

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA VIŽIN

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA VIŽIN

**DOLOČANJE PROGNOŠTIČNE IN DIAGNOSTIČNE
VREDNOSTI KATEPSINA X PRI OVARIJSKEM IN
KOLOREKTALNEM RAKU**

**DETERMINING THE PROGNOSTIC AND DIAGNOSTIC
VALUE OF CATHEPSIN X IN OVARIAN AND
COLORECTAL CANCER**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa. Meritve in eksperimentalno delo sem opravljala v celičnem in biotehnološkem laboratoriju katedre za farmacevtsko biologijo na fakulteti za farmacijo. Imunizacija miši in priprava hibridomskih celičnih linij je bila izvedena na Biotehniški fakulteti pod vodstvom prof. dr. Mojce Narat.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi tekom študija in izdelave diplomske naloge stali ob strani, spodbujali in pomagali.

Posebej bi se rada zahvalila mentorju prof. dr. Janku Kosu za potrpežljivo in vztrajno usmerjanje ter pomoč, tako z nasveti, kot s praktičnim delom.

Najlepša hvala doc. dr. Nataši Obermajer, za uvajanje v laboratorijsko delo, pomoč, dobre nasvete in potrpežljivost.

Za lepo vzdušje, druženje in pomoč, hvala tudi vsem kolegom in kolegicam na Katedri za farmacevtsko biologijo, posebej Urši Pečar Fonović za pomoč pri laboratorijskem delu in nasvete; pa tudi Bojanu Doljaku za njegove spodbudne besede, pomoč, optimizem in nasvete. Hvala tudi Zali, Matiji, Bojani, Anji, Nataši, Petru in Mihi.

Hvala sošolkam za prijetno druženje, posebej Valentini, ki je vedno imela čas za spodbudno besedo.

Nazadnje bi se rada zahvalila svoji družini in Andražu, katerim dolgujem največ in na katere lahko vedno računam.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa.

Tjaša Vižin

I KAZALO VSEBINE

I KAZALO VSEBINE	I
II KAZALO SLIK	III
III KAZALO PREGLEDNIC	V
IV POVZETEK	VI
V ABSTRACT	VII
VI OKRAJŠAVE	VIII
VII OZNAKE AMINOKISLIN	X
1 UVOD	1
1.1 PROTEAZE	1
1.2 CISTEINSKI KATEPSINI	2
1.3 VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI NASTANKU IN NAPREDOVANJU MALIGNIH OBOLENJ.....	4
1.4 KATEPSIN X	5
1.4.1 Izražanje ter fiziološka in patološka vloga katepsina X.....	7
1.5 TUMORSKI KAZALCI	8
1.5.1 Cisteinski katepsini in cistatin C kot diagnostični in prognostični pokazatelji pri raku.....	9
1.5.2 Katepsin X kot diagnostični in prognostični pokazatelj in njegova detekcija.....	10
1.6 OVARIJSKI RAK.....	10
1.6.1 Katepsini in cistatin C pri ovarijskem raku	11
1.7 KOLOREKTALNI RAK	11
1.7.1 Cisteinski katepsini pri kolorektalnem raku	12
2 HIPOTEZA IN NAMEN DELA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Reagenti.....	14
KATEPSIN B.....	14
KATEPSIN H.....	14
KATEPSIN L	14
KATEPSIN S	14
KATEPSIN X.....	15
CISTATIN C	15
OSTALA PROTITELESA, STANDARDI IN REAGENTI	15
3.1.2 Laboratorijska oprema in aparature	16
3.1.3 Gojišča.....	17
3.1.4 Pufri, raztopine in geli.....	18
3.1.5 Klinični vzorci	22
3.2 METODE.....	24
3.2.1 Sinteza peptidov proregije prokatepsina X.....	24
3.2.2 Vezava peptidov na nosilno molekulo.....	24
3.2.3 Imunizacija miši.....	25

3.2.4	<i>Priprava in gojenje hibridomske celične linije</i>	26
3.2.5	<i>Izolacija in čiščenje protiteles</i>	27
3.2.6	<i>Poliakrilamidna gelska elektroforeza</i>	29
3.2.7	<i>Detekcija proteinov s prenosom po Westernu</i>	30
3.2.8	<i>Test ELISA</i>	31
	INDIREKTNI TEST ELISA.....	32
	DIREKTNI TEST ELISA.....	33
3.2.9	<i>Statistično vrednotenje rezultatov</i>	34
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	36
4.1	PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES IN TESTA ELISA ZA DOLOČANJE PROKATEPSINA X.....	36
4.1.1	<i>PROTITELESNI ODZIV PRI IMUNIZACIJI MIŠI S PEPTIDI PROREGIJE PROKATEPSINA X</i>	36
4.1.2	<i>TESTIRANJE HIBRIDOMOV</i>	36
4.1.3	<i>DOLOČANJE AFINITETE VEZAVE IN SPECIFIČNOSTI IZOLIRANIH PROTITELES PROTI PROKATEPSINU X</i>	37
	Določanje jakosti vezave izoliranih protiteles na ustreznih peptid z indirektnim testom ELISA.....	37
	Določanje jakosti vezave protiteles na prokatepsin X in njihove specifičnosti z indirektnim testom ELISA ter primerjava s protitelesi 3B10.....	38
	Določanje razlik v vezavi protiteles 3/1 pri enaki molarni koncentraciji prokatepsina X, katepsina X in p#3.....	39
	Prekloniranje hibridomov za protitelesa 3/1 in primerjava afinitet na p#3 in proX.....	40
	Vpliv dodatka DTT na prepoznavanje prokatepsina X in aktivnega katepsina X s protitelesi 3/1.....	40
	Vpliv dodatka DTT na prepoznavanje prokatepsina X in aktivnega katepsina X s protitelesi 3B10.....	42
	Določanje specifičnosti vezave protiteles 3/1 na prokatepsin X z SDS-PAGE in prenosom Western.....	42
	Določanje prisotnosti proregije v raztopini aktivnega katepsina X z SDS-PAGE in barvanjem s srebrom.....	44
	Določanje uporabnosti protiteles 3/1 v direktnem testu ELISA.....	45
4.2	DOLOČANJE KONCENTRACIJ KATEPSINA X IN OSTALIH KATEPSINOV TER CISTATINA C V CISTIČNI TEKOČINI RAKA JAJČNIKOV.....	46
	KATEPSIN B.....	46
	KATEPSIN H.....	47
	KATEPSIN L.....	48
	AKTIVNI KATEPSIN X.....	48
	CISTATIN C.....	49
4.2.1	<i>STATISTIČNA ANALIZA MERITEV</i>	50
	Vrednosti katepsinov B, H, L, X in cistatina C ter njihova povezanost s klinično-patološkimi spremenljivkami.....	50
	Razmerja med cistatinom C in katepsini ter njihova povezanost s klinično-patološkimi spremenljivkami.....	51
	Katepsini in cistatin C kot napovedni dejavniki preživetja bolnic z ovarijskim rakom.....	52
4.3	DOLOČANJE KONCENTRACIJ KATEPSINA X IN OSTALIH KATEPSINOV V SERUMU BOLNIKOV S KOLOREKTALNIM RAKOM IN KONTROLNIH SKUPINAH.....	54
	KATEPSIN H.....	55
	KATEPSIN S.....	55
	CELOKUPNI KATEPSIN X.....	56
4.3.1	<i>STATISTIČNA ANALIZA MERITEV</i>	57
	KATEPSIN H.....	57
	KATEPSIN S.....	58
	KATEPSIN X.....	60
5	SKLEPI	63
6	LITERATURA	65

II KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz terciarne strukture prokatepsina X.	6
Slika 2: Sestava peptidov p#1, p#2 in p#3 in primerjava s proregijo prokatepsina X. Označeno je zaporedje RGD in dodani končni cisteini.....	24
Slika 3: Struktura in reakcija konjugacije med nosilnim proteinom in peptidom s sulfhidrilno skupino preko sulfo-SMCC skupine (62).....	25
Slika 4: Različne vrste testa ELISA (75).	32
Slika 5: Izmerjene absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo preverjali protitelesni odziv miši po imunizaciji s posameznimi peptidi proregije.	36
Slika 6: Izmerjene absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo določili hibridome, ki proizvajajo protitelesa z najboljšo afiniteto na posamezne peptide.	37
Slika 7: Izmerjene absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo določali jakost vezave izoliranih protiteles na posamezni peptid.	38
Slika 8: Izmerjene absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo določali jakost vezave izoliranih protiteles 1/1, 2/3 in 3/1 ter protiteles 3B10 na prokatepsin X in katepsin X.	39
Slika 9: Izmerjene absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo primerjali jakost vezave protiteles 3/1 na enake molarne koncentracije prokatepsina X, katepsina X in 3. peptida.	40
Slika 10: Absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo preučevali vpliv DTT na prepoznavanje prokatepsina X in katepsina X s protitelesi 3/1.	41
Slika 11: Absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo preučevali vpliv DTT na prepoznavanje prokatepsina X in katepsina X s protitelesi 3B10.	42
Slika 12: Določanje specifičnosti vezave protiteles 3/1 in 3B10 na prokatepsin X in katepsin X po SDS-PAGE in prenosu Western; vizualizacija na G-BOXU.	43
Slika 13: Gel po SDS-PAGE, obarvan s srebrom; določanje prisotnosti proregije v raztopini aktivnega katepsina X.	44
Slika 14: Izmerjene absorbance pri direktnem testu ELISA, s katerim smo določali uporabnost protiteles 3/1 za merjenje prokatepsina X v bioloških vzorcih in vrednosti primerjali z rezultati, dobljenimi z direktnim testom ELISA z R&D protitelesi.	45
Slika 15: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina B v vzorcih.	47
Slika 16: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina H v vzorcih.	47
Slika 17: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina L v vzorcih.	48
Slika 18: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina X v vzorcih.	49
Slika 19: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije cistatina C v vzorcih.	49
Slika 20: A: razlika v razmerjih CisC/KatB med bolnicami z metastatskim tipom (n=20) in nemetastatskim (n=30) EOK; p= 0,025. B: razlika v razmerjih CisC/KatH med bolnicami s seroznim (n=23), mucinoznim (n=14) in endometrioidnim (n=6) tipom EOK; p=0,012.	51
Slika 21: C: razlika v razmerjih CisC/KatX pri bolnicah s seroznim (n=23), mucinoznim (n=14) in endometrioidnim (n=6) tipom EOK; p=0,035.	52

Slika 22: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina H v vzorcih.....	55
Slika 23: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina S v vzorcih.....	56
Slika 24: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije celokupnega katepsina X v vzorcih.....	56
Slika 25: Prikaz median posameznih skupin ter območje vrednosti koncentracij katepsina H v vzorcih v v intervalu s 95% zaupanjem.	57
Slika 26: Kaplan-Meierjeva krivulja prikazuje povezavo med koncentracijami katepsina H in verjetnostjo preživetja bolnikov. Rdeča barva pomeni vrednosti katepsina H, ki so višje od mediane, modra pa vrednosti, ki so nižje od mediane.....	58
Slika 27: Prikaz median posameznih skupin ter območje vrednosti koncentracij katepsina S v vzorcih v v intervalu s 95% zaupanjem.	59
Slika 28: Kaplan-Meierjeva krivulja prikazuje povezavo med koncentracijami katepsina S in verjetnostjo preživetja bolnikov. Rdeča barva pomeni vrednosti katepsina S, ki so višje od mediane, modra pa vrednosti, ki so nižje od mediane.	59
Slika 29: Prikaz median posameznih skupin ter območje vrednosti koncentracij katepsina S v vzorcih v v intervalu s 95% zaupanjem.	60
Slika 30: Kaplan-Meierjeva krivulja prikazuje povezavo med koncentracijami katepsina X in verjetnostjo preživetja bolnikov. Rdeča barva pomeni vrednosti katepsina X, ki so višje od mediane, modra pa vrednosti, ki so nižje od mediane.....	60

III KAZALO PREGLEDNIC

Tabela I: katepsin B ter protitelesa proti katepsinu B.....	14
Tabela II: katepsin H ter protitelesa proti katepsinu H.....	14
Tabela III: katepsin L ter protitelesa proti katepsinu L.....	14
Tabela IV: katepsin S ter protitelesa proti katepsinu S.....	14
Tabela V: katepsin X, prokatepsin X in peptidi proregije prokatepsina X ter protitelesa, uporabljena proti katepsinu X, prokatepsinu X in peptidom proregije prokatepsina X.....	15
Tabela VI: cistatin C ter protitelesa proti cistatinu C.....	15
Tabela VII: ostala protitelesa, standardi in reagenti, ki smo jih uporabili.....	15
Tabela VIII: Reagenti in topila, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njihov proizvajalec.....	16
Tabela IX: Laboratorijska oprema in aparature, ki smo jo uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge ter njihov proizvajalec in tip.....	16
Tabela X: sestava separacijskega gela za SDS-PAGE.....	20
Tabela XI: sestava koncentracijskega gela za SDS-PAGE.....	20
Tabela XII: Podatki bolnic z ovarijskim rakom.....	23
Tabela XIII: Podatki vzorcev serumov bolnikov s kolorektalnim rakom in kontrolnih skupin.	23
Tabela XIV: Povezava med medianami (25.-75. percentil) koncentracij katepsinov H, B, L in X ter cistatina C (ng/mL) v cistični tekočini in klinično-patološkimi značilnostmi bolnic; statistična značilnost je za katepsine B, H in L definirana glede na test ANOVA in Studentov t-test, za katepsin X in cistatin C pa so bile vrednosti še dodatno normalizirane z Ln transformacijo.	50
Tabela XV: Povezave med medianami (25.-75. percentil) razmerij cistatina C (cisC) in katepsinov (kat) v tekočini cist ter klinično-patološkimi spremenljivkami.....	51
Tabela XVI: Univariantna analiza katepsinov B, H, L, X, cistatina C in drugih potencialnih pokazateljev preživetja do ponovnega pojava bolezni pri ovarijskem raku.....	52
Tabela XVII: Primerjava izmerjenih vrednosti katepsinov X, S in H med posameznimi skupinami vzorcev.....	57
Tabela XVIII: Mediane in intervali zaupanja za vrednosti katepsina H glede na skupino zdravih osebkov.....	57
Tabela XIX: Mediane in intervali zaupanja za vrednosti katepsina S glede na skupino zdravih osebkov.....	58
Tabela XX: Mediane in intervali zaupanja za vrednosti katepsina X glede na skupino zdravih osebkov.....	60

IV POVZETEK

Delovanje lizosomske cisteinske proteaze katepsina X je povezano predvsem z motnjami imunskega sistema in nevrodegenerativnimi boleznimi, njegova vloga pri nastanku in napredovanju raka pa še ni poznana. Udeležen naj bi bil predvsem v začetnih fazah malignih bolezni, njegovo povečano izražanje v tumorjih in izločanje pa je najverjetneje povezano z večjo invazivnostjo celic. Pomembna je lahko tudi njegova vloga v protitumorskem imunskem odzivu.

