD na aktivnem delu), bi se kolokaliziral z integrini (predvsem z motivom RGD na β 3 verigo) na celični membrani ravno preko teh dveh vezavnih mest (17). Hkrati pa bi lahko katepsin X z delno proteolizo integrinske verige (predvsem β 2) te integrine tudi aktiviral, kar je bilo potrjeno pri imunskih celicah (36). Seveda bi za potrditev omenjenih dveh interakcij bilo potrebno natančneje določiti na kateri strani membrane se (pro)catepsin X nahaja.



Slika 4-4: Kolokalizacija katepsina X in integrinov z verigo β 3 v celicah PC3. Viden je psevdopodij (P) in povečava njegove konice (PILS). Barvano s protitelesom 2F12 proti katepsinu X (zelena barva) in protitelesom proti verigi β 3 integrinov (rdeča barva). V konici psevdopodija je povečana prisotnost ter dobra kolokalizacija katepsina X in integrinov z verigo β 3 (kolokalizacija je vidna na rumenih delih).



Slika 4-5: Kolokalizacija katepsina X in integrinov z verigo $\beta 2$ v celicah PC3. Viden je psevdopodij (P) in povečava njegove konice (PILS). Barvano s protitelesom 2F12 proti katepsinu X (zeleno barva) in protitelesom proti verigi $\beta 2$ integrinov (rdeča barva). V konici psevdopodija je povečana prisotnost ter dobra kolokalizacija katepsina X in integrinov z verigo $\beta 2$ (kolokalizacija je vidna na rumenih delih).

Pod fluorescenčnim mikroskopom smo opazovali tudi kokulture celic PC3 z monocitno celično linijo U937, ki smo jo s PMA diferencirali v makrofage. Na celicah PC3 se podobno kot pri monokulturi vidijo psevdopodiji s podobnim vzorcem razporeditve katepsina X.

4.3 PRETOČNA CITOMETRIJA

S pomočjo pretočne citometrije smo na površini celic PC3 kvantitativno določali (pro)catepsin X ter integrine z verigami $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 3$. Najprej smo uporabljali nekonjugirana primarna protitelesa **2F12-a**, **2F12-b** in **3B10** v kombinaciji z Alexa Fluor[®] 555 konjugiranim sekundarnim protitelesom. Zaradi nizkih odzivov smo prešli na fluorescenčno označeno primarno Ab 3B10-488, ki je dajalo veliko boljše odzive. S fluorescenčno označitvijo smo pridobili 3B10-488 s koncentracijo $\gamma=0,359$ mg/mL in stopnjo označenosti 7,13 molov Alexa Fluor[®] 488 na mol protitelesa.

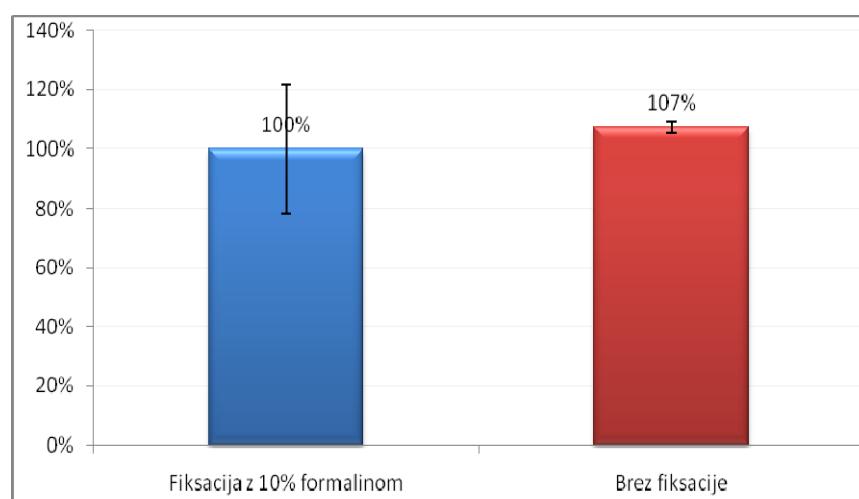
(Pro)catepsin X smo določali na površini netretiranih celic PC3 in po dodatku enega izmed

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

naslednjih aktivatorjev v celično gojišče:

- PMA (forbolni ester in tumorski promotor, ki vpliva na diferenciacijo celic)
- EGF (epidermalni rastni dejavnik, ki vpliva na celično rast, proliferacijo in diferenciacijo)
- peptid RGD (tripeptidno vezavno zaporedje za integrine $\beta 3$).

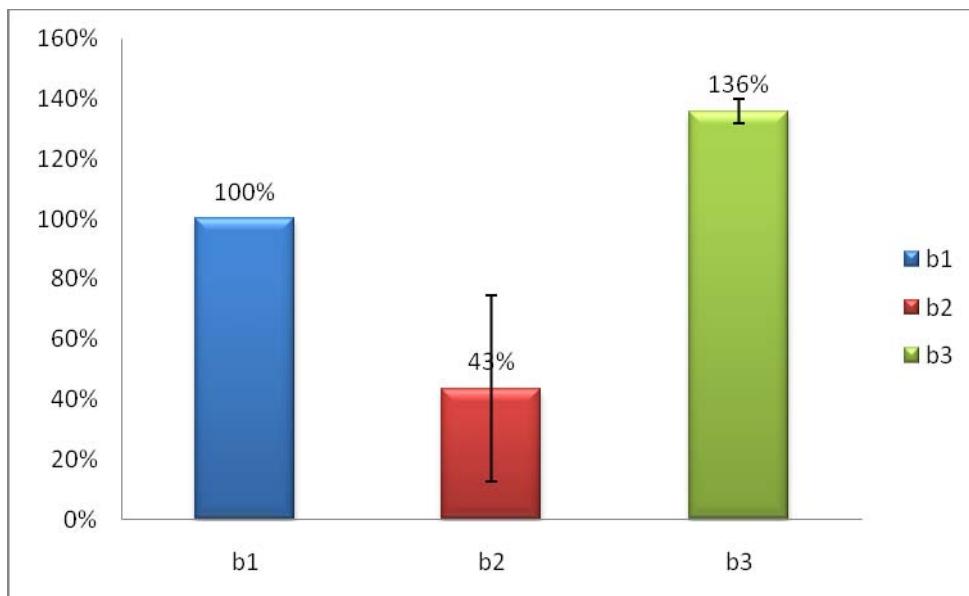
Da bi izboljšali ponovljivost meritev, smo poskušali variirati postopek fiksacije celic, tako da smo celice PC3 fiksirali na koncu, po tem, ko smo jih inkubirali s protitelesi, vendar so bili rezultati slabši kot s klasično (začetno) fiksacijo. Poskusili smo tudi brez fiksacije (slika 4-6) in ugotovili, da odsotnost fiksacije ne vpliva na odzive, ki jih dajejo protitelesa, izboljša pa se ponovljivost med vzporednimi vzorci (paralelkami). Zaradi tega smo poskuse nadalje izvajali brez fiksacije.



Slika 4-6: Vpliv fiksacije na prisotnost celokupnega katepsina X in prokatepsina X na površini celic PC3. Odzivi brez fiksacije so primerljivi z odzvi pri uporabi 10 % formalina kot fiksativa.