Pri malignih procesih naj bi imela prooblika katepsina X pomembnejšo vlogo od aktivne oblike encima. Z določanjem koncentracij prokatepsina X v zunajceličnih tekočinah smo želeli opredeliti njegov prognostični in diagnostični pomen pri ovarijskem in kolorektalnem raku.

Najprej smo pripravili monoklonska protitelesa za specifično prepoznavanje prokatepsina X. Za imunizacijo miši smo uporabili 15 AK dolge peptide, ki prekrivajo proregijo katepsina X. Po fuziji smo z indirektnim testom ELISA izbrali hibridome, ki so proizvajali specifična protitelesa proti posameznim peptidom in prokatepsinu X. Specifičnost monoklonskih protiteles smo preverili s SDS-PAGE in prenosom po Westernu. Žal so imela protitelesa prenizko afiniteto za merjenje prokatepsina X v bioloških vzorcih z direktnim testom ELISA.

V cistični tekočini ovarijskega raka smo z direktnim testom ELISA določali vrednosti aktivnega katepsina X in ostalih katepsinov ter cistatina C. Vrednosti razmerij CisC/KatX in CisC/KatH so bile značilno nižje pri manj agresivnih histoloških podtipih raka, aktivni katepsin X pa se ni izkazal kot prognostični kazalec.

V serumu bolnikov s kolorektalnim rakom in ustreznih kontrolnih skupinah pa smo določali celokupni katepsin X. Značilnih razlik v koncentraciji med posameznimi skupinami nismo zaznali, izkazalo pa se je, da so višje vrednosti celokupnega serumskega katepsina X v skupini bolnikov s kolorektalnim rakom značilno povezane s krajšim celokupnim preživetjem, kar kaže na prognostično vrednost celokupne in verjetno prooblike katepsina X.

V ABSTRACT

Lysosomal cysteine protease cathepsin X is mainly linked to disorders of immune system and neurodegenerative diseases, while its role in the development and progression of cancer is yet unknown. It is supposed to be involved in early stages of cancer and its increased expression in tumors and secretion are probably related to the invasiveness of tumour cells. Most likely it is important also in anti-tumor immune response.

The proform of cathepsin X rather than active enzyme should be important in malignant process. By determining the concentration of procathepsin X in extracellular fluids, we wanted to define its prognostic and diagnostic importance in ovarian and colorectal cancers.

First, we prepared monoclonal antibodies for specific recognition of procathepsin X. For the immunisation of mice we used 15 AA long peptides that overlap the proregion of cathepsin X. After fusion we used indirect ELISA to select the hybridoma that produced specific antibodies against each peptide and procathepsin X. The specificity of monoclonal antibodies was checked by SDS-PAGE and Western blot. Unfortunately, their affinity against procathepsin X was too low for measuring the values in biological samples by direct ELISA.

In the cystic fluid of ovarian cancer we determined the values of active cathepsin X, other cathepsins and cystatin C using direct ELISA. Ratios CysC/CatX and CysC/CatH were significantly lower in less aggressive histological subtypes of cancer, while active cathepsin X was not shown to be a prognostic indicator.

In sera of patients with colorectal cancer and corresponding control groups we measured total cathepsin X. No significant differences in concentration between different groups have been noted, but it was shown that higher levels of total sera cathepsin X in the group of patients with colorectal cancer were significantly associated with shorter overall survival, suggesting a prognostic value of total cathepsin X and most likely procathepsin X.

VI OKRAJŠAVE

AA	amino acid
AFP	alfa fetoprotein
BSA	»ang. Bovine Serum Albumin«, goveji serumski albumin
CA19-9	tumor spremljajoči antigen karcinomski antigen 19-9
CA125	tumor spremljajoči antigen karcinomski antigen 125
CEA	karcinoembrionalni antigen
Da	dalton
dH ₂ O	deionizirana voda
DMEM	Po Dulbeccu spremenjeno Eaglovo gojišče
DMSO	dimetilsulfoksid
DTT	ditiotritol
ECM	zunajcelični matriks
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
ELISA	encimskoimunski test na trdni podlagi
EOK	epitelijski ovarijski karcinom
FCS	fetalni telečji serum
hCG	humani horiontski gonadotropin
HRP	hrenova peroksidaza
HT	hipoksantin in timidin
L	liter
mg	miligram
mL	mililiter
MW	molekulska masa
NaN ₃	natrijev azid
ng	nanogram
obr/min	obrat na minuto
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza

PBS	fosfatni pufer
PVDF	polivinilidendifluorid
SDS	natrijev dodecilsulfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TPA	citokeratin tkivni polipeptidni antigen
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
μg	mikrogram
μL	mikroliter

VII OZNAKE AMINOKISLIN

Ala	A	alanin
Arg	R	arginin
Asn	N	aspargin
Asp	D	aspartat, asparginska kislina
Cys	C	cistein
Gln	Q	glutamin
Glu	E	glutamat, glutaminska kislina
Gly	G	glicin
His	H	histidin
Ile	I	izolevcin
Leu	L	levcin
Lys	K	lizin
Met	M	metionin
Phe	F	fenilalanin
Pro	P	prolin
Ser	S	serin
Thr	T	treonin
Trp	W	triptofan
Tyr	Y	tirozin
Val	V	valin

1 UVOD

1.1 PROTEAZE

Proteaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v polipeptidni verigi in tako omogočijo razgradnjo beljakovin v manjše peptide oz. popolno razgradnjo do aminokislinskih preostankov. Spadajo v razred hidrolaz, ki za nukleofilni napad na karbonylni skupino v amidni vezi, uporabijo molekulo vode (1). Glede na mesto hidrolize peptidne vezi jih delimo na ekso- in endopeptidaze. Eksopeptidaze lahko cepijo eno (mono-peptidaze) ali več (di-peptidaze, tri-peptidaze, itd.) aminokislin na N-koncu (amino-peptidaze) ali C-koncu (karboksipeptidaze) polipeptidne verige. Endopeptidaze cepijo peptidno vez znotraj polipeptidne verige in jih glede na katalitsko skupino v aktivnem mestu delimo v razrede aspartatnih, cisteinskih, serinskih, treoninskih, metaloproteaz in proteaz z neznanim katalitskim mehanizmom. Sodobni sistem delitve razvršča proteaze glede na evolucijsko podobnost in mehanizem delovanja v družine in klane. Družine združujejo proteaze, ki se bistveno ujemajo v celotnem ali delnem aminokislinskem zaporedju, odgovornem za katalitsko aktivnost. V klanih pa so združene družine proteaz, ki imajo skupnega prednika, vendar se zaradi evolucijskih sprememb ne ujemajo več v aminokislinskem zaporedju; podobne so si v terciarni strukturi ali v položaju aminokislinskih preostankov polipeptidne verige, pomembnih za katalitično aktivnost in skupnem zaporedju v bližini teh (1,2). Glede na mesto nahajanja jih delimo na lizosomske in nelizosomske (nahajajo se v citoplazmi, na membrani ali v zunajcelični tekočini).

Fiziološka vloga proteaz je znotrajcelična in zunajcelična razgradnja proteinov, aktivacija pro-encimov in pro-hormonov, remodelacija kostnega tkiva ter razgradnja in remodelacija zunajceličnega matriksa (ECM). Sodelujejo tudi pri regulaciji imunskega sistema, procesih programirane celične smrti ali apoptoze, nastajanju novih žil, procesu razvoja zarodka, pri ovulaciji, kaskadi strjevanja krvi ter v procesih rasti in staranja (1,3). Njihova vloga je lahko regulatorna ali razgrajevalna. Regulatorne proteaze so odgovorne za procesiranje encimov, receptorjev, rastnih dejavnikov in drugih proteinov ter s tem njihovo aktivacijo ali inaktivacijo, razgrajevalne proteaze pa tarčni protein popolnoma razkrojijo. Zaradi izrazitega vpliva na procese v organizmu je proteoliza strogo nadzorovan proces. Za pravilno delovanje organizma je nujno, da proteaze uravnoteženo sodelujejo med seboj in so hkrati v ravnovesju z njihovimi inhibitorji. Porušeno ravnovesje in s tem prevladovanje

učinkov enih ali drugih, so dokazali pri številnih patoloških stanjih, kar uvršča proteaze med možne tarče za terapijo, pa tudi kot diagnostične in prognozične kazalce pri različnih boleznih, zlasti pri raku, kjer so odkrili že številne povezave med izražanjem, proteinsko koncentracijo in aktivnostjo proteaz ter samim potekom bolezni (1,4).

Proteaze so udeležene tako v zgodnjih, kot tudi poznih fazah raka; to je rasti tumorjev, angiogenezi, metastaziranju in invaziji, istočasno pa tudi v procesih, ki povzročijo remisijo maligne bolezni, kot je protitumorski imunski odziv in apoptoza. Za napredovanje raka je odgovorno povečano izražanje in aktivnost proteaz, pa tudi zmanjšano izražanje njihovih endogenih inhibitorjev. V malignih procesih so udeleženi predvsem razredi serinskih (urokinazni in tkivni aktivator plazminogena, plazmin) in metaloproteaz (gelatinaze, kolagenaze in stromelizin), pa tudi aspartatnih (npr. katepsin D) in cisteinskih proteaz; slednje naj bi imele vlogo iniciatorjev kompleksnih proteolitičnih kaskad (5,6,7).

Modulacija proteolitične aktivnosti predstavlja dobro izhodišče zdravljenja tako rakavih obolenj, kot drugih patoloških stanj, povezanih z neravnovesjem proteaz. V različnih fazah kliničnih testiranj je veliko inhibitorjev proteaz, do sedaj pa je registriran le inhibitor proteasoma bortezomib, katerega uporabljajo v terapiji diseminiranega plazmocitoma (1,8,9,10). Razvijanje novih je precej problematično, saj so proteaze in njihovi inhibitorji med sabo prepleteni v kompleksnih proteolitičnih kaskadah (11,12). Ugotovili so tudi, da inhibicija nekaterih proteaz progresijo raka celo poveča, kar nakazuje, da imajo v organizmu tudi protektivno vlogo (13,14).

1.2 CISTEINSKI KATEPSINI

Cisteinske proteaze so razdeljene v klane (CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO ter nerazvrščene proteaze), ti pa v družine (2). Največja med cisteinskimi proteazami je papainska družina C1 (klan CA), ki jo sestavljajo papain in njemu podobne cisteinske proteaze, katere se najpogosteje nahajajo v lizosomih in jih imenujemo lizosomske cisteinske proteaze ali cisteinski katepsini. Poznamo še serinske (A in G) ter aspartatne katepsine (D in E).

Poznanih je 11 človeških cisteinskih katepsinov (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X, W), ki so si podobni v terciarni strukturi, razlikujejo pa se v substratni specifičnosti, inhibitorski aktivnosti in specifičnosti regulacije. Katepsini B, H, L in C so izraženi v različnih tipih celic in tkiv, medtem ko se ostali izražajo le v specifičnih celicah. Večinoma so

endopeptidaze, izjema so katepsini B in X (karboksipeptidazi) ter C in H (aminopeptidazi), katepsina B in H pa imata hkrati lahko izraženo tudi endopeptidazno aktivnost (6,15).

Katepsini se sintetizirajo kot 30 do 50 kDa veliki preprokatepsini (preregija je signalni peptid, vezan na N-koncu) v endoplazmatskem retikulumu. Po procesiranju se nanje z glikozilacijo vežejo molekule manoze in ti kot prokatepsini potujejo v Golgijev aparat, kjer se manozni preostanki s fosforilacijo modificirajo v manozna-6-fosfat. Preko teh se prokatepsini vežejo na manozna-6-fosfatne receptorje, kateri jih sortirajo v transportne vezikle in usmerijo v endosome. Med zorenjem endosomov v primarne in sekundarne lizosome se s cepitvami tvorijo aktivni katepsini; aktivacija poteka avtokatalitično ali s pomočjo drugih endopeptidaz, ki se nahajajo v poznih lizosomih. V nekaterih celicah (npr. keratinocitih) se aktivni katepsini s transportnimi vezikli usmerijo iz lizosomov proti membrani ter se s fuzijo izločijo v zunajcelični prostor, kjer najverjetneje prispevajo k aktivaciji drugih propeptaz in fiziološkemu preoblikovanju ECM. V makrofagih in fibroblastih pa lahko pride do direktnega izločanja prokatepsinov iz celice, najverjetneje zaradi odsotnosti manozna-6-fosfatnih receptorjev ali pomanjkanja fosforilacije. Del teh ostane v ECM, del pa se reinternalizira in po poti endocitoze prenese v lizosome. Nekatere celice v živčnem sistemu lahko sintetizirane prokatepsine kopičijo, koncentrirajo in aktivirajo v posebnih sekretornih granulah, preko katerih se aktivirani in neaktivirani katepsini izločijo iz celice. Alternativne translacije lahko privedejo do nastanka prokatepsinov brez signalnega peptida, kateri se nahajajo izven lizosomov – v citoplazmi, jedru ali mitohondrijih (15,16).