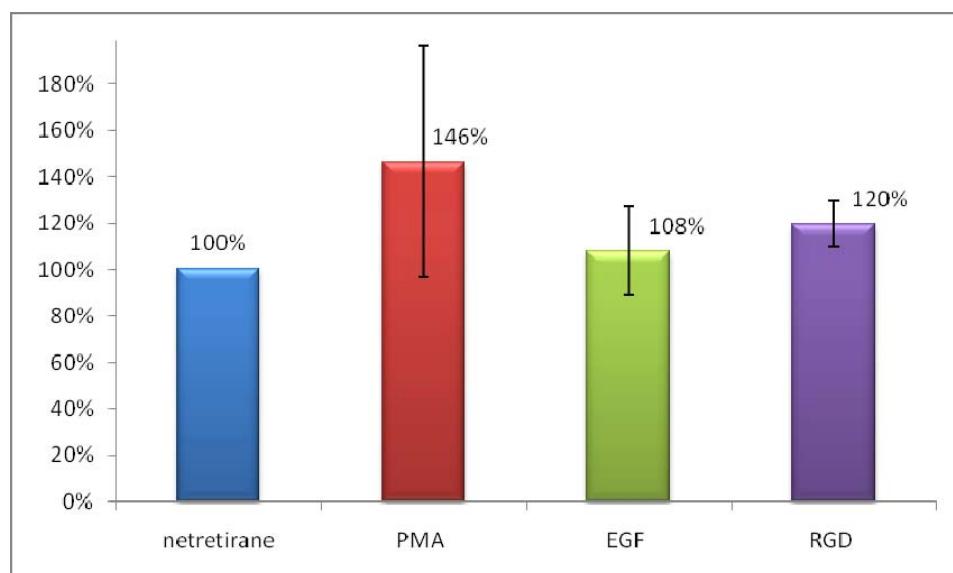
Kvantifikacija integrinov na netretiranih celicah PC3 je pokazala, da je mogoče na površini celic prisotne integrine z verigami $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 3$ detektirati z monoklonskimi protitelesi. Na površini celic PC3 je prisotnih največ integrinov z verigo $\beta 3$, najmanj pa integrinov z verigo $\beta 2$ (slika 4-7).

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)



Slika 4-7: Izraženost integrinov $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 3$ na površini celic PC3. Pri vrednosti za integrine $\beta 1$ standardna napaka zaradi normalizacije vrednosti $\beta 2$ in $\beta 3$ integrinov na $\beta 1$ ni prikazana.

Po dodatku PMA, EGF ali RGD v gojišče celic PC3 je prišlo do povečane prisotnosti (pro)catepsina X na površini celic PC3 v primerjavi z netretiranimi celicami (slika 4-8). Ker je bilo uporabljen mAb 3B10-488, je bila s pretočno citometrijo na površini celic določena celokupna množina catepsina X in procatepsina X.



Slika 4-8: Vpliv različnih dodatkov v rastnem gojišču na prisotnost celokupnega catepsina X in procatepsina X na površini celic PC3. Pri vrednosti za netretirane celice standardna napaka zaradi normalizacije tretiranih celic glede na netretirane ni prikazana. Uporabljeno je bilo mAb 3B10-488.

Povečanje prisotnosti (pro)catepsina X je lahko posledica povečane ekspresije gena ali pa

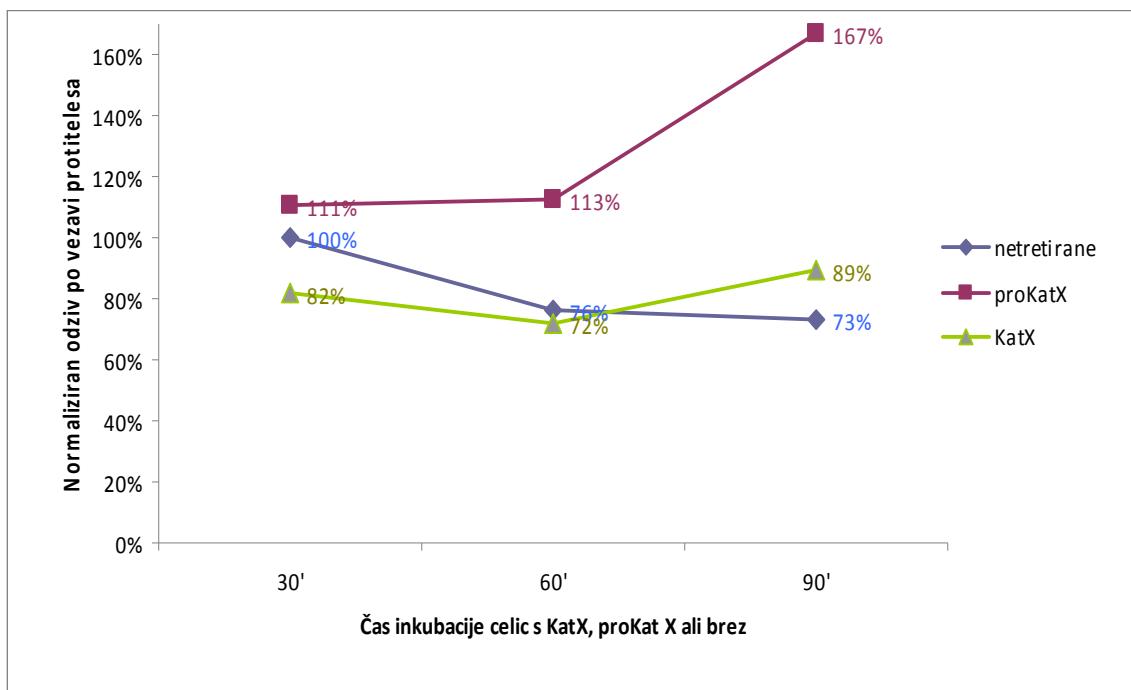
Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

translokacije encima iz celičnih depojev (npr. lizosomov). Na povečanje prisotnosti (pro)catepsina X najbolj vpliva PMA, nekoliko manj peptid RGD in najmanj EGF. Forbolni ester PMA je znan induktor celične diferenciacije, ki se posledično pokaže v spremenjenih nivojih različnih proteinov. Povečana prisotnost (pro)catepsina X je najverjetneje posledica stresa, ki ga celici povzroči prisotnost PMA. Celica se odzove na stres s povečanjem proteaz, med njimi tudi katepsina X.

Za celice PC3 je znano, da imajo na svoji površini receptorje za epidermalni rastni dejavnik (EGF-R), ki so del signalizacijske poti, preko katere EGF pospešuje njihovo proliferacijo in migracijo. Z inhibicijo te poti so uspeli zmanjšati migratorni (67) in invazivni (68) potencial celic PC3. Po dodatku EGF v gojišče je sicer prišlo do povečane prisotnosti (pro)catepsina X na površini celic PC3, vendar povečanje ni bilo statistično značilno. Opažanje nakazuje, da prisotnost (pro)catepsina X na površini ni odvisna od signalizacijske poti, ki jo na celični membrani sproža EGF.

Interakcija prokatepsina X z integrini $\beta 3$, ki se vzpostavi preko zaporedja RGD je bil razlog za eksperiment z dodatkom peptida RGD v gojišče s celicami PC3. Peptid RGD tekmuje s prokatepsinom X za vezavno mesto na integrinu $\beta 3$. Presenetljivo se je prisotnost prokatepsina X na površini celic PC3 nekoliko povečala. Omenjeni pojav bi lahko razložili z nespecifično vezavo majhne molekule peptida RGD na celično membrano in posledično nespecifično vezavo prokatepsina X (tudi) na neintegrinske komponente celične membrane.

Tarče na celični membrani celic PC3 smo želeli kvantificirati tudi kinetično. V gojišče celic PC3 smo dodali prokatepsin X ali katepsin X in inkubirali 30, 60 in 90 min. Vezava protitelesa 3B10-488 je bila časovno odvisna in višja kot pri celicah, ki jim v gojišče nista bila dodana prokatepsin X ali katepsin X (izjema je bila časovna točka 30 min) (slika 4-9). S časom se je vezava prokatepsina X močno povečevala (na 167 % glede na netretirane celice), vezava katepsina X pa le rahlo (iz 82 % na 89 % glede na netretirane celice). Rezultati potrjujejo, da obstaja na površini celic PC3 ena ali več tarč, na katere se veže prokatepsin X. Ena izmed teh tarč je po vsej verjetnosti integrin z verigo $\beta 3$.



Slika 4-9: Vezava protitelesa 3B10-488 na celice PC3 po dodatku prokatepsina X in katepsina X v gojišče, glede na čas inkubacije. Prokatepsin X in katepsin X smo pustili v gojišču s celicami PC3 inkubirati 30, 60 in 90 minut.

4.4 PREPOZNAVANJE PEPTIDOV PROREGIJE PROKATEPSINA X S STRANI PROTITELES 3B10 IN 2F12

V laboratoriju Katedre za farmacevtsko biologijo uporabljamo monoklonsko protitelo, ki prepoznavajo (pro)catepsin X (3B10) in monoklonsko protitelo, ki prepoznavajo catepsin X (2F12). MAb 2F12 je nevtralizacijsko protitelo, saj pride pri vezavi tega protitelesa na catepsin X do inhibicije njegove encimske aktivnosti. Epitop, ki ga mAb 2F12 prepozna je najverjetneje v ali zelo blizu aktivnega mesta. MAb 3B10 inhibitornega učinka na catepsin X nima, epitop, ki ga prepozna, pa ni poznan. Iz dosedanja uporabe mAb 3B10 so sklepali, da se njegov epitop nahaja nekje na zreli obliki in ne na proregiji encima, saj protitelo 3B10 prepoznavajo tako catepsin X kot prokatepsin X (40). Zanimalo nas je, ali protitelesi prepoznavata katerega od peptidov p#1, p#2 in p#3, ki ustrezajo začetnemu, srednjemu in končnemu delu proregije prokatepsina X (slika 3-5).

Pri testu direktna ELISA smo uporabili mAb 3B10-HRP in mAb 2F12-a. Za primerjavo smo kot referenčna antigena uporabili prokatepsin X (ProX-a) in catepsin X (KatX-a in KatX-b). Peptidi p#1, p#2 in p#3 so približno 18-krat manjši od prokatepsina X ter približno 15-krat manjši od catepsina X, zato imajo pri vezavi na površino mikrotitrsko

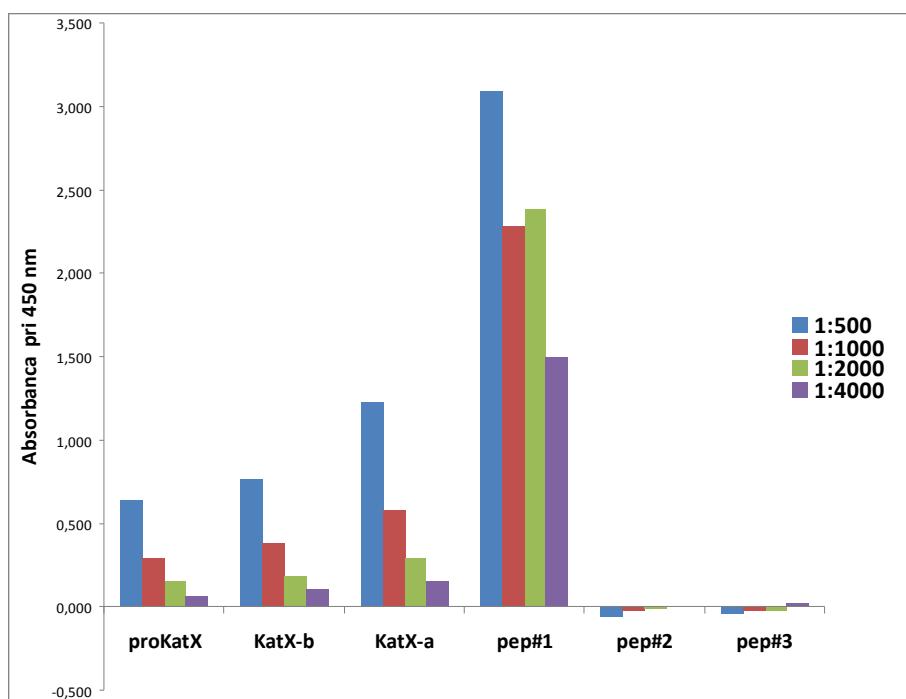
Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

ploščice več prostostnih stopenj. Vežejo se lahko planarno in tako niso dostopni za protitelo. Za izboljšanje sterične dostopnosti, smo za vezavo na površino uporabili različne koncentracije peptidov in kot kompromisno rešitev izbrali 90-kratni prebitek peptidov (2,7 μM) v primerjavi s (pro)catepsinom X (30 nM).

V testu direktna ELISA s protitelesi 3B10-HRP smo uporabili sledeči testni sistem:

1.	Ag	ProX-a	$\gamma_k = 1 \mu\text{g/mL} = \sim 30 \text{ nM}, V = 100 \mu\text{L}$
		KatX-a	
		KatX-b	
		p#1, p#2, p#3	$\gamma_k = 5 \mu\text{g/mL} = 2,7 \mu\text{M}, V = 100 \mu\text{L}$
2.	konjugirano primarno Ab	3B10-HRP	R = 1:500 do 1:4000, V = 100 μL , 120 min inkubacije

Odzivi kažejo, da protitelo 3B10-HRP od treh peptidov proregije prepozna samo p#1 (slika 4-10). Protitelo skoraj enako dobro prepoznavajo dve različni seriji katepsina X in prokatepsin X. Manjše razlike v odzivih so verjetno posledica odstopanj dejanske množine aktivnega encima od njegove nominalne koncentracije določene spektrofotometrično.



Slika 4-10: Prepoznavanje peptidov p#1, p#2 in p#3 s strani protitelesa 3B10-HRP s testom direktna ELISA. Za primerjavo so kot referenčni antigeni bili uporabljeni prokatepsin X in dva katepsina X (dveh različnih serij izolacije).