Aktivni cisteinski katepsini imajo molekulsko maso med 20 in 30 kDa in monomerno kvartarno strukturo; izjema je katepsin C, ki je tetramer, z molekulsko maso 200 kDa. Encim je sestavljen iz dveh domen, med katerima se nahaja aktivno mesto. Leva domena, na N-terminalnem koncu, je sestavljena pretežno iz α -vijačnic, v desni domeni, na C-terminalnem koncu pa prevladujejo β -strukture v obliki sodčka. Substrat se v aktivno mesto veže v iztegnjeni konformaciji med obema domenama. Pri eksopeptidazah je dostop do aktivnega mesta otežen zaradi dodatnih struktur, kot so zanke (pri katepsinih B in X) ter propeptid (katepsina H in C). Neaktivni prokatepsini imajo na N-terminalnem koncu vezano proregijo, ki ima vlogo avtoinhibitorja in preprečuje dostop substrata do aktivnega mesta. Pri endopeptidazah se propeptid odstrani avtokatalitično, eksopeptidaze pa za aktivacijo potrebujejo endopeptidaze (16,17).

Aktivno mesto predstavljata aminokislini Cys25 na levi domeni in His159 na desni domeni, t.i. katalitična diada, ki tvorita tiolatno-imidazolijev ionski par, katerega aktivnost je odvisna od ionske moči in pH. Pomembno vlogo imata tudi Gln (pred Cys) in Asn (za His); Gln naj bi sodeloval pri nastanku oksanionske luknje, katera stabilizira nastali tiolestrski tetraedrični intermediat, Asn pa naj bi pomagal pri pravilni orientaciji imidazolnega obroča His (2,18).

Optimalna aktivnost cisteinskih katepsinov je v reducirajočih pogojih in pri rahlo kislem pH (med 5,0 in 6,5), to območje pa se med posameznimi katepsini lahko razlikuje (15). Njihova aktivnost je nadzorovana z regulacijo sitneze na nivoju transkripcije, regulacijo procesiranja do aktivne oblike, s pH-jem, oksidirajočimi pogoji in s prisotnostjo encimov, ki jih aktivirajo ali inaktivirajo. Najpomembnejšo vlogo uravnavanja delovanja cisteinskih katepsinov imajo njihovi endogeni inhibitorji, kot so cistatini (19,20).

Nepravilno delovanje in spremembe v lokalizaciji cisteinskih katepsinov so povezane s mnogimi boleznimi, kot so rak, astma, ateroskleroza, nevrodegenerativne bolezni, periodontitis, revmatoidni artritis, vnetne črevesne bolezni, osteoartritis, multipla skleroza, diabetes, luskavica (21,22), kardiomiopatije, proteinurija in pankreatitis (16).

1.3 VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI NASTANKU IN NAPREDOVANJU MALIGNIH BOLENIJ

Cisteinski katepsini so udeleženi pri transformaciji normalnih celic v rakave, proliferaciji, diferenciaciji, invaziji, adheziji, motiliteti ter pri angiogenezi in metastaziranju tumorja. Njihovo izražanje, koncentracija in proteolitična aktivnost se pri raku povečajo in njihovi učinki prevladajo nad endogenimi inhibitorji, pride pa tudi do prerazporeditve iz lizosomov na površino celice ali v zunajcelični prostor, kjer neposredno razgrajujejo bazalno membrano in proteine ECM ali posredno, preko aktivacije drugih proteaz. (20,23). Za povečano izražanje in aktivnost so najverjetneje odgovorne spremembe v ekspresiji genov, spremembe v regulaciji transkripcije, spremenjene posttranslacijske modifikacije, kot sta glikozilacija in manozna-6-fosforilacija, preko katerih se poveča izločanje katepsinov iz celice (15), pa tudi spremenjene interakcije med celicami in ECM, ki ne regulirajo več njihove aktivnosti in lokalizacije.

Pri raku se poveča izvencelično izločanje tako prekurzorjev (prokatepsinov B, L in X) kot aktivnih encimov (katepsini B, H, L, S in X), kar nakazuje, da se z lokalizacijo najverjetneje spremeni tudi funkcija encima; zaradi povečane aktivnosti rakavih celic in

hipoksije pa je mikrookolje tumorja bolj kislo, kar omogoča aktivnost katepsinov tudi izven lizosomov (23). Tumorske celice razgrajujejo ECM tako zunajcelično, kot tudi v lizosomih, preko poti endocitoze (24). Katepsinov ne izločajo le rakave celice, ampak tudi celice strome, ki se nahajajo v okolici tumorja, kot so endotelijske celice, fibroblasti, osteoklasti, pa tudi nevtrofilci, makrofagi in limfociti, ki pod njegovim vplivom dodatno preoblikujejo zunajcelični matriks (25).

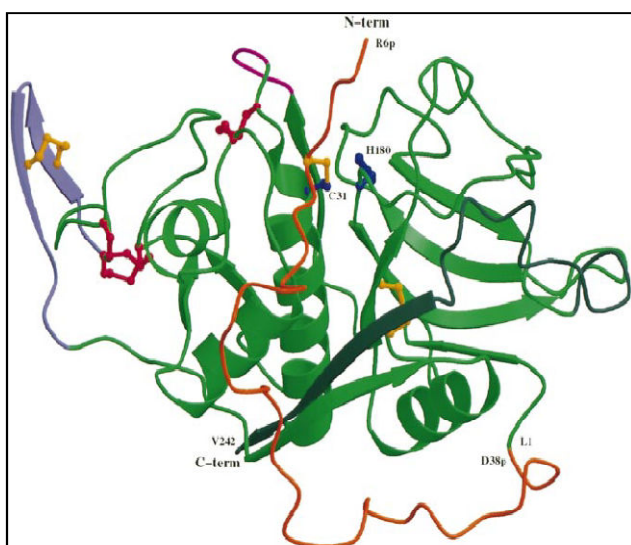
Katepsini B, L in S so udeleženi predvsem pri razgradnji ECM, katepsina X in S pri večji motiliteti in manjši adheziji celic, vsem omenjenim katepsinom pa so dodelili pomembno vlogo pri procesu ožiljanja tumorja (24). Povišano izražanje in proteolitična aktivnost katepsinov sta povezana s slabo prognozo. Pri poskusih na živalih so ugotovili, da njihova odstranitev zmanjša napredovanje, ožiljanje in rast tumorja ter poveča stopnjo apoptoze rakavih celic (23,26), najverjetneje pa so udeleženi še pri številnih drugih kompleksnih in med seboj prepletenih malignih procesih; katepsinu L so na primer pripisali celo protektivno vlogo (25). Cisteinski katepsini (predvsem B, H, L, S in X) in njihovi endogeni inhibitorji cistatini, predvsem pa cistatini C, F in M (27), so namreč udeleženi tudi pri protitumorskem imunskem odzivu in apoptozi, kjer uravnavajo naravno in pridobljeno imunost. S poskusi na živalih in kliničnimi študijami so pokazali, da nekateri katepsini zavirajo napredovanje raka. Celice imunskega odziva lahko zaradi sproščanja proteaz, preoblikovanja ECM ter indukcije proliferacije, invazijo tudi pospešijo (20, 21). Zaradi tega je opredelitev vseh funkcij katepsinov v organizmu nujna; tako za prognozo in diagnozo, kot tudi za terapijo na osnovi proteaznih inhibitorjev.

1.4 KATEPSIN X

Katepsin X (28) je šele pred kratkim odkrita lizosomska cisteinska proteaza, katere vloga v fizioloških in patoloških procesih še ni povsem razjasnjena. V literaturi se pojavlja tudi pod drugimi imeni, kot so na primer katepsin P (29), Y (30), Z (31) in B2 (32). Gen, ki kodira za 303 AK dolg preproencim se nahaja na 20. kromosomu v regiji q13. Po procesiranju z N-terminalnega konca se odcepi signalno zaporedje, sestavljeno iz 23 AK, nato proregija iz 38 AK, ostane pa aktivni katepsin X iz 242 AK. Glede na AK zaporedje in strukturo spada med papainu podobne cisteinske proteaze, razlikuje pa se v nekaj strukturnih posebnostih, kot sta dva peptidna vstavka ter zelo kratka proregija (najkrajša v družini papainu podobnih proteaz).

Aktivno mesto katepsina sestavljajo AK Cys31, His180 in Asn200. His23 predstavlja sidrišče za negativno nabiti C-terminalni del substrata. Prvi peptidni vstavek, dolg tri AK (Ile24-Gln26), je del t.i. »mini zanke« (His23-Tyr27), ki se nahaja med Gln22 in Cys31 v oksanionski luknji v aktivnem mestu in je odgovorna za striktno eksopeptidazno specifičnost. Slednje je najverjetneje tudi vzrok slabše inhibicije katepsina X s cistatinom C. Drugi peptidni vstavek je petnajst AK (Cys109-Asn123) dolga β -lasnica, ki se nahaja na N-terminalni domeni, katere vloga še ni znana (33). Katepsin X deluje predvsem kot karboksi-monopeptidaza (34).

Zelo kratka proregija (38 AK), ki, za razliko od proregij ostalih cisteinskih katepsinov, nima sekundarne strukture, vsebuje cisteinski ostanek (Cys10p), kateremu pripisujejo posebno vlogo v regulaciji in/ali katalitični aktivnosti samega katepsina X. Pri ostalih cisteinskih katepsinih je proregija stabilizirana z zanko Glu159-Thr175 in ima pomembno vlogo pri pravilnem zvitju encima. Kratka proregija katepsina X te zanke ne doseže, tvori pa kovalentno vez med cisteinskim ostankom na proregiji in Cys31 v aktivnem mestu encima, kar stabilizira tako proregijo, kot konformacijo na N-koncu katepsina X; na orientacijo Cys31 pa ne vpliva. To je prvi odkrit primer proencima, kjer je inhibicija proteolitične aktivnosti s proregijo dosežena z reverzibilno kovalentno modifikacijo nukleofila v aktivnem mestu. Za razliko od ostalih katepsinov, ki se avtoaktivirajo, so za *in vitro* aktivacijo prokatepsina X potrebni rahlo reducirajoči pogoji, ki prekinejo disulfidno vez ter dodatek katepsina L, za kar naj bi bila kriva kratka in v AK zaporedju posebna proregija. *In vivo* poteka aktivacija najverjetneje na podoben način (33).



Slika 1: Shematski prikaz terciarne strukture prokatepsina X.

Proregija je obarvana oranžno, aktivni encim je obarvan zeleno, zaporedje 25 AK na C-koncu je obarvano temno zeleno in »mini zanka« je obarvana v barvo fuksije. Veliko vstavljeno zaporedje je obarvano vijolično, disulfidne vezi, skupne tudi drugim katepsinom so rdeče obarvane, tiste, ki so značilne le za katepsin X pa rumene barve. Cys31 in His180 v aktivnem mestu sta označena temno modro (33).

1.4.1 Izražanje ter fiziološka in patološka vloga katepsina X

Sprva so mislili, da je katepsin X, podobno kot katepsina B in L, konstitutivno prisoten v vseh tkivih, danes pa je znano, da je izražanje katepsina X omejeno predvsem na celice imunskega sistema, kot so monociti, makrofagi, dendritične celice (34,35) ter bronhialne epiteljske celice (36). V celicah se nahaja v endoplazmatskem retikulumu, Golgijevem aparatu in lizosomih, koncentriranih ob jedru, po aktivaciji imunske celice pa pride do premestitve na površino in izločanja v zunajcelični prostor ter ponovne reinternalizacije s pomočjo proteoglikanov, kot je heparan sulfat. Slednji naj bi imeli tudi vlogo aktivacije katepsina X, kateri se iz celice izloča v aktivni ali proobliki. Mehanizem translokacije na membrano in izločanje v zunajcelični prostor še ni povsem razjasnjen, je pa, vsaj v začetnih stopnjah, najverjetneje vezikularen (37).

Prisotnost RGD (Arg-Gly-Asp) sekvence v proregiji prokatepsina X in ECD (Glu-Cys-Asp) sekvence v aktivnem katepsinu X, ki služita kot vezavni mesti za integrine (prokatepsin X se veže na β -3 podenoto integrinov, katepsin X pa na β -2 podenoto) ter vezava na prej omenjene proteoglikane nam nakazuje, da je preko regulacije integrinov vpleten pri uravnavanju imunskega odziva, to je signaliziranju, rasti, adheziji, migraciji imunskih celic ter fagocitozi. Z aktivacijo β -2 integrinskih receptorjev Mac-1 stimulira zorenje, adhezijo in migracijo dendritičnih celic skozi ECM, kar je nujno za pridobljeno imunost in proliferacijo T limfocitov. Z aktivacijo LFA-1 integrinskega receptorja stimulira migracijo in invazijo limfocitov T skozi ECM ter medcelično komunikacijo z nanocevkami (36,37,38,39,40). Posebej visoko kolokalizacijo med aktivnim katepsinom X in β -2 podenoto integrinov so opazili pri interakcijah med monociti/makrofagi z endotelijskimi in rakavimi celicami. Imunske celice, predvsem pa makrofagi in limfociti T, pri migraciji skozi zunajcelični matriks razgrajujejo proteine ECM, kar povezujemo z lastnostjo tumorskih celic, ki invadirajo okolico in razgrajujejo pot do žil. Danes znani fiziološki substrati katepsina X so, poleg β -2 integrina (37), alfa- in gama-enolaza, ki sta udeleženi pri nevitogenezi (41), kemokin (42) ter huntingtin, ki je pomemben pri Huntingtonovi bolezni (43). Ugotovili so, da se razgrajevanje β -2 integrina ustavi, ko je prolin na predzadnjem mestu (na P2 mestu) (37).