Vezava protitelesa 3B10 na peptid p#1, ki predstavlja začetni del proregije kaže na to, da

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

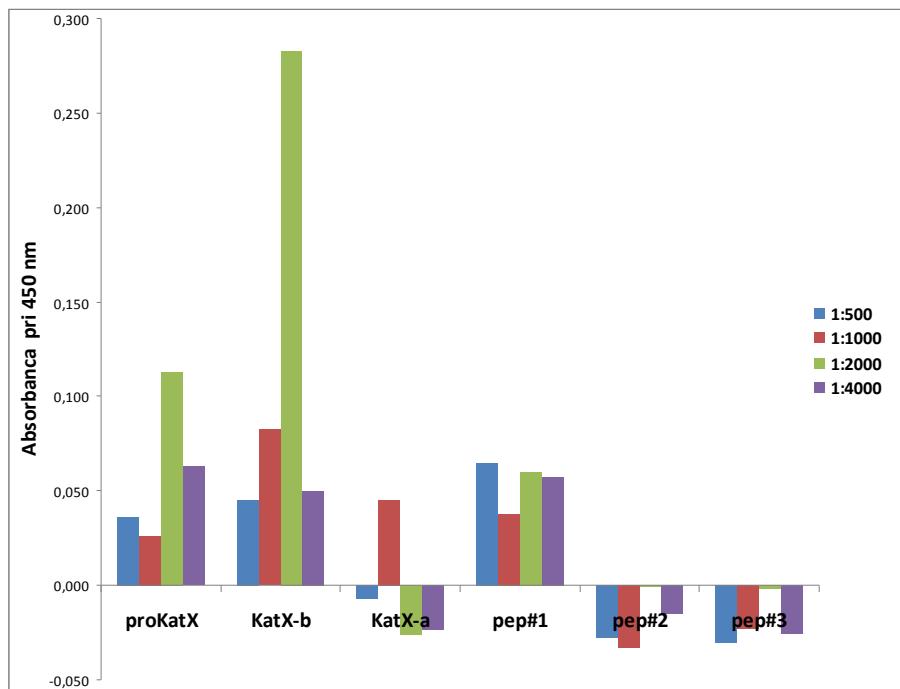
bi začetni del proregije prokatepsina X lahko predstavljal epitop na prokatepsinu X, ki ga prepozna protitelo 3B10. V tem primeru se postavlja vprašanje, zakaj mAb 3B10 prepozna tudi katepsin X, pri katerem naj bi po proteolitični aktivaciji s katepsinom L proregija ne bila več prisotna. Navidezno kontradiktornost si lahko razlagamo le s tem, da je v raztopini katepsina X prisotna tudi njegova proregija. To bi bilo mogoče le v primeru, da ostane kljub cepitvi amidne vezi med D38 proregije in L1 aktivne oblike katepsina X, ki jo katalizira katepsin L, proregija še vedno povezana preko disulfidnega mostička z aktivnim mestom katepsina X. Razlago lahko podkrepi tudi dejstvo, da že aktivirani katepsin X potrebuje za svojo encimsko aktivnost vedno nekaj reducenta DTT (v mM koncentraciji), ki cistein v aktivnem mestu vsakič znova sprosti (mogoče od nanj vezane proregije).

Izvedli smo tudi test ELISA s protitelesom 2F12-a in pri tem uporabili sledeči testni sistem:

1.	Ag	ProX-a	$\gamma_k = 1 \mu\text{g/mL} = \sim 30 \text{ nM}, V = 100 \mu\text{L}$
		KatX-b	
		KatX-a	
		p#1, p#2, p#3	$\gamma_k = 50 \text{ ng/mL} = \sim 30 \text{ nM}, V = 100 \mu\text{L}$
2.	primarno Ab	2F12-a	R = 1:500 do 1:4000, V = 100 μL , 120 min inkubacije
3.	konjugirano sekundarno Ab	kozja protimišja-HRP	R = 1:1000

Tudi protitelo 2F12-a prepozna tako katepsin X kot prokatepsin X ter (sicer nekoliko slabše kot protitelo 3B10) tudi peptid p#1 (slika 4-11). Odziv, ki ga daje protitelo 2F12 v kombinaciji s HRP-konjugiranim sekundarnim protitelesom je pričakovano slabši kot z mAb 3B10-HRP, saj je odvisen tako od učinkovitosti vezave primarnega protitelesa na antigen, kot tudi od učinkovitosti vezave sekundarnega na primarno protitelo. Prav tako je slabši odziv lahko posledica encimske aktivnosti HRP, vezane na sekundarno protitelo, ki je lahko manjša od encimske aktivnosti HRP, vezane na primarno protitelo. Odzivi dobljeni z uporabo mAb 2F12 prav tako niso bili koncentracijsko odvisni, kar nakazuje, da test ELISA s tem protitelesom ni najbolj reprezentativen. Sicer nas je spoznanje, da protitelo 2F12 prepozna tudi prokatepsin X nekoliko presenetilo, saj bi sklepali, da je aktivno mesto, ki ga protitelo 2F12 prepozna na katepsinu X, pri prokatepsinu X nedostopno za

protitelo. Prekriva ga namreč proregija, ki s cisteinom v aktivnem mestu v nereducirajočih pogojih tvori disulfidno vez.



Slika 4-11: Prepoznavanje peptidov p#1, p#2 in p#3 s strani protitelesa 2F12-a z indirektnim testom ELISA. Za primerjavo so bili kot referenčni antigeni uporabljeni prokatepsin X in katepsin X iz dveh serij.

4.5 AKTIVNOST KATEPSINA X V PRISOTNOSTI PEPTIDOV PROREGIJE

Ker lahko tvori peptid p#1 s cisteinom aktivnega mesta katepsina X disulfidno vez, bi lahko omenjeni peptid deloval inhibitorno na katepsin X. V testu aktivnosti katepsina X s fluorescenčnim substratom Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH smo preverili vpliv peptida p#1 kot potencialnega inhibitorja in peptida p#3 kot negativne kontrole, ki se ne veže kovalentno na aktivno mesto, na aktivnost katepsina X. V času inkubacije smo uporabili aktivacijski pufer (EAB), ki je vseboval 5 mM reducenta DTT in oba peptida v treh različnih koncentracijah (2 µM, 20 µM in 200 µM).

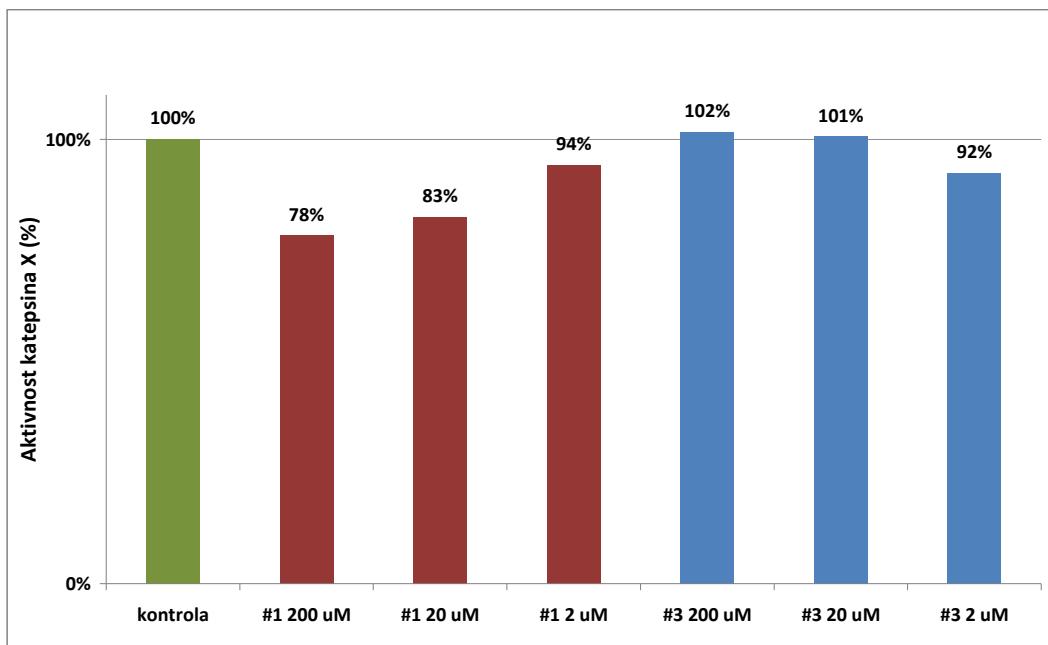
Uporabili smo sledeči testni sistem:

1.	KatX-a	50 µL	C _k = 10 nM
2.	p#1, p#3	40 µL	C _k = 2 µM, 20 µM, 200 µM
3.	substrat v EAB z DTT	10 µL	C _k SUB = 5 µM, C _k DTT v EAB = 5 mM

Peptid p#1 je nekoliko inhibiral aktivnost katepsina X (78 % rezidualna aktivnost pri 200

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

μM p#1), inhibicija pa je padala z zmanjševanje koncentracije peptida p#1 (slika 4-12). Peptid p#3 pri enakih pogojih ni statistično značilno inhibiral katepsina X.



Slika 4-12: Aktivnosti katepsina X glede na različne koncentracije dodanih peptidov p#1 in p#3. Peptida in katepsin X sta bila predinkubirana 10 min pri temperaturi 37 °C pred dodatkom substrata.

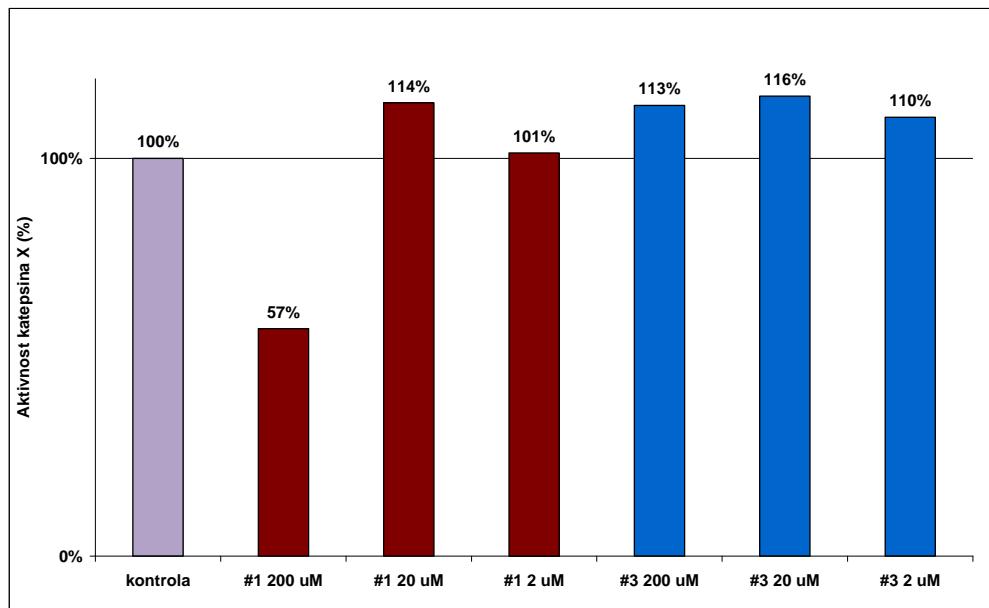
Inhibicija katepsina X s strani peptida p#1 nakazuje, da so bila naša predvidevanja o tvorbi disulfidne vezi z aktivnim mestom pravilna. Kljub temu smo pričakovali bolj izrazito inhibicijo. Razlog za inhibicijo v zgornjem mikromolarnem območju peptida p#1 je najverjetneje sočasna prisotnost DTT med inkubacijo peptida s katepsinom X. Odločili smo se, da bomo peptida najprej inkubirali s katepsinom X brez prisotnosti DTT, nato pa bomo tukaj pred meritvijo dodali še DTT v končni koncentraciji 5 mM, saj je le-ta za aktivnost katepsina X nujno potreben.

Uporabili smo sledeči testni sistem:

1.	p#1, p#3	40 μL	$C_k = 2 \mu\text{M}, 20 \mu\text{M}, 200 \mu\text{M}$
2.	KatX-a	40 μL	$C_k = 10 \text{nM}$
3.	EAB z DTT	10 μL	$C_k \text{DTT v EAB} = 5 \text{ mM}$
4.	substrat v EAB brez DTT	10 μL	$C_k \text{SUB} = 5 \mu\text{M}$

Inhibicija, ki smo jo dobili pri koncentraciji 200 μM peptida p#1 je bila v novem testnem sistemu veliko bolj izrazita (57 % rezidualne aktivnosti, namesto 78 %) (slika 4-13). Peptid

p#3 tudi pri teh pogojih ni inhibiral katepsina X. Vseeno moramo upoštevati dejstvo, da prisotnost DTT kompetitivno zmanjšuje inhibitorno aktivnost pepida p#1, zato je teoretični maksimalni inhibitorni potencial p#1 najverjetnejše večji od dobljenega z našim sistemom.



Slika 4-13: Aktivnosti katepsina X glede na različne koncentracije dodanih peptidov p#1 in p#3 ter dodatkom DTT tik pred meritvijo. Peptida in katepsin X sta bila predinkubirana 30 min, po aktivaciji z EAB smo inkubirali še 5 min pri 37 °C in dodali substrat.

4.6 AKTIVACIJA PROKATEPSINA X Z DTT

Glede na zgoraj dobljene rezultate, ki kažejo inhibitorno vlogo začetnega dela proregije prokatepsina X, ki jo posnema peptid #1 ter kompetitvenega delovanja med DTT in peptidom #1, smo želeli preveriti, ali bi lahko zgolj z DTT uspeli aktivirati prokatepsin X brez predhodne encimske aktivacije s katepsinom L. Prokatepsin X smo inkubirali v aktivacijskem pufru z različnimi koncentracijami DTT (0, 5, 10, 20 in 50 mM) in za določitev aktivnosti uporabili fluorescenčni substrat Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH. Ker eden izmed proizvajalcev rekombinantnega prokatepsina X navaja, da lahko prokatepsin X neencimsko aktiviramo z DTT v aktivacijskem pufru pH 3,5 (namesto pH 5,5) smo za aktivacijo uporabili tudi ta pufer (69).