Fiziološka vloga katepsina X je najverjetneje regulacija imunskega odziva in uravnavanje kostne remodelacije (42), udeležen pa je tudi pri številnih patoloških procesih, posebej vnetnih. Povečano izražanje prokatepsina X in katepsina X je značilno za tumorske in

imunске celice raka prostate (44) in želodca ter v makrofagih želodčne sluznice, posebej pri infekcijah z bakterijo *Helicobacter pylori* (45), za agresivne tipe malignega melanoma in adenokarcinoma (46), za celice živčnega sistema pri staranju in nevrogenativnih boleznih, kot je Alzheimerjeva bolezen (41) in tuberkulozo (47).

Povečano izražanje katepsina X v tumorjih so povezali z večjo invazivnostjo tumorskih celic (24). Z imunohistokemijsko analizo rakavega pljučnega tkiva so dokazali, da se katepsin X izraža pretežno v netumorskih celicah (48). Nepravilno uravnavanje imunskega odziva s strani katepsina X vodi v njegovo nezadostno ali prekomerno aktivnost, kar oboje spodbuja maligne procese; prekomerno aktivne imunske celice namreč sproščajo številne dejavnike, ki imajo zelo močan tumor-promotorski učinek (20). Pri poskusih na transgenih miškah, ki izražajo raka dojke, so z utišanjem gena za katepsin X opazili kasnejši pojav tumorja, kot pri miškah, ki so izražale katepsin X; slednje je najverjetneje posledica vezave katepsina X na integrine, kar povzroči nastanek prvih tumorskih mas. Zato katepsin X povezujejo predvsem z začetnimi fazami malignega procesa, manj pa z napredovanjem in metastaziranjem (26).

1.5 TUMORSKI KAZALCI

Tumorski kazalci so lahko encimi, hormoni ali druge molekule, ki jih proizvajajo maligne ali druge celice. Z njimi lahko postavimo diagnozo, napovemo čas do ponovitve bolezni in preživetje, spremljamo odziv na terapijo in njeno uspešnost ter potek obolenja.

Spremljanje vrednosti tumorskih kazalcev v tkivih ni vedno možno; za rutinska testiranja so telesne tekočine veliko primernejše, saj je odvzem prijaznejši in varnejši za bolnika ter omogoča spremljanje bolezni skozi daljše obdobje, tudi če je bil tumor že odstranjen. Poleg tega določanje tumorskih kazalcev v telesnih tekočinah omogoča zgodnjo detekcijo bolezni, tudi ko tumorsko tkivo še ni definirano. Slabost merjenja koncentracij v zunajceličnih tekočinah pa so veliko nižje koncentracije tumorskih kazalcev v primerjavi s tkivi, kar zahteva zelo občutljive in natančne analizne metode.

Katepsini se nahajajo v tumorskih in netumorskih tkivih, prisotni pa so tudi v zunajceličnih tekočinah. Med patološkimi stanji se njihovo izražanje, aktivnost in izločanje povečajo, kar poveča njihovo klinično uporabnost. Relativni koncentracijski profili katepsinov, določeni v serumih in tumorskih tkivih so si večinoma podobni, čeprav zunajcelične koncentracije lahko odražajo sistemski odziv organizma in ne le lokalnih sprememb v tumorskem tkivu. Pri tumorskih kazalcih določamo lahko mRNA nivoje, mutacije, kromosomske

spremembe, proteinske koncentracije z raznimi imunskimi testi, kot je na primer test ELISA ter njihovo encimsko aktivnost (s kromogenimi in fluorogenimi substrati) (1,6).

Za določanje prognoze se uporabljajo tudi klinični kazalci, kot so TNM stopnja, velikost tumorja, vključenost tumorskih celic v bezgavke, morfologija tumorskih celic, celična diferenciacija in razširjenost v druge organe, ki jih določajo s citološkimi in histološkimi analizami in ki pomagajo razločevati med bolniki z veliko in manjšo verjetnostjo ponovitve bolezni. Vendar tudi pri bolnikih z manjšo rizičnostjo lahko pride do progresije, zaradi tega potrebujemo nove tumorske kazalce, povezane predvsem z agresivnostjo in metastatskim potencialom primarnih tumorjev. Kot taki so se izkazali cisteinski katepsini.

1.5.1 Cisteinski katepsini in cistatin C kot diagnostični in prognostični pokazatelji pri raku

Povišane koncentracije in encimske aktivnosti katepsinov ter njihova povezanost s napredovanjem raka, omogočajo uporabo teh encimov v klinični praksi. Z njihovo uporabo lahko povečamo učinkovitost terapije pri bolj rizičnih pacientih, po drugi strani pa se lahko izognemo tretiranju manj rizičnih bolnikov.

V številnih kliničnih študijah so določali koncentracije katepsinov v tkivnih citosolih, histoloških preparatih ali telesnih tekočinah bolnikov z različnimi vrstami raka. Visoke koncentracije katepsinov B, L in S v rakavih tkivih ali serumu so povezane s z večjo rizičnostjo za ponovitev bolezni in krajšim celokupnim preživetjem pri melanomu, glioblastomu, pljučnem, ovarijskem in možganskem raku ter raku glave in dojke; višje serumske koncentracije katepsina L pa korelirajo s krajšim preživetjem pri raku dojke, kolorektalnem raku ter raku glave in vratu. Katepsin H je bil v serumu povišan pri bolnikih s pljučnim rakom, ki so bili kadilci in so imeli veliko krajši čas preživetja, pa tudi pri vnetnem raku dojke in metastatskem melanomu. Visoke serumske vrednosti katepsina H pri bolnikih s kolorektalnim rakom pa so pomenile dobro prognozo. Povišane vrednosti katepsina S so opazili v tkivu raka prostate, v serumu in tkivu pljučnega raka, ter pri ledvičnem raku (1,23,49,50,51). Izmerili so tudi vrednosti inhibitorja cistatina C; višje vrednosti v tkivih so pokazatelji dobre prognoze, bolniki z višjimi koncentracijami v telesnih tekočinah pa so imeli slabšo prognozo, saj ti najverjetneje inhibirajo proteaze, udeležene v protitumorskem imunskem odzivu (27); predlagali pa so tudi, da spremembe v izločanju povzročijo večje ekstracelularno in majše intracelularno nahajanje cistatina C. Slednje so opazili pri bolnikih z melanomom, limfomom celic B, kolorektalnim rakom in pljučnim rakom (52). Katepsini in cistatin C bi lahko bili, poleg že uveljavljenih tumorskih

kazalcev, uporabni prognostični pokazatelji, s katerimi bi lahko prilagajali terapijo glede na rizičnost (52).

Diagnostična uporabnost cisteinskih katepsinov je bolj omejena; katepsin B je uporaben pri diagnozi možganskih tumorjev, raku črevesja in ovarijskega raka, katepsin L pa pri diagnozi ovarijskega raka v kombinaciji z že uveljavljenimi tumorskimi kazalci (1).

1.5.2 Katepsin X kot diagnostični in prognostični pokazatelj in njegova detekcija

Zelo malo je kliničnih študij, pri katerih so merili zunajcelične koncentracije katepsina X pri rakavih in drugih bolnikih ter jih primerjali s klinično-patološkimi podatki. Pri zdravih osebkih so bile vrednosti katepsina X v serumu, določane s testom ELISA, pod mejo detekcije (52), Nägler s sod. pa je izmerila plazemsko vrednost celokupnega katepsina X med 31 in 165 ng/mL, v serumu pa še 25% višje vrednosti (54).

Glede na njegovo vlogo v imunskih celicah ima katepsin X lahko velik potencial pri diagnozi in prognozi ter spremljanju uspešnosti terapije (podobno kot se danes uporablja CRP) pri boleznih, povezanih z vnetnimi procesi, pri katerih se v serum najverjetneje sprošča iz imunskih celic med aktivacijo. Povišane serumske koncentracije celokupnega katepsina X so izmerili tudi pri bolnikih, ki so utrpeli hude poškodbe; vrednosti so bile posebej višje pri bolnikih, ki so po travmi umrli (54). Pri vnetnem tipu raka dojke pa so bile serumske vrednosti aktivnega katepsina X nižje kot pri zdravih osebkih, pri pljučnem raku pa razlike med bolniki in zdravimi osebki niso opazili. Razlike med rezultati so lahko posledica različne vloge v bolezenskih procesih, različnih vrst testov in oblike katepsina X, ki jo ti testi določajo (48,52).

1.6 OVARIJSKI RAK

Epitelijski ovarijski karcinom se pojavlja predvsem pri mladih ženskah. Zaradi možnosti zelo uspešnega zdravljenja ob konzervativni kirurgiji je nujna pravilna in hitra diagnostika ter zdravljenje. Najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na prognozo bolezni in zdravljenje, so histopatološka vrsta tumorja, biološka agresivnost in tumorska masa oziroma razširjenost bolezni; dejavniki, ki vplivajo na preživetje, pa so stadij bolezni, ostanek tumorja po operaciji in starost bolnice. Za določitev stadija raka jajčnikov se uporablja Klasifikacija združenja za ginekološko onkologijo (FIGO), pri kateri je stadij I bolezen v najbolj zgodnji obliki, stadij IV pa v najbolj razširjeni. Najpomembnejše metode za

presejanje, sta določevanje serumskega označevalca CA125 in transvaginalni ultrazvok, ki pa ne posamično niti v kombinaciji, ne dosejata potrebne občutljivosti in specifičnosti. Trenutno še ni uspešnejše metode za zgodnje odkrivanje raka jajčnikov, sta pa metodi v uporabi pri spremljanju ponovitve bolezni ter uspešnosti zdravljenja (55). Klinično pomembni tumorski kazalci pri ovarijskem raku so še TPA, CEA, AFP in hCG, ki pa prav tako ne dosegajo visoke specifičnosti in občutljivosti.

1.6.1 Katepsini in cistatin C pri ovarijskem raku

Pri ovarijskem raku se pojavijo ciste, v katerih se nahaja tekočina, ki je v tesnem stiku z rakavim tkivom in lahko odraža dogajanje v tumorskih celicah. Z meritvami cisteinskih katepsinov in cistatina C v cistični tekočini so ugotovili, da se izmerjene koncentracije med različnimi histološkimi podtipi precej razlikujejo in da sta koncentraciji katepsina B in cistatina C v cistični tekočini serozne oblike raka jajčnikov značilno višji kot pri benigni serozni obliki, kar je povezano s slabšo prognozo. Njuni koncentraciji sta med sabo značilno povezani. Koncentracije katepsina L pa so bile višje pri mucinski obliki raka kot pri benigni obliki. Vrednosti cisteinskih katepsinov v cistični tekočini v povezavi s kliničnimi in patološkimi podatki lahko napovejo agresivnost raka jajčnikov (56).

Bolj raziskane so njihove serumske vrednosti. Pri tem se je katepsin B izkazal kot zanesljiv samostojen tumorski kazalec celokupnega preživetja in preživetja brez bolezni. V kombinaciji z že uveljavljenim kazalcem CA125 se njegova uporabnost še poveča. Za diagnostične namene se je serumski katepsin B izkazal kot bolj občutljiv napovedni dejavnik kot CA125 (51,56,57); katepsin L so predlagali kot uporaben diagnostični kazalec ovarijskega raka v kombinaciji z že uveljavljenimi tumorskimi kazalci (1). Glede na literaturo, vrednosti katepsina X v cistični tekočini še niso izmerili.

1.7 KOLOREKTALNI RAK

Kolorektalni rak je druga najbolj razširjena maligna bolezen v razvitih državah, za katero pogosteje zbolevalo moški po 50. letu. Pojavnost (incidenca) v zadnjih letih počasi narašča, umrljivost pa ostaja enaka, oziroma rahlo pada, predvsem zaradi zgodnjega odkrivanja in novih metod zdravljenja. Uveljavljene metode presejanja v Evropi so odkrivanje okultne krvi v blatu, endoskopske preiskave in radiološki pregledi (58). Agresivnost kolorektalnega raka je odvisna predvsem od stopnje invazivnosti ter

metastaziranja. Najpomembnejši prognozični kazalec pri kolorektalnem raku je TNM klasifikacija, ki razvršča bolnike v stadije glede na primarni tumor, vključenost bezgavk in prisotnost metastaz. Klinično pomembni tumorski kazalci pri kolorektalnem raku so CEA, TPA in CA19-9.

1.7.1 Cisteinski katepsini pri kolorektalnem raku

V normalni črevesni sluznici so detektirali katepsine B, L, H, F in X. Pri kolorektalnem raku so opazili večje izražanje, aktivnost in spremenjeno lokalizacijo predvsem katepsinov B in L, na katerih je bilo opravljenih tudi največ raziskav. V adenomih sluznice kolona in rektuma niso opazili povišanja katepsinov, se je pa izražanje katepsina B značilno povišalo pri pretvorbi v invazivni adenokarcinom, kar bi lahko predstavljalo dober kazalec za spremljanje napredovanja predrakavih sprememb v rakave. Serumske vrednosti katepsina B pa so se izkazale kot uporaben diagnostični tumorski kazalec (1,59).

Povečano izražanje katepsinov B ali L v tumorskih tkivih ni bilo povezano s histološkim podtipom, niti s stopnjo diferenciacije. Glede na TNM stopnjo pa je vsak katepsin kazal specifičen profil izražanja. Aktivnosti katepsinov B in L, na primer, so se z višanjem TNM stopnje nižali, v IV. stopnji pa so padli celo pod mejo normale, kar povezujejo z vpletenostjo teh katepsinov predvsem v začetni lokalni invaziji. S testom ELISA so v tkivnih homogenatih pri metastazirajočem raku izmerili višje koncentracije katepsinov B in L kot pri nemetastazirajočem; višje vrednosti tkivnega katepsina L so bile povezane tudi s krajšim preživetjem. V serumu so višje vrednosti katepsina L izmerili pri bolnikih v terminalnih stopnjah. Visoke vrednosti katepsina B v tumorskih tkivih in zunajceličnih tekočinah, posebej pri bolnikih z metastazami in višjo TNM stopnjo, sovpadajo s hitrejšim napredovanjem bolezni in krajšim celokupnim preživetjem bolnikov. S kombiniranjem vrednosti serumskega katepsina B s CEA, ki je prav tako pokazatelj slabše prognoze pri bolnikih s črevesnim rakom, se prognozična vrednost katepsina B še poveča (51,59). Pri bolnikih v poznejših stopnjah bolezni so v serumu izmerili značilno nižje vrednosti kompleksov katepsina B in cistatina C, kar povezujejo s slabšo vezavno sposobnostjo in inhibicijo cistatina C pri malignih boleznih (60). Katepsin H je najvišjo aktivnost v tkivih dosegal pri II. in III. stopnji, kar so povezali z vpletenostjo pri metastaziranju bezgavk. Pri merjenju serumskih koncentracij katepsina H so ugotovili, da nizka vrednosti sovpada s slabšo prognozo (51,59). V literaturi nismo zasledili, da bi proučevali diagnostično in prognozično vrednost katepsina X ali S pri kolorektalnem raku.

2 HIPOTEZA IN NAMEN DELA

Današnje poznavanje vloge cisteinskih katepsinov ter njihovih inhibitorjev pri napredovanju raka je pokazalo možnost uporabe teh proteinov v diagnozi in prognozi malignih bolezni. Vloga cisteinske proteaze katepsina X pri nastanku in napredovanju malignih bolezni še ni raziskana; prevladuje pa mnenje, da ima pri tem velik pomen povečano izločanje prooblike katepsina X.

Naša hipoteza je, da so povišane vrednosti različnih oblik katepsina X, posebej pa njegove prooblike, povezane s pojavnostjo, slabšo prognozo ter krajšim preživetjem pri ovarijskem in kolorektalnem raku.

Namen diplomskega dela je pripraviti monoklonska protitelesa, ki bodo specifično prepoznavala različne oblike katepsina X, določiti njihovo specifičnost ter jih uporabiti v testu ELISA. Ta test želimo ovrednotiti na vzorcih cističnih tekočin bolnic z ovarijskim rakom ter serumov bolnikov s kolorektalnim rakom. Vrednosti bomo primerjali z nekaterimi drugimi cisteinskimi katepsini, kot so katepsin B, H, L in S ter njihovim endogenih inhibitorjem cistatinom C, ki jih bomo prav tako izmerili z ustrezno pripravljenimi testi ELISA. Dobljene rezultate bomo povezali s kliničnimi in patološkimi parametri bolnikov ter ovrednotili diagnostično in prognostično vrednost katepsina X ter ostalih cisteinskih katepsinov in cistatina C.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

KATEPSIN B

Tabela I: katepsin B ter protitelesa proti katepsinu B.

OZNAKA	OPIS	Osnovna konc.
KatB	Katepsin B (človeški rekombinantni)	0,77 mg/mL
Anti-KatB	Kunčja poliklonska protitelesa proti katepsinu B, prokatepsinu B ter kompleksu [katepsin B - inhibitor]; subklon 99; avgust 1996	0,328 mg/mL
Anti-KatB-HRP	Ovčja poliklonska protitelesa proti katepsinu B, prokatepsinu B ter kompleksu [katepsin B - inhibitor], konjugirana s hrenovo peroksidazo; september 1995	n.d.

KATEPSIN H

Tabela II: katepsin H ter protitelesa proti katepsinu H.

OZNAKA	OPIS	Osnovna konc.
KatH	Katepsin H (nativni)	0,307 mg/mL
antiKatH	Ovčja poliklonska protitelesa proti katepsinu H, prokatepsinu H ter kompleksu [katepsin H - inhibitor]	1,1 mg/mL
Anti-KatH-HRP-a	Mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu H, konjugirana s hrenovo peroksidazo; subklon 2E3	n.d.
Anti-KatH-HRP-b	Mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu H, konjugirana s hrenovo peroksidazo; september 1997; subklon 1D10	n.d.

KATEPSIN L

Tabela III: katepsin L ter protitelesa proti katepsinu L.

OZNAKA	OPIS	Osnovna konc.
proKatL	Prokatepsin L	0,265 mg/mL
antiKatL	Ovčja poliklonska protitelesa proti katepsinu L, prokatepsinu L ter kompleksu [katepsin L - inhibitor]	0,611 mg/mL
antiKatL-HRP	Mišja poliklonska protitelesa proti katepsinu L, prokatepsinu L ter kompleksu [katepsin L - inhibitor], konjugirana s hrenovo peroksidazo; januar 1997; subklon N135MK	n.d.

KATEPSIN S

Tabela IV: katepsin S ter protitelesa proti katepsinu S.

OZNAKA	OPIS	Osnovna konc.
KatS	Katepsin S (mutiran)	1,1 mg/mL
antiKatS	Monoklonska protitelesa proti katepsinu S; subklon 1E3	1,296 mg/mL
antiKatS-HRP	Monoklonska protitelesa proti katepsinu S, konjugirana s hrenovo peroksidazo; april 1999; subklon 2B4	n.d.

KATEPSIN X

Tabela V: katepsin X, prokatepsin X in peptidi proregije prokatepsina X ter protitelesa, uporabljena proti katepsinu X, prokatepsinu X in peptidom proregije prokatepsina X.

katepsin X, prokatepsin X in peptidi proregije prokatepsina X		
OZNAKA	OPIS	Osnovna konc.
KatX-a	Katepsin X, FFA, september 2010	0,94 mg/mL
KatX-b	Katepsin X, IJS, junij 2002	0,388 mg/mL
KatX-c	Katepsin X, IJS, junij 2009	0,18 mg/mL
KatX-d	Katepsin X, FFA, maj 2008	0,26 mg/mL
proX	Prokatepsin X, FFA, september 2010	1,45 mg/mL
p#1	Prvi (začetni) del proregije prokatepsina X; Biosynthesis Inc., Lewisville, Texas	
p#2	Drugi (srednji) del proregije prokatepsina X; Biosynthesis Inc., Lewisville, Texas	
p#3	Tretji (končni) del proregije prokatepsina X; Biosynthesis Inc., Lewisville, Texas	
protitelesa proti katepsinu X, prokatepsinu X in peptidom proregije prokatepsina X		
R&D	Kozja poliklonska protitelesa proti katepsinu X, R&D Systems	0,5 mg/mL
2F12	Mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu X; Subklon 1C9-2F12-2H2, FFA, maj 2009	1,58 mg/mL
3B10	Mišja monoklonska protitelesa proti prokatepsinu X in katepsinu X; Subklon 5C1-3B10-2F7, IJS, junij 2007	0,95 mg/mL
3B10-HRP	Mišja monoklonska protitelesa proti prokatepsinu X in katepsinu X konjugirana s hrenovo peroksidazo; Subklon 5C1-3B10-2F7, avgust 2007	n.d.
1/2	Mišja monoklonska protitelesa proti prvemu delu proregije prokatepsina X, FFA, avgust 2010	0,23 mg/mL
2/3	Mišja monoklonska protitelesa proti drugemu delu proregije prokatepsina X, FFA, avgust 2010	0,8 mg/mL
3/1	Mišja monoklonska protitelesa proti tretjemu delu proregije prokatepsina X, FFA, avgust 2010	0,17 mg/mL

CISTATIN C

Tabela VI: cistatin C ter protitelesa proti cistatinu C.

OZNAKA	OPIS	Osnovna konc.
CysC	Cistatin C (rekombinantni)	3 mg/mL
antiCysC	Kunčja poliklonska protitelesa proti cistatinu C	1,6 mg/mL
antiCysC-HRP	Mišja monoklonska protitelesa proti cistatinu C, konjugirana s hrenovo peroksidazo; maj 2001; Subklon 1A2	n.d.

OSTALA PROTITELESA, STANDARDI IN REAGENTI

Tabela VII: ostala protitelesa, standardi in reagenti, ki smo jih uporabili.

OZNAKA	OPIS	Osnovna konc.	PROIZVAJALEC
Protimišja Ab-HRP	Kozja protimišja protitelesa (IgG+IgA+IgM), konjugirana s hrenovo peroksidazo	2 mg/mL	Invitrogen
See Blue® Plus 2 Pre-stained Standard (1x)	Označevalec velikosti proteinov		Invitrogen

Imject [®] Maleimide Activated Carrier Protein Spin Kits	Kit za predpripravo peptidov p#1, p#2 in p#3 za imunizacijo miši		Thermo Scientific
---	--	--	-------------------

Tabela VIII: Reagenti in topila, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njihov proizvajalec.

REAGENT	PROIZVAJALEC	REAGENT	PROIZVAJALEC
1-butanol	Riedel-deHaën	metanol	Fluka
AcONa	Merck	mleko v prahu	Pomurske mlekarne
AgNO ₃	Sigma	NaCl	Scharlau
akrilamid	Sigma	Na ₂ CO ₃	Fluka
amonijev persulfat	Sigma	NaHCO ₃	Riedel-deHaën
bromfenol modro	Merck	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Carlo Erba Reagents
BSA	Sigma	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Riedel-deHaën
C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	Fluka	NaN ₃	Merck
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O	Serva	NaOH	Merck
DMEM	ICN Biomedicals Inc.	Na ₂ S ₂ O ₃	Riedel-deHaën
DMSO	GibcoBRL (Invitrogen)	očetna kislina	Merck
DTT	Fluka Analytical	penicilin	Sigma
etanol; 70%, 96%	Riedel-deHaën	protein A-sefaroza	GE Healthcare
FCS	Hyclone	SDS	Fluka
formaldehid; 36 %	Merck	streptomycin	Sigma
glicerol, brezvodni	Fluka	Super signal [®] West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific
glicin	Riedel-deHaën	TEMED	Sigma
HCl	Merck	TMB	Sigma
H ₂ SO ₄	Merck	Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Promega
HT	Sigma	Tris baza	Riedel-deHaën
KCl	Merck	Tris HCl	Riedel-deHaën
KH ₂ PO ₄	J. T. Baker	Tween 20	Sigma
L-glutamin	ICN Biomedicals Inc.		

3.1.2 Laboratorijska oprema in aparature

Tabela IX: Laboratorijska oprema in aparature, ki smo jo uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge ter njihov proizvajalec in tip.

OPREMA	PROIZVAJALEC in TIP
analizna tehtnica	EXACTA 610 EB, Tehtnica
aparatura za SDS PAGE	BIO-RAD Laboratories, Inc.
aparatura za ultrafiltracijo	Millipore; AMICON 8010 (10 mL, Pmax = 75 psi, 5,3 kg/cm ²), 8400 (400 mL, Pmax = 75 psi, 5,3 kg/cm ²)
aparatura za western blot	BIO-RAD Laboratories, Inc.
avtoklav	Kambič Laboratorijska oprema
avtomatske večkanalne pipete	Biohit; 1200 µL
avtomatski spiralec mikrotitrskih ploščic	Columbus Plus; TECAN; M8/2R
celulozni filter	Schleicher & Schuell; 589 ¹ Black Ribbon, ashless, 2r = 185 mm

celulozno-acetatni filter	Sartorius; 0,8 µm
centrifuga	Sorvall RT7
CO ₂ inkubator (celični inkubator)	CB 210 BINDER
čitalec mikrotitrskih ploščic (spektrofotometer)	Columbus Plus; TECAN Sapphire 2
G-box	Syngene
gojiščne platenke	TPP Tissue Culture Flasks; 25 cm ² , 75 cm ² , 125 cm ²
gojiščne ploščice	Transwell; z 12 vdolbinicami (MTP12), s 24 vdolbinicami (MTP24), s 96 vdolbinicami (MTP96)
hladilnik (+4°C)	Gorenje, LTH
inkubator	WTB BINDER
invertni mikroskop	Nikon TMS-F
kamera s svetilko za snemanje gelov	UVItec
komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra; PIO SMBC 183, PIO LFVP9
konično mešalo (vortex)	Tehtnica; Vibromix 104EV
magnetno mešalo	Tehtnica; Rotamix 550 MM
membranski filter za ultrafiltracijo	Millipore; AMICON YM3 (premer 67 mm), YM10 (premer 24 mm)
mikrotitrna ploščica iz modulov	NUNC; F8 Maxisorp loose NUNC; 96 Nunclon Delta; Black microwell
mini centrifuga	Tomy; Capsulefuge PMC-060
pH meter	HANNA; HI9321 microprocessor pH meter
ploščica za štetje celic	THOMA; Tiefe Depth Profunder, 0,100 mm ² 0,0025 mm ²
polavtomatske pipete	Eppendorf; 0,2-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL
polavtomatska multikanalna pipeta	Costar
posoda za filtracijo (nuča)	Sartorius
spektrofotometer	NanoDrop Technologies Inc.; NanoDrop ND-1000
PVDF membrana za western prenos	Roth
zamrzovalnik	Gorenje

3.1.3 Gojišča

• Priprava DMEM

13.38 g DMEM

3,7 g NaHCO₃

Z dH₂O dopolnemo do 1000 mL in pH uravnamo na 7,4. Gojišče steriliziramo s filtracijo skozi filter (0,22 µm). Do uporabe hranimo v hladilniku pri 4°C.

• Kompletno gojišče za stimulacijo hibridomskih celic (za ~ 100 ml)

86 mL DMEM

13 mL FCS

1 mL penicilina / streptomicina

2 mL 50 x koncentrirane raztopine hipoksantina in timidina (HT)

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

- **Priprava HAT gojišča**

V 98 ml kompletnega gojišča dodamo 2 ml HAT.

- **Kompletno gojišče za hibridoma celice** (za ~ 100 ml)

86 mL	DMEM
13 mL	FCS
1 mL	penicilin / streptomycin
1 mL	L-glutamin

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

- **Gojišče za zamrzovanje celic**

750 µL	DMEM (50 %)
600 µL	FCS (40 %)
150 µL	DMSO (10 %)

Premešamo in do uporabe hranimo na ledu.