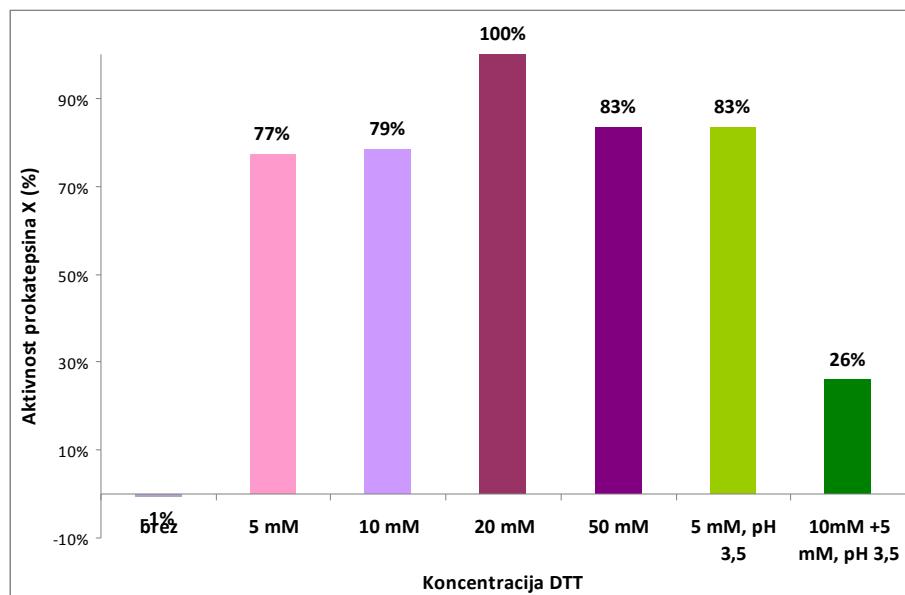
Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

Uporabili smo sledeči testni sistem:

1.	substrat v EAB brez DTT	10 µL	$C_k \text{ SUB} = 5 \mu\text{M}$
2a.	ProX-c	80 µL	$C_k = 10 \text{ nM}$
2b.	ProX-c	80 µL	$C_k = 10 \text{ nM}$
2c.	KatX-a	80 µL	$C_k = 10 \text{ nM}$
2d.	KatX-c	80 µL	$C_k = 10 \text{ nM}$
3a.	EAB brez in z DTT	10 µL	$C_k \text{ DTT v EAB} = 0 \text{ mM}, 5 \text{ mM}, 10 \text{ mM}, 20 \text{ mM}$ in 50 mM
3b.	EAB pH 3,5 z DTT	10 µL	$C_k \text{ DTT v EAB} = 5 \text{ mM}; C_k \text{ DTT v EAB} = 10 \text{ mM}$ (5 min, sobna T), nato razredčimo na 5 mM
3c.	EAB z DTT	10 µL	$C_k \text{ DTT v EAB} = 5 \text{ mM}$
3d.	EAB z DTT	10 µL	$C_k \text{ DTT v EAB} = 5 \text{ mM}$

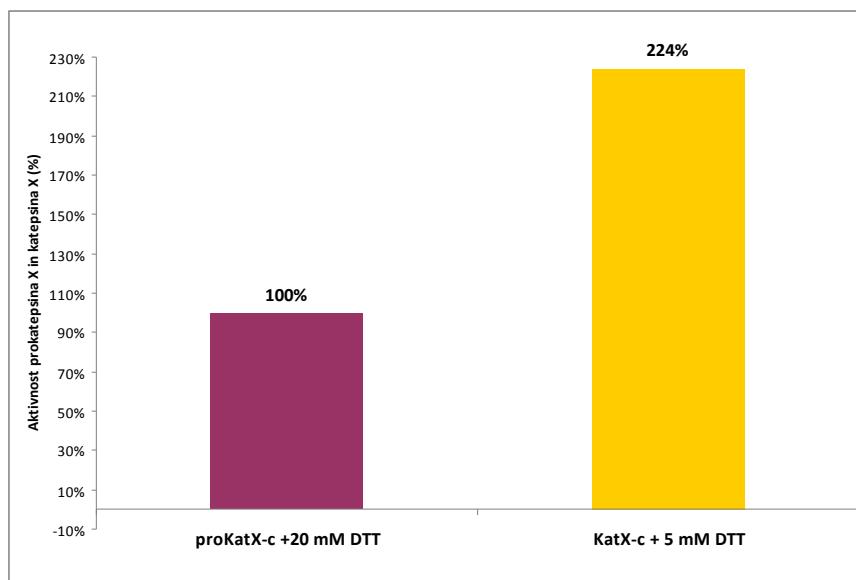
Že sama prisotnost DTT je bila dovolj, da je prokatepsin X izkazal encimsko aktivnost na specifičnem substratu za katepsin X. DTT je aktiviral prokatepsin X v vseh uporabljenih koncentracijah, najbolje pa se je aktiviral v aktivacijskem pufru z dodatkom 20 mM DTT (slika 4-14).

V naših poskusih smo lasten rekombinantni prokatepsin X uspeli najbolje aktivirati z uporabo 20 mM DTT pri pH 5,5.



Slika 4-14: Aktivnost prokatepsina X glede na različne koncentracije DTT in spremenjen aktivacijski pufer.

Aktivnost z 20 mM DTT aktiviranega prokatepsina X smo primerjali z aktivnostjo katepsina X, ki je bil aktiviran po klasičnem proteoliznem postopku s katepsinom L. Ugotovili smo, da je uspešnost neencimske aktivacije v primerjavi z encimsko sicer slabša, vendar kljub temu zelo obetavna (slika 4-15). Neencimska aktivacija predstavlja lažjo pot kot uporaba katepsina L in ne zahteva nadaljnega kromatografskega čiščenja. Zaradi izgub pri postopku čiščenja katepsina X od katepsina L, bi lahko bila neencimska aktivacija celo bolj racionalna pot za pridobivanje katepsina X.



Slika 4-15: Aktivnost prokatepsina X, aktiviranega z DTT, in katepsina X, aktiviranega s katepsinom L.

5. SKLEP

Vloga katepsina X, ki se v velikih koncentracijah nahaja v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3), še ni pojasnjena. V sklopu diplomskega dela smo prišli do naslednjih sklepov:

1. Iz hibridomske celične linije je bilo s pomočjo afinitetne kromatografije izolirano in očiščeno mAb 2F12. S testom ELISA je bila potrjena prisotnost funkcionalnega protitelesa, ki pa je bilo v povprečju 2,9-krat manj učinkovito kot predhodno izolirano protitelo.
2. Z imunocitokemičnimi testi in fluorescenčno mikroskopijo je bilo s pomočjo fluorescenčno označenih protiteles dokazano, da se katepsin X nahaja predvsem v konici psevdopodijev, znanih kot PILS, prokatepsin X pa v lizosomih celic PC3. Katepsin X se v konici psevdopodijev kolokalizira z integrini z verigo $\beta 2$ oz. $\beta 3$ in bi lahko imel pomembno vlogo pri medcelični komunikaciji, adheziji in invazivnosti adenokarcinoma prostate. V kokulturi celic PC3 z monocitno celično linijo U937, diferencirane s PMA v makrofage, so bili na celicah PC3 ravno tako vidni psevdopodiji s podobnim vzorcem razporeditve katepsina X.
3. S pretočno citometrijo je bilo dokazano, da so na plazemski membrani celic PC3 različno izraženi integrini z verigami $\beta 3$, $\beta 1$ in $\beta 2$ (v takšnem padajočem vrstnem redu njihove množine).
4. Dodatek forbolnega estra PMA je povzročilo povečanje prisotnosti (pro)catepsina X na površini celic PC3 v primerjavi z netretiranimi celicami, saj je PMA znan induktor izražanja mnogih proteinov.
5. Povečanje zaradi EGF ni bilo statistično značilno, kar kaže na to, da (pro)catepsin X na površini celic PC3 ni odvisen od signalizacijske poti, ki jo EGF sproži po vezavi na receptor EGF-R.
6. Dodatek tripeptidnega vezavnega zaporedja RGD za integrine z verigo $\beta 3$ v gojišče je proti pričakovanjem nekoliko povečal prisotnost (pro)catepsina X na površini, čeprav bi moral peptid tekmovati s prokatepsinom X za vezavna mesta na integrinu $\beta 3$. Vzrok temu so najverjetneje nespecifične interakcije med peptidom RGD in (pro)catepsinom X.
7. S kinetičnim poskusom vezave dodanega (pro)catepsina X je bil na površini celic PC3 potrjen obstoj ene ali več tarč, na katere se veže prokatepsin X, ne pa tudi katepsin X. S