3.1.4 Pufri, raztopine in geli

3.1.4.1 Pufri za test ELISA

- **Pufer A** (za vezavo antigena pri indirektnem testu ELISA, oziroma primarnih protiteles pri sendvič ELISA testu)

1,6 mL	Na ₂ CO ₃ (15 mM)
2,94 g	NaHCO ₃ (35 mM)
0,2 g	NaN ₃ (15 mM)

Dopolnimo z dH₂O do 1 L in s koncentrirano kislino uravnamo pH na 9,6.

- **Pufer B** (za spiranje mikrotitrski plošče pri testu ELISA; WASH pufer)

8,5 g	NaCl (0,15 mM)
1,34 g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (7,5 mM)
2,94 g	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O (2,5 mM)
0,5 g	Tween 20 (0,05%)

Dopolnimo z dH₂O do 1 L in uravnamo pH na 7,2.

- **Pufer C** (za blokiranje prostih mest na mikrotitrski ploščici, za redčenje primarnih protiteles pri indirektnem ELISA testu, oziroma antigena ali vzorcev pri sendvič ELISA testu, ter za redčenje sekundarnih protiteles)

2 g	BSA
-----	-----

Dopolnimo s pufrom B do 100 mL.

- **Pufer D** (za redčenje substrata TMB)

21 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ (citronske kisline) (0,1 M)

17,8 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ (0,1 M)

Dopolnimo z dH_2O do 1 L in uravnamo pH na 6,0.

3.1.4.2 Pufri in raztopine 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 $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ raztopimo v dH_2O do 1000 mL.

Raztopina B: 1,9 g KH_2PO_4 raztopimo v dH_2O do 100 mL.

Raztopini A dodajamo raztopino B do pH vrednosti 8,2 (1000 mL raztopine A dodamo približno 60 mL raztopine B).

- **Elucijski pufer** (pufer za elucijo protiteles; 0,1 M citratni pufer pH 3,5)

Raztopina A: 7,4 g $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ (trinatrijevega citrata dihidrata) raztopimo v dH_2O do 250 mL.

Raztopina B: 21 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ (citronske kisline monohidrata) raztopimo v dH_2O do 1000 mL.

Raztopini B dodajamo raztopino A do pH vrednosti 3,5 (400 mL raztopine B dodamo približno 160 mL raztopine A).

- **Pufer za dodatno spiranje kolone po eluciji protiteles** (0,1 M citratni pufer pH 2,5)

Raztopina A; 7,4 g $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ (trinatrijevega citrata dihidrata) raztopimo v dH_2O do 250 mL.

Raztopina B: 21 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ (citronske kisline monohidrata) raztopimo v dH_2O do 1000 mL.

Raztopini B dodajamo raztopino A do pH vrednosti 2,5 (600 mL raztopine B dodamo približno 10 mL raztopine A).

- **Raztopina za nevtraliziranje eluiranih frakcij protiteles** (0,1 M Tris, pH 9,0)

6,1 g Trisa raztopimo v dH_2O do 50 mL.

3.1.4.3 Pufri in raztopine za SDS-PAGE in western prenos ter recepture gelov za SDS-PAGE

- **12 % separacijski gel za SDS-PAGE**

Tabela X: sestava separacijskega gela za SDS-PAGE.

12 % separacijski gel	Za 1 gel	Za 2 gela
40% akrilamid	1,2 mL	2,1 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1 mL	1,75 mL
H ₂ O	1,7 mL	2,97 mL
10% SDS	50 µL	87,5 µL
10% amonijev persulfat**	50 µL	87,5 µL
TEMED**	1,7 µL	3 µL

**dodamo tik pred vlivanjem gela

- **5 % koncentracijski gel za SDS-PAGE**

Tabela XI: sestava koncentracijskega gela za SDS-PAGE.

5 % koncentracijski	Za 1 gel	Za 2 gela
40% akrilamid	188 µL	376 µL
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	195 µL	390 µL
H ₂ O	1 mL	2 mL
10% SDS	15 µL	30 µL
10% amonijev persulfat**	15 µL	30 µL
TEMED**	1,5 µL	3 µL

**dodamo tik pred vlivanjem gela

- **S H₂O nasičen butanol**

H₂O in 1-butanol zmešano v razmerju 1:1 (V/V), dobro stresemo in odpipetiramo zgornjo organsko fazo.

- **Nanašalni puffer (SDS-PAGE)**

2,5 mL 0,5 M Tris-HCL (pH 6,8)
2,0 mL glicerola
4,0 mL 10 % (m/V) SDS
0,5 mL 0,1 % (m/V) bromfenol modro
1,0 mL dH₂O

- **1 M DTT**

154,25 mg DTT
Raztopimo v dH₂O do 1 mL.

- **10-kratni elektroforezni puffer (pH 8,3)**

29,0 g Tris baze
144,0 g glicina
10 g SDS

Z dH₂O dopolnimo do 1000 mL. Pred uporabo pufer 10-krat redčimo z dH₂O (100 mL 10-kratne raztopine dodamo 900 ml dH₂O).

• **Pufer za prenos**

2,93 g	Tris baze
5,81 g	glicina
3,75 mL	10 % (m/V) SDS
200 mL	metanola

Dopolnimo z dH₂O do 1000 mL.

• **5% mleko v PBS**

2,5 g	mleka v prahu
-------	---------------

S PBS pufrom dopolnimo do volumna 50 mL.

• **0,05% Tween 20 v PBS**

1000 mL pufra PBS dodamo 500 µL Tweena 20.

3.1.4.4 Raztopine za barvanje gela s srebrom

• **Raztopina za fiksiranje**

100 mL	95 % etanola
25 mL	očetne kisline

• **Raztopina za predtretiranje**

75 mL	95% etanola
17 g	AcONa

Z dH₂O dopolnimo do 250 mL.

50 mL te raztopine dodamo 1 mL 10 % Na₂S₂O₃ (vedno pripravimo tik pred uporabo).

• **10% Na₂S₂O₃**

10 g	Na ₂ S ₂ O ₃
------	---

Raztopimo v dH₂O do 100 mL (stabilna je 6 mesecev pri sobni T).

• **Raztopina za barvanje gela**

625 µL	20 % (m/V) AgNO ₃
--------	------------------------------

Dodamo 50 mL dH₂O (vedno pripravimo sproti, tik pred uporabo).

• **20 % AgNO₃**

20 g	AgNO ₃
------	-------------------

Raztopimo v dH₂O do 100 mL (stabilna je 6 mesecev pri sobni T).

• **Raztopina za razvijanje**

7,42 g	Na ₂ CO ₃
--------	---------------------------------

Raztopimo v dH₂O do 250 mL.

50 mL te raztopine dodamo tik pred uporabo 25 µL 36 % formaldehida.

3.1.4.5 Ostali pufri

- **Pufer PBS** (fosfatni pufer z dodatkom NaCl)

1,8 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

0,2 g KH₂PO₄

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

Z dH₂O dopolnimo do 1000 mL in pH uravnamo na 7,4.

3.1.5 Klinični vzorci

Naša študija je bila retrospektivna. Zaradi naših raziskav ni bil potreben noben dodaten poseg na bolnikih. Vsi bolniki, udeleženi v študiji, so podpisali izjavo, s katero so dovolili uporabo vzorcev. Študijo je odobrila komisija za medicinsko etiko na Univerzah v Nijmegnu in Kopenhavnu, naše raziskave pa smo izvedli v okviru mednarodnega sodelovanja z omenjenima institucijama.

VZORCI CISTIČNE TEKOČINE RAKA JAJČNIKOV

Vzorci tekočine ovarijskih cist so bili pridobljeni med operacijami ovarijskega tumorja v Radboud University Nijmegen Medical Centre (RUNMC, Nizozemska) med januarjem 2000 in januarjem 2008. Pridobili so jih s pomočjo aspiracije s sterilno iglo med ali po operaciji (med katero ni bila mogoča popolna odstranitev tumorja; t.i. »*debulking surgery*«). Pridobili so vzorce 68 bolnic. 10 bolnic so kasneje izločili, saj so ugotovili, da ovarijski tumor ni primarni tumor, 8 bolnic pa zato, ker je bil tumor neepitelijski. Vzorce so centrifugirali 10 min na 3000 G, supernatant odpipetirali v vsebnike in vzorce do uporabe shranili na -35°C (61). Vzorci so bili na naši fakulteti shranjeni na -70°C tri mesece. Za vsako bolnico so pridobili klinične podatke, kot so starost, histologija tumorja, stadij FIGO, stopnja diferenciacije in velikost rezidualnega tumorja po operaciji (zbrani so v tabeli). Čas spremljanja bolnic je bil od 9 do 160 mesecev. Ob naši meritvi so bili vzorci stari od 2 do 10 let.

Tabela XII: Podatki bolnic z ovarijskim rakom.

LASTNOSTI		ŠTEVILO (%)	
starost (leta)	57, 32-89 (mediana, območje)	50 (100)	
histologija	serozni	23 (46)	
	mucinski	14 (28)	
	endometroidni	6 (12)	
	svetlocelični	2 (4)	
	nediferencirani	1 (2)	
	NOS	4 (3)	
stadij FIGO	Ia	10 (20)	
	Ib	1 (2)	
	Ic	9 (18)	
	IIa	0 (0)	
	IIb	2 (4)	
	IIc	2 (4)	
	IIIa	2 (4)	
	IIIb	7 (14)	
	IIIc	12 (24)	
	IV	5 (10)	
	stopnja diferenciacije	dobra (1)	13 (26)
		srednja (2)	15 (30)
slaba (3)		18 (36)	
neznana		4 (8)	
velikost rezidualnega tumorja	< 1 cm	41 (82)	
	≥ 1 cm	8 (16)	
	neznana	1 (2)	

VZORCI SERUMOV

Vzorci serumov so bili pridobljeni med leti 2002 in 2005 med endoskopskimi pregledi na Hvidovre Hospital, Koebenhaven, Danska. Zbrali so 308 vzorcev (4 skupine po 77 vzorcev), med katerimi so vzorci bolnikov s kolorektalnim karcinomom, adenomom, drugimi boleznimi črevesja (večinoma z divertikulozo – benignimi vrečastimi izrastki na črevesni sluznici) in vzorci zdravih oseb. V vsaki izmed skupin je bilo 40 moških in 37 žensk. Vzorci so bili shranjeni na -70°C. Čas spremljanja bolnic je bil od leta 2004 do 2009. Ob meritvi so bili vzorci stari od 6 do 9 let.

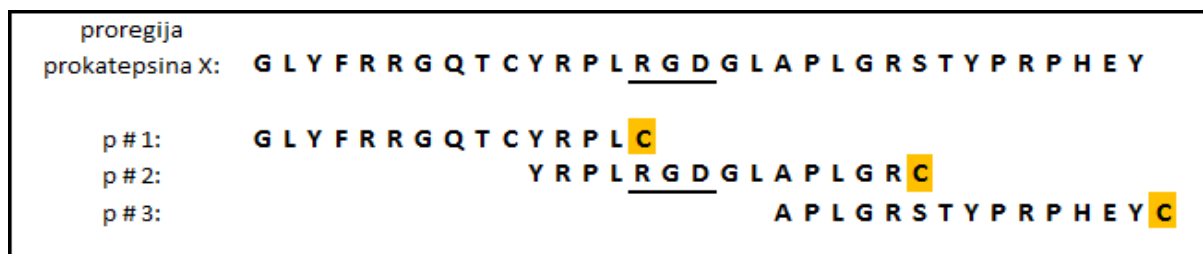
Tabela XIII: Podatki vzorcev serumov bolnikov s kolorektalnim rakom in kontrolnih skupin.

LASTNOSTI		ŠTEVILO
starost	73, 40-90 (mediana, območje)	308
kolorektalni karcinom	karcinom rektuma (20)	77
	karcinom kolona (57)	
adenom		77
divertikuloza		77
zdravi osebki		77
TNM stopnja	I	8
	II	32
	III	16
	IV	15
	neopredeljeni	6

3.2 METODE

3.2.1 Sinteza peptidov proregije prokatepsina X

Za pripravo monoklonskih protiteles proti prokatepsinu X smo sintetizirali 3 peptide, ki prekrivajo proregijo prokatepsina X. Peptidi so bili dolgi 14 AK in so se prekrivali. Peptidom smo na C-konec dodali cistein, ki omogoča vezavo na nosilec preko cisteinskega preostanka.



Slika 2: Sestava peptidov p#1, p#2 in p#3 in primerjava s proregijo prokatepsina X. Označeno je zaporedje RGD in dodani končni cisteini.

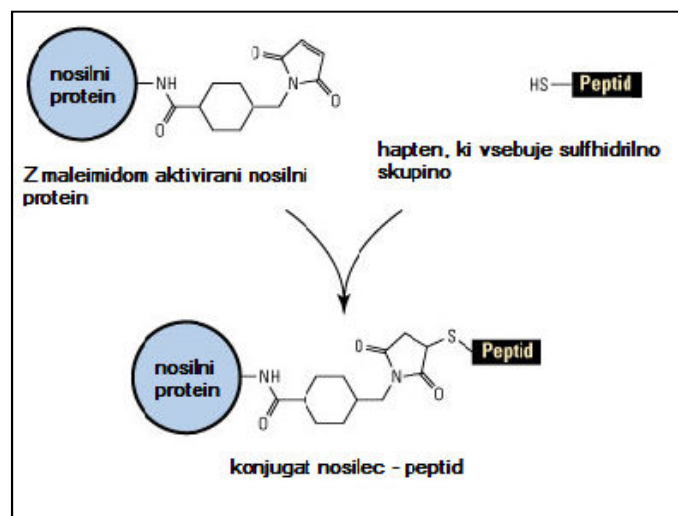
Peptide p#1, p#2 in p#3 so sintetizirali po Merrifieldovi metodi (Biosynthesis Inc., Lewisville, Texas, ZDA). Molekulske mase peptidov so 1833,16 (p#1), 1643,93 (p#2) in 1746,96 (p#3). Čistost peptidov, ki je v vseh treh primerih večja od 85%, so določali s HPLC (visoko tlačna tekočinska kromatografija).

3.2.2 Vezava peptidov na nosilno molekulo

Peptidi, majhni proteini in druge molekule z majhno molekulsko maso so hapteni, za katere velja da niso imunogeni, zato za uspešno imunizacijo potrebujejo dodaten nosilni protein. Kot nosilne molekule lahko uporabimo različne proteine, kot so goveji serumski albumin, ovalbumin ali hemocianin, ki jih kovalentno povežemo s hapteni. Najpogosteje uporabljen nosilec je hemocianin iz školjke vrste *Megathura crenulata* (keyhole limpet hemocianine – KLH), ki ima zelo veliko molekulsko maso in na površini veliko število epitopov, kar izzove močan imunski odgovor, poleg tega pa tudi veliko število lizinskih preostankov, preko katerih se hapteni s sulfhidrilnimi skupinami lahko vežejo (62,63,64).

Za konjugacijo peptidov z nosilno molekulo hemocianina smo uporabili kit *Imject Maleimide-Activated mKLN Spin Kit*, kjer je hemocianin aktiviran z maleimidom (sulfosukcinimidil-4-(N-maleimidometil)ciklohekan-1-karboksilatno skupino (sulfo-SMCC)), kar omogoča tvorbo kovalentne vezi s sulfhidrilno skupino haptena. Hapteni, ki imajo v strukturi cistein, v raztopini pogosto oksidirajo in med sabo tvorijo disulfidne vezi, kar onemogoča reakcijo z maleimidom. Z uporabo reducenta lahko te vezi prekinemo in dobimo spet proste sulfhidrilne skupine, pred konjugacijo pa moramo reducent iz raztopine odstraniti. V našem primeru smo

peptide raztopili tik pred uporabo, tako da sklepamo, da do tvorbe disulfidnih vezi ni prišlo. (62,64).



Slika 3: Struktura in reakcija konjugacije med nosilnim proteinom in peptidom s sulfhidrilno skupino preko sulfo-SMCC skupine (62).

Izvedba:

Po navodilih proizvajalca ter z uporabo omenjenega kita, smo združili peptid s sulfhidrilno skupino in aktiviran nosilni protein. Konjugat smo z razsoljevanjem očistili, da smo odstranili EDTA ter natrijev azid, kateri ne sme biti injiciran v živali, sterilno filtrirali ter shranili v sterilnem vsebniku. Konjugat je tako pripravljen za imunizacijo (64).

3.2.3 Imunizacija miši

Imunizacijo so izvajali na biotehniški fakulteti (prof. dr. Mojca Narat) v skladu s smernicami dobre veterinarske prakse in z dovoljenjem veterinarske etične komisije. Trem skupinam po dve miši so injicirali po 50 μ g konjugatov p#1-KLH, p#2-KLH, p#3-KLH subkutano, v Freundovem kompetnem adjuvansu. Po dveh tednih so jih z enakimi količinami konjugatov ter adjuvansa imunizirali intraperitonealno. Po enem tednu so mišim vzeli kri iz repne vene, jo eno uro inkubirali pri 37°C, nato 3 ure na ledu, da je prišlo do koagulacije. Po 5 minutnem centrifugiranju pri 3000 obr/min, smo odpipetirali serum ter ga uporabili v indirektnem testu ELISA, da smo določili titer protiteles v miših. Mikrotitrne ploščice smo prekrili z ustreznimi raztopinami peptidov p#1, p#2 in p#3. Po 2 tednih od zadnje imunizacije so mišim dodali poživilno injekcijo intraperitonealno (konjugat v fiziološki raztopini).

3.2.4 Priprava in gojenje hibridomske celične linije

FUZIJA HIBRIDOMSKIH CELIC

Hibridomske celične linije so pripravili po metodi Kölerja in Millsteina (65), pri čemer so limfoblaste, izolirane iz vranice, združili z mielomskimi celicami z etilen glikolom. Sledila je selekcija na HAT gojišču ob dodatku timocitov. Tako so odstranili neustrezne oblike hibridomov (med mielomskimi celicami in med limfociti B) in celice, ki se niso združile.

GOJENJE HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ IN DOLOČANJE POZITIVNIH KLONOV

Tako dobljene hibridome smo gojili v sterilnih pogojih v celičnem inkubatorju v vlažni atmosferi s 5% CO₂ pri temperaturi 37°C. Z invertnim mikroskopom smo vsak dan opazovali rast celic. Z indiretnim testom ELISA smo celice testirali, da smo določili pozitivne in stabilne klone (s stabilnim številom kromosomov), ki izdelujejo specifična monoklonska protitelesa. Mikrotitrne ploščice smo prekrili z ustreznimi raztopinami peptidov p#1, p#2 in p#3. Klone, ki so dajali najboljše odzive, smo prestavili iz gojiščnih mikrotitrskih ploščic s 96 luknjicami v gojiščne ploščice s 24 luknjicami, dohranili s HT medijem, ki je vseboval tudi timocite in ko so se ustrezno obrastli, ponovno testirali z indirektnim testom ELISA. Klone z najboljšimi odzivi smo prestavili v 15cm² gojiščne platenke, dodali kompletno DMEM gojišče in volumen postopoma povečevali. Celice so bile ves čas v eksponentni fazi rasti. Ko smo dobili zadostno količino celic, smo te zamrznili. Na koncu smo pridobili šest vrst mišjih monoklonskih protiteles in sicer za vsak peptid po dva najboljša klona, ki smo jih označili: za p#1 (1/1 in 1/2) za p#2 (2/1 in 2/3) ter za p#3 (3/1 in 3/2).

ŠTETJE IN ZAMRZOVANJE HIBRIDOMSKIH CELIC

S pomočjo citometra na mikroskopu smo določili število celic na mL suspenzije. Hibridome smo homogeno suspendirali. Odvzeli smo 100 µL gojišča s celicami in dodali 100 µL nigrozina, ki obarva mrtve celice. Prešteli smo žive celice v dveh paralelkah in izračunali povprečno število celic/mL gojišča po formuli:

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

N ... število celic / mL gojišča

N' ... povprečno število pod mikroskopom prešteti celic

Gojišče s celicami smo najprej eno uro hladili na ledeni kopeli in nato centrifugirali 5 min pri 1000 obr/min. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v zamrzovalnem gojišču (1x10⁷ celic/ml). Po 1,5 ml suspenzije smo napolnili v krioviale, jih čez noč hranili na -70°C, nato pa shranili v tekočem dušiku pri -196°C.

ODMRZOVANJE HIBRIDOMA CELIC

Hibridomske celice, ki smo jih zamrznili in shranili v tekoči dušik, smo najprej odtajali v vodni kopeli pri temperaturi 37°C. Vsebini v viali smo dodali približno 1 ml kompletnega DMEM gojišča, segretega na 37°C. Vsebino vial smo prenesli v 15-mililitrsko centrifugirko, s kompletnim DMEM gojiščem dopolnili do volumna 6,5 mL ter centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Oborino smo resuspendirali v kompletnem DMEM gojišču in prenesli v ustrezno gojiščno plastenko.

KLONIRANJE Z METODO OMEJENEGA REDČENJA

Hibridome smo razredčili v kompletnem DMEM gojišču tako da je prišlo 0,5 celice/luknjico gojiščne mikrotitrne plošče (za dve plošči potrebujemo 100 celic in 40 ml kompletnega DMEM medija). Dodali smo suspenzijo timocitov. Čez 3 do 4 dni smo plošče pregledali pod mikroskopom in prešteli klone. Glede na rast smo jih dohranjevali ter po približno enem tednu testirali z indirektnim testom ELISA na prokatepsinu X. Klone z najboljšim odzivom smo predstavili na gojiščno ploščo s 24 luknjicami in dodali kompletno DMEM gojišče, ki smo mu dodali timocite. Glede na rast smo klone dohranjevali in testirali z indirektnim testom ELISA. Klone, ki je dal najboljši odziv, smo prenesli v gojiščno plastenko in postopoma povečevali volumen s kompletnim DMEM gojiščem do končnega volumna 1 L.

3.2.5 Izolacija in čiščenje protiteles

FILTRACIJA SUSPENZIJE

Zaradi pomanjkanja hranil so hibridomi postopoma odmrli. Celično suspenzijo hibridomov smo najprej prefiltrirali skozi celulozni filter (črni trak), da smo odstranili morebitno sluz in trdne delce. Sledila je filtracija na nuči s pomočjo vodne črpalke skozi celulozno-acetatni filter s premerom por 0,8 µm. Na ta način smo odstranili odmrle oziroma lizirane celice in njihove ostanke.

ULTRAFILTRACIJA, KONCENTRACIJA IN DIALIZA PROTI VEZALNEMU PUFRU

Ultrafiltracija je metoda, ki jo uporabljamo za koncentriranje proteinov z različno molekularno maso ter za dializo. Pri tej metodi uporabljamo membrane s porami določene velikosti, ki prepuščajo le molekule in ione topila in topljencev, ki so manjši od premera por membrane; večje makromolekule pa ostanejo v koncentratu. Uporabili smo membrano YM3, za katero velja mejna vrednost 3.000 MW. Molekularna masa protiteles je približno 150.000 MW, kar pomeni da protitelesa ne prehajajo skozi pore membrane. Na ultrafiltru skoncentriramo filtrat do čimmanjšega volumna. Ultrafiltracija poteka pri nadtlaku dušika 3 bar, pri stalnem mešanju 100 obr/min in temperaturi +4°C (66).

Koncentrirano raztopino protiteles dializiramo proti vezalnemu puftru (0,14 M fosfatni pufer, pH = 8,2), da jo razsolimo in ji uravnamo pH. Raztopina je tako pripravljena za izolacijo z afinitetno kromatografijo.

AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

Protitelesa smo izolirali s pomočjo afinitetne kromatografije. Pri tem se proteini ob prehodu skozi kolono vežejo na ligand, ki je kovalentno imobiliziran na nosilec, ki je bil v našem primeru sefaroza. S spreminjanjem pogojev, kot so pH, dielektrična konstanta, temperatura, ionska moč ali z uporabo denaturantov vezan protein eluiramo s kolone. Kot ligand smo uporabili protein A, ki je izoliran iz celične stene bakterije *Staphylococcus aureus*, ki veče Fc regijo imunoglobulinov IgG. Elucijo protiteles na protein A-sefarozi smo dosegli z zniževanjem pH, količino eluiranih protiteles pa smo določili z merjenjem absorbance na nanodropu pri 280 nm (67,68,69).

Postopek izvajanja afinitetne kromatografije:

1. Kolono speremo s 3-kratnim volumnom vezalnega puftra pH 8,2, da odstranimo raztopino azida in morebitne nečistote. Pustimo, da pufer popolnoma odteče s kolone.
2. Pri zaprtem dnu kolone previdno naneseemo vzorec na sefarozo. Pri odprtem dnu lovimo iztekajočo tekočino. Ko se pojavi tekočina rdečkaste barve, dno kolone zapremo in pustimo na sobni temperaturi 1 uro, da pride do vezave protitelesa na ligand.
3. Nad sefarozo naneseemo do vrha kolone vezalni pufer in odpremo dno kolone. Prvih 50 mL iztekajoče tekočine shranimo na -20°C (če do vezave ne bi prišlo in bi protitelesa stekla skozi kolono).
4. Kolono spiramo z vezalnim pufrom dokler ne dosežemo vrednosti absorbance 0,01.
5. Ko iz kolone steče vezalni pufer, kolono spiramo z elucijskim pufrom pH 3,5. V epruvete zbiramo frakcije po 5 mL in jim izmerimo absorbanco. Frakcije z visoko absorbanco združimo in s Tris pufrom pH 9,0 uravnamo pH na 7,0.
6. Kolono nato speremo še s pufrom za dodatno spiranje kolone pH 2,5 do absorbance 0,01, da s kolone odstranimo nespecifično vezane molekule.
7. Kolono 3-krat speremo z vezalnim pufrom, dokler ni pH puftra, ki izteka iz kolone enak pH-ju vezalnega puftra. Če kolone ne bomo uporabili v naslednjih 3 tednih, vezalnemu puftru dodamo 0,03% azida. Kolono do uporabe hranimo v hladilniku pri temperaturi $+4^{\circ}\text{C}$.

Združene nevtralizirane frakcije eluiranih protiteles skoncentriramo na ultrafiltru do volumna 1-2 mL. Koncentrirani raztopini trikrat dodamo pufer PBS v razmerju 1:2 in dializiramo proti pufru PBS s pH 7,2. V komori z laminarnim pretokom zraka raztopino protitelesa filtriramo s injekcijsko brizgo skozi sterilni filter s porami 0,22 μm . Koncentracijo protiteles določamo spektrofotometrično - z merjenjem absorbance na nanodropu pri 280 nm. Izolirana protitelesa shranimo na -20°C .

3.2.6 Poliakrilamidna gelska elektroforeza

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Molekule potujejo pod vplivom električnega polja proti katodi ali anodi, hitrost potovanja pa je odvisna od njihovega celokupnega naboja, oblike in velikosti. Poliakrilamidna gelska elektroforeza poteka vertikalno in se uporablja predvsem za ločevanje proteinov, ki ga dosežemo z različno zamreženimi gelskimi matriksi. Poznamo dve vrsti poliakrilamidne gelske elektroforeze; nativno PAGE in PAGE v prisotnosti ionske površinsko aktivne snovi, kot je na primer natrijev dodecil sulfat (SDS-PAGE). Natrijev dodecil sulfat je anionska površinsko aktivna molekula, ki se nespecifično veže na proteine in jih denaturira. Ker ima SDS negativni naboj, bodo negativno nabiti tudi proteini, zato v električnem polju vse molekule potujejo proti pozitivno nabiti anodi. Hitrost potovanja je obratnosorazmerna z velikostjo proteinov. Pri nativni poliakrilamidni gelski elektroforezi pa se molekule proteinov ločujejo na osnovi naboja in velikosti. Struktura molekul se ohrani, ostane nativna, proteini torej ne izgubijo svoje biološke funkcije (70,67).