Proučevanje vloge katepsina X v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3)

časom se je vezava prokatepsina X močno povečevala (na 167 % glede na netretirane celice), vezava katepsina X pa le rahlo (iz 82 % na 89 % glede na netretirane celice). Ena izmed teh tarč je po vsej verjetnosti integrin z verigo $\beta 3$.

8. Protitelo 3B10 poleg prokatepsina X in katepsina X zelo dobro prepoznavata tudi peptid p#1, ki predstavlja začetni del proregije, ne pa tudi preostalih delov proregije prokatepsina X (p#2, p#3). Začetni del proregije prokatepsina X bi tako lahko predstavljal epitop na prokatepsinu X, ki ga protitelo 3B10 prepoznavata. Špekuliramo lahko, da je prisotnost (s katepsinom L cepljene) proregije vzrok, da protitelo prepoznavata poleg prokatepsina X tudi katepsin X.
9. Peptid p#1 inhibira aktivnost katepsina X v zgornjem mikromolarnem območju. Inhibicija je izrazitejša, kadar med inkubacijo z encimom ni prisoten reducent DTT, ki kompetitivno prekinja disulfidno vez, ki jo peptid p#1 tvori z aktivnim mestom katepsina X.
10. Reducent DTT, prisoten v aktivacijskem pufru, lahko brez prisotnosti katepsina L, aktivira prokatepsin X.

Na osnovi zgoraj omenjenih sklepov lahko z večjo verjetnostjo trdimo, da so integrini v celicah PC3 tarče (pro)catepsina X, zlasti integrini z verigo $\beta 3$. S tem je bolj verjetna tudi vloga katepsina X pri migraciji, adheziji, proliferaciji in morfologiji celic PC3. Hkrati z eksperimenti na celicah PC3 je bila tekom diplomske naloge osvetljena vloga začetnega dela proregije prokatepsina X, ki inhibira katepsin X, najverjetneje preko tvorbe disulfidnega mostička s cisteinom aktivnega mesta. Omenjeni del proregije tudi predstavlja epitop, ki ga prepoznavata protitelo 3B10. Dokazano je bilo tudi, da encimska aktivacija prokatepsina X ni edina pot, ampak lahko do aktivne oblike encima pridemo tudi z uporabo reducenta DTT.

6. LITERATURA

1. Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F.: *The Handbook of Proteolytic Enzymes*, Elsevier, Academic Press, 2004.
2. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 227-233.
3. Bird P.I., Trapani J.A., Villadangos J.A.: Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9(12): 871-82.
4. Jedinak A., Maliar T.: Inhibitors of proteases as anticancer drugs, *Neoplasma* 2005; 52(3): 185-92.
5. Lah T.T., Kos J., Blejec A., Frkovic-Georgio S., Golouh R., Vrhovec I., Turk V.: The Expression of Lysosomal Proteinases and Their Inhibitors in Breast Cancer: Possible Relationship to Prognosis of the Disease. *Pathol. Oncol. Res.* 1997; 3(2): 89-99.
6. Turk V., Kos J., Turk B.: Cysteine cathepsins (proteases)-On the main stage of cancer?, *Cancer Cell* 2004; 409-410.
7. Berti P.J. & Storer A.C.: Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteinases, *J. Mol. Biol.* 1995; 246: 273-283.
8. Turk B., Turk V. & Turk D.: Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors, *Biol. Chem.* 1997; 378: 141-150.
9. Mohamed M.M., Sloane B.F.: Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(10): 764-75.
10. Premzl A., Zavasnik-Bergant V., Turk V., Kos J.: Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro, *Exp. Cell Res.* 2003; 283(2): 206-14.
11. Turk V., Turk B., Turk D.; Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.* 2001; 20(17): 4629-33.
12. Kos J., Lah T.T.: Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer, *Oncol. Rep.* 1998; 5(6): 1349-61
13. Colbert J.D., Matthews S.P., Miller G., Watts C.: Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response, *Eur. J. Immunol.* 2009; 39(11): 2955-65.
14. Sivaraman J., Nägler D.K., 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.
15. Zavašnik-Bergant T., Turk B.: Cysteine proteases: destruction ability versus immunomodulation capacity in immune cells. *Bio Chem.* 2007; 388: 1141-49.

16. Puzer L., Cotrin S., Cezari M.H.S., Hirata I.Y., Juliano M.A., Stefe I., Turk D., Turk B., Juliano L., Carmona A.K.: Recombinant human cathepsin X is a carboxymonopeptidase only: a comparison with cathepsins B and L, Biol. Chem. 2005; 386: 1191-95.
17. Santamaria I., Velasco G., Pendas A.M., 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: 16816-23.
18. Nägler D.K., Zhang R., Tam W., Sulea T., Purisima E.O., Ménard R.: Human Cathepsin X: A Cysteine Protease with Unique Carboxypeptidase Activity, Biochemistry 1999; 38: 12648-54.
19. Kraulis P.J.: MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, J. Appl. Crystallogr. 1991; 24: 946-950.
20. Nägler D.K. & Menard R.: Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions, FEBS Letters 1998; 434: 135-139.
21. Lechner A.M., Assfalg-Machleidt I., Zahler S., Stoeckelhuber M., Machleidt W., Jochum M., Nägler D.K.: RGD-dependent Binding of Procathepsin X to Integrin α v β ₃ Mediates Cell-adhesive Properties, J. Biol. Chem. 2006; 281(51): 39588-97.
22. Kos J., Sekirnik A., Premzl A., Zavasnik-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, Exp. Cell Res. 2005; 306: 103-113.
23. Nägler D.K., Kruger S., Kellner A., Ziomek E., Menard R., Buhtz P., Krams M., Roessner A., and Kellner U.: Up-regulation of cathepsin X in the prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia, Prostate 2004; 60: 109-119.
24. Buhling F., Peitz U., Kruger S., Kuster D., Vieth M., Gerbert I., idr.: Cathepsins K, L, B, and W are differentially expressed in normal and chronically inflamed gastric mucosa, Biol. Chem. 2004; 385: 439-445.
25. Krueger S., Kalinski T., Hundertmark T., Wex T., Kuster D., Peitz U., Ebert M., Nagler D.K., Kellner U., Malfertheiner idr.: Upregulation of cathepsin X in Helicobacter Pylori gastritis and gastric cancer, J. Pathol. 2005; 207: 32-42.
26. Wendt W., Zhu X.R., Lubbert H., Stichel C.C.: Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice, Exp. Neurol. 2007; 204: 525-540.
27. Hynes R.O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, Cell 2002; 110: 673-687.
28. Takada Y., Ye X., Simon S.: The integrins, Genome Biol. 2007; 8(5): 215.