Postopek izvajanja SDS-PAGE:

1. Najprej smo sestavili aparaturo za vlivanje gela. Med debelejšje stekelce z 0,75 mm distančnikom in tanjše stekelce smo vlili približno 3,3 mL 12% separacijskega gela, ki smo ga pripravili po prej omenjeni recepturi. Gladino gela smo zravnali s približno 1 mL izobutanola, nasičenega z vodo.
2. Po pol ure smo izobutanol odlili in pripravili 5% koncentracijski gel, ki smo ga vlili nad strjen separacijski gel. Preden se je gel strdil, smo vanj vstavili »glavniček«, ki nam oblikuje žepke za nanašanja vzorca. Tako pripravljen gel pustimo vsaj pol ure, da se strdi.
3. Sledila je priprava vzorcev; za en žepok smo katepsin X oziroma prokatepsin X ustrezno redčili z dH_2O do skupnega volumna 10 μL , dodali 2,7 μL 1 M DTT in 5,5 μL nanašalnega pufru. Vzorec smo 5 min inkubirali na 100°C , da je prišlo do denaturacije proteinov in cepitve disulfidnih vezi.

4. Strjen gel med stekelci smo prenesli v aparaturo za elektroforezo ter notranji in zunanji rezervoar napolnili z elektroforeznim pufrom. V žepke smo nanesti vzorce (v vsak žepok po 18 μL vzorca). V en žepok smo nanesti tudi 3 μL označevalca velikosti proteinov, da smo lahko odčitali velikost dobljenih lis. Elektroforezo smo izvajali pri električni napetosti 100 V 1,5 do 2 h. Čas izvajanja smo podaljšali ko smo želeli doseči dobro ločbo med katepsinom X in prokatepsinom X, skrajšali pa takrat, ko smo hoteli detektirati tudi proregijo prokatepsina X.

VIZUALIZACIJA PROTEINOV PO PAGE

Detekcijo proteinov po ločitvi na poliakrilamidnem gelu lahko izvajamo z barvanjem s *coomasie brilliant blue* ali s srebrovimi ioni. Slednjega smo uporabili tudi v naših poskusih. Najpomembnejša razlika med obema načinoma je v občutljivosti detekcije – pri barvanju s srebrovimi ioni je ta sto- do tisočkrat višja. Barvanje s srebrom temelji na redukciji srebrovih ionov, ki so vezani na stranske skupine aminokislin, do elementarnega srebra. S to metodo lahko detektiramo zelo majhne količine peptidov in proteinov, kot so 0,1 do 1,0 ng. Postopek je daljši in zahtevnejši kot pri barvanju s *coomasie brilliant blue* (70).

Gele smo barvali po sledečem postopku ob stresanju pri 50 obr/min:

1. fiksiranje (30 min)
2. predtretiranje (30 min)
3. spiranje z dH_2O (3-krat 5 min)
4. barvanje (20 min)
5. razvijanje (2-5 min)
6. spiranje z dH_2O (3-krat 5 min)

3.2.7 Detekcija proteinov s prenosom po Westernu

Proteine, ločene s PAGE prenesemo na nitrocelulozno ali najlonsko membrano, ki jo potem specifično označimo s protitelesi. Ta prenos je bodisi kapilaren, bodisi elektroforezen. Po prenosu membrano najprej inkubiramo v raztopini, ki prekrije prosta mesta na membrani in s tem preprečimo vezavo protiteles na nezasedena mesta na membrani. Membrano inkubiramo najprej v raztopini primarnih protiteles, nato pa sekundarnih protiteles, ki so lahko označena na več načinov (radioaktivni izotop, koloidno zlato, encim). Najpogosteje so konjugirana z encimom (v našem primeru peroksidazo), ki ob inkubaciji v raztopini substrata tvori viden produkt (71).

Metodo smo uporabili, da bi preverili, ali izolirana protitelesa specifično prepoznavajo samo prokatepsin X, kot kontrolo pa smo uporabili še protitelesa 3B10, ki prepoznavajo tako

prokatespin X kot katepsin X. Kot primarna protitelesa smo uporabili izolirana protitelesa proti posameznemu peptidu, oziroma 3B10, kot sekundarna pa s peroksidazo označena kozja protimišija protitelesa.

Izvedba:

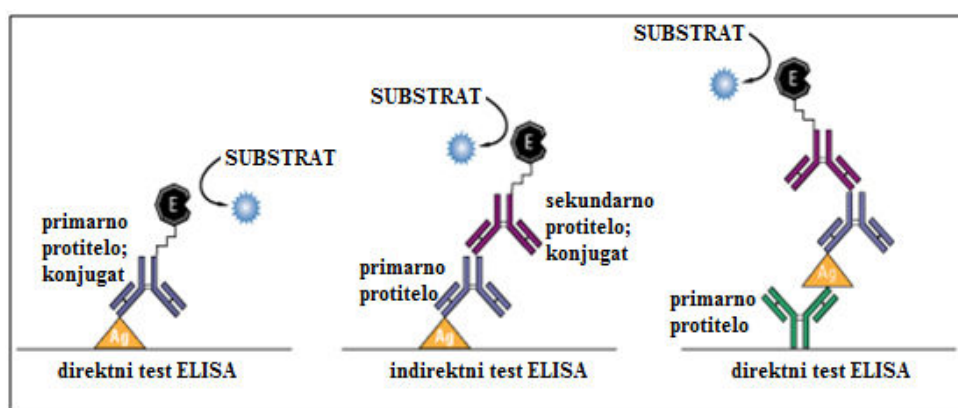
Prenos Western smo izvajali na posebni aparaturi med dvema elektrodama. Najprej smo izrezali filtrirne papirje in membrano PVDF enakih dimenzij, kot je elektroforezni gel (5,3 x 8,3). Filter papirje, membrano in elektrode smo najprej dobro namočili v pufer za prenos. Na katodo smo nato postavili 2 lista filtrirnega papirja. Gel smo previdno ločili od stekelc, ter ga z rokavicami, navlaženimi s pufrom za prenos, previdno, z držanjem za rob, prenesli na omočen papir. Na gel smo previdno postavili PVDF membrano, nad njo pa še 2 lista filtrirnega papirja. Nazadnje smo nad zložene plasti postavili že navlaženo katodo in aparaturo priključili na napetost. Prenos je potekal 90 min pri napetosti 100 V. Po prenosu smo membrano inkubirali v pufru za blokado (5% mleko v PBS) in rahlo stresali pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje z 0,05 % Tweenom v PBS (3-krat 10 min). Nato smo nanесли primarna protitelesa z ustrežno koncentracijo, redčena v 0,05 % Tweenu v PBS in membrano inkubirali preko noči. Sledilo je ponovno spiranje z 0,05% Tweenom v PBS (3-krat 10 min). Sledila je inkubacija (45 min) s sekundarnimi protitelesi, ki smo jih ustrežno redčili v 0,05% Tweenu. Po ponovnem spiranju z 0,05% Tweenom smo na membrano nanесли substrat za peroksidazo (Super Signal[®] West Dura Extended Duration Substrate). Po 5-minutni inkubaciji v temi, smo signal detektirali na napravi G-BOX in sicer z merjenjem kemiluminiscence.

3.2.8 Test ELISA

Encimskoimunski test na trdnem nosilcu ali test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) je občutljiva imunološka metoda, ki se uporablja za detekcijo antigenov ali protiteles v vzorcu (72). Jo visoko specifična in občutljiva in omogočata merjenje izredno majhnih koncentracij analitov v kompleksnih mešanica snovi, ki bi jih drugače le težko identificirali, še težje pa kvantificirali.

Test temelji na specifični povezavi paratopa na Fab regiji protitelesa s komplementarnim epitopom na antigenu z nekovalentimi vezmi. Detekcijo omogoča encimska reakcija, ki jo katalizira encim, konjugiran z Fc regijo primarnega ali na sekundarnega protitelesa, kateri pretvori substrat v obarvan produkt. Množina nastalega produkta in s tem intenziteta obarvanja je sorazmerna množini imunskih kompleksov in s tem analita v vzorcu (73,74). Razvili so številne kombinacije ELISA testov, pri katerih lahko kvalitativno in semikvantitativno določamo tako antigene, kot protitelesa (72).

Za določanje antigenov v vzorcu se uporablja direktni test ELISA. Indirektni test ELISA pa je prirejen za določanje protiteles. Pri obeh izvedbah za detekcijo dodamo sekundarna protitelesa s konjugiranim encimom, v našem primeru hrenovo peroksidazo (HRP), ki razgradi substrat (H_2O_2 + tetrametil benzidin). Encimsko reakcijo HRP prekinemo z dodatkom H_2SO_4 , nastali produkt pa kvantificiramo spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 450 nm.



Slika 4: Različne vrste testa ELISA (75).

INDIREKTNI TEST ELISA

Test smo uporabili za selekcijo hibridomskih klonov, ki izločajo želeno protitelesa. Na mikrotitrne ploščice smo nanegli peptide #1, #2 in #3, raztopljene v pufru A. Sledil je nanos gojišča s protitelesi različnih klonov, po spiranju pa smo nanegli označena protitelesa, ki prepoznavajo mišja protitelesa. Po dodatku substrata je sledilo merjenje absorbance.

Isti test smo uporabili tudi pri kvantifikaciji jakosti vezave protiteles proti proregiji prokatepsina X na prokatepsin X in katepsin X ter pri kvantifikaciji jakosti vezave protiteles 3B10 na prokatepsin X in katepsin X.

Postopek izvajanja indirektnega testa ELISA:

1. Prekrivanje mikrotitrne plošče; antigen ustrezno razredčimo v pufru A in v vsako vdolbinico mikrotitrne ploščice odpipetiramo po 100 μ L raztopine antigena ter ploščo prekrijemo s folijo.
2. Inkubacija; poteka čez noč pri $+4^{\circ}C$.
3. Spiranje ter osušitev plošče; s pomočjo avtomatskega spiralca ploščo 3-krat speremo s pufrom B in osušimo.
4. Nanos blokade; v vsako vdolbinico odpipetiramo po 150 μ L pufru C in pokrijemo s folijo.
5. Inkubacija; poteka od 30 minut do 2 uri na sobni temperaturi.

6. Odstranitev blokade; pufer C odlijemo in ploščno osušimo
7. Vezava protiteles v vzorcu; v vsako vdolbinico naneseemo 100 μL raztopine, kot kontrolo naneseemo le pufer C (po 100 μL).
8. Inkubacija; poteka 2 uri na 37°C.
9. Spiranje ter osušitev plošče; s pomočjo avtomatskega spiralca ploščo 3-krat speremo s pufrom B in osušimo.
10. Vezava označenih protiteles; označena protitelesa ustrezno razredčimo s pufrom C in v vsako vdolbinico odpipetiramo po 100 μL .
11. Inkubacija; poteka 2 uri na 37°C.
12. Spiranje ter osušitev plošče; s pomočjo avtomatskega spiralca ploščo 3-krat speremo s pufrom B in osušimo.
13. Reakcija s substratom; substrat TMB-Sigma redčimo s pufrom D in odpipetiramo po 200 μL v vsako vdolbinico. Pokrijemo s folijo in pustimo na sobni temperaturi 15 minut.
14. Prekinitev reakcije; v vsako vdolbinico dodamo po 50 μL raztopine za prekinitev reakcije.
15. Meritev absorbance; na čitalcu izmerimo absorbanco pri 450 nm.

DIREKTNI TEST ELISA

Direktni test ELISA se uporablja za določanje antigena v vzorcu. Za detekcijo potrebujemo dve vrsti protiteles, ki prepoznavata različna epitopa na antigenu.

Postopek izvajanja direktnega testa ELISA:

1. Prekrivanje mikrotitrne plošče; primarna (neoznačena) protitelesa ustrezno razredčimo v pufu A in v vsako vdolbinico mikrotitrne ploščice odpipetiramo po 100 μL te raztopine ter ploščo prekrijemo s folijo.
Koraki od 2. do 6. so enaki kot pri indirektnem testu ELISA
7. Vezava antigena; za standardno krivuljo pripravimo ustrezno razredčitveno vrsto v pufu C in v vsako vdolbinico odpipetiramo 100 μL standarda; vzorce ustrezno redčimo s pufrom C in odpipetiramo po 100 μL v vsako vdolbinico; kot kontrolo naneseemo le pufer C (po 100 μL).
8. Inkubacija; poteka 2 uri na 37°C.
9. Spiranje ter osušitev plošče; s pomočjo avtomatskega spiralca ploščo 3-krat speremo s pufrom B in osušimo.

10. Vezava označenih protiteles; označena protitelesa ustrezno razredčimo s pufrom C in v vsako vdolbinico odpipetiramo po 100 μ L.
11. Inkubacija; poteka 2 uri na 37°C.
12. Spiranje ter osušitev plošče; s pomočjo avtomatskega spiralca ploščo 3-krat speremo s pufrom B in osušimo.
13. Reakcija s substratom; substrat TMB-Sigma redčimo s pufrom D in odpipetiramo po 200 μ L v vsako vdolbinico. Pokrijemo s folijo in pustimo na sobni temperaturi 15 minut.
14. Prekinitev reakcije; v vsako vdolbinico dodamo po 50 μ L raztopine za prekinitev reakcije.
15. Meritev absorbance; na čitalcu izmerimo absorbanco pri 450 nm.

Direktni test ELISA smo uporabili za merjenje koncentracij katepsinov B, L, H, X in cistatina C v vzorcih tekočine ovarijskih cist ter katepsinov S, H in X v vzorcih seruma bolnikov s kolorektalnim rakom in kontrolnih skupin. Uporabili smo protitelesa in standarde antigenov, ki so jih predhodno razvili v skupini, z ustreznimi redčitvami pa smo test optimizirali, da smo