29. Humphries J.D., Byron A., Humphries M.J.: Integrin ligands at a glance, *J. Cell. Sci.* 2006; 119: 3901-3.
30. Van der Flier A. & Sonnenberg A.: Function and interactions of integrins, *Cell Tissue Res.* 2001; 305: 285-298.
31. Lauffenburger D.A. & Horwitz A.F.: Cell migration: a physically integrated molecular process, *Cell* 1996; 84: 359-369.
32. Longhurst C.M. & Jennings L.K.: Integrin-mediated signal transduction, *Cell Mol. Life Sci.* 1998; 54: 514-526.
33. Jevnikar Z., Obermajer N., Bogyo M., Kos J.: The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes, *Journal of Cell Science* 2008; 121(16): 2652-61.
34. Puklin-Faucher E., Sheetz M.P.: The mechanical integrin cycle, *J. Cell Sci.* 2009; 122: 179-86.
35. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors.: Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition, Hamilton (ON): [BC Decker](#); 2003, Figure 10-2.
36. Kos J., Jevnikar Z., Obermajer N.: The role of cathepsin X in cell signalling, *Cell Adhesion & Migration* 2009; 3(2): 164-166.
37. Jevnikar Z., Obermajer N., Kos J.: Cysteine Protease-Mediated Cytoskeleton Interactions With LFA-1 Promote T-Cell Morphological Changes, *Cell Motility and the Cytoskeleton* 2009; 66(11): 1030-40.
38. Obermajer N., Doljak B. in Kos J.: Cysteine cathepsins: regulators of antitumour immune response, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2006; 6: 1295-1309.
39. Nascimento F.D., Rizzi C.C., Nantes I.L., Stefe I., Turk B., Carmona A.K., Nader H.B., Juliano L., Tersariol I.L.S.: Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans, *Arch. Biochem. Biophys.* 2005; 436: 323–332.
40. Obermajer N., Premzl A., Zavasnik B. T., Turk, B., Kos, J., Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U937 cells, *Exp. Cell Res.* 2006; 312: 2515-27.
41. Obermajer N., Rupnik U., Jevnikar Z., Kreft M., Kos J.: Immunosuppressive activity of cysteine protease cathepsin X via activation of β 2 integrins, *Immunology* 2008; 124: 76-88.
42. Jevnikar Z., Obermajer N., Pečar-Fonović U., Karaoglanovic-Carmona A., Kos J.: Cathepsin X cleaves the β 2 cytoplasmic tail of LFA-1 inducing the intermediate affinity form of LFA-1 and α -actinin-1 binding, *Eur. J. Immunol.* 2009; 39(11): 3217-27.

43. internetni publikaciji univerze v Utahu:
<http://library.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/ PROSTATE/PROSTATE.html>
44. spletno gradivo za študente medicine - Urologija - Bolezni prostate:
<http://www.mf.uni-lj.si/dokumenti/cbcc469ebe4393d9d00303eachb921a75.pdf>
45. Cooper C. R., Chay C. H. & Pienta K. J.: The Role of $\alpha_V\beta_3$ in Prostate Cancer Progression, *Neoplasia* 2002; 4: 191-194.
46. <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1435&Template=cellBiology>
47. Zheng D. Q., Woodard A. S., Tallini G., and Languino L. R.: Substrate specificity $\alpha_V\beta_3$ integrin – mediated cell migration and phosphatidylinositol 3 - kinase /AKT pathway activation, *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 24565–74.
48. Zheng D. Q., Woodard A. S., Fornaro M., Tallini G., and Languino L.R.: Prostatic carcinoma cell migration via $\alpha_V\beta_3$ integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway, *Cancer Res.* 1999; 59: 1655–64.
49. Romanov V.I., and Goligorsky M.S.: RGD-recognizing integrins mediate interactions of human prostate carcinoma cells with endothelial cells in vitro, *Prostate* 1999; 39: 108–18.
50. Vozelj M. : Temelji imunologije, DZS d. d., Ljubljana, 2000: 66-71.
51. Operating Instructions for Amicon Ultrafilters, Publication I-101U.
52. Kuhelj R.: Biokemija v praksi: načela in tehnike, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2003: 28-29, 50-52.
53. <http://www.gehealthcare.com/protein-purification> GE Healthcare, nProtein A Sepharose 4 Fast Flow, Instructions 71-5027-85 AB.
54. http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_A
55. <http://www.made-in-china.com/showroom/biousing/product-detailyoPQCcKkkuVB/Chin a-24-Well-Cell-Culture-Plate.html>
56. <http://en.wikipedia.org/wiki/Immunocytochemistry>
57. http://www.sigmaproducts.com/catalog/Detail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=HT501128|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC
58. Molecular Probes. Alexa FluorTM 488 Protein Labeling Kit (MP 10235) Product information, Invitrogen, 2006.
59. <http://nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/index.html>

60. <http://sl.wikipedia.org/wiki/ELISA>
61. Crowther J. R.: ELISA, Theory and Practice, Institut for Animal Health, Woking, UK, 1995: 35-41.
62. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403 - detectionformats>
63. http://www.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk5809/molekulrana_imunologija_navodila_pretocna_citometrija_2010.pdf
64. Andlovic A., Avšič-Županc T., Ihan A., Kotnik V., Marin J., idr.: Priročnik za vaje iz mikrobiologije in imunologije za študente medicine, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2005: 47-51.
65. Aga M., Bradley J.M., Keller K.E., Kelley M.J., Acott T.S.: Specialized Podosome- or Invadopodia-like Structures (PILS) for Focal Trabecular Meshwork Extracellular Matrix Turnover, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008; 49: 5353–5365.
66. Lagana A., Vadnais J., Le P.U., Nguyen T.N., Laprade R., Nabi I.R., Noël J.: Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1, Journal of Cell Science 2000; 113: 3649-3662.
67. Madarame J., Higashiyama S., Kiyota H., Madachi A., Toki F., Shimomura T., Tani N., Oishi Y., Matsuura N.: Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor After Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor Shedding in the Migration of Prostate Cancer Cells Promoted by Bombesin, The Prostate 2003; 57: 187-195.
68. Angelucci A., Gravina G.L., Rucci N., Millimaggi D., Festuccia C., Muzi P., Teti A., Vicentini C., Bologna M.: Suppression of EGF-R signaling reduces the incidence of prostate cancer metastasis in nude mice, Endocrine-Related Cancer 2006; 13: 197-210.
69. R&D Systems, katalog št. 934-cy, referenca za aktivacijo prokatepsina X brez katepsina L <http://www.rndsystems.com/pdf/934-cy.pdf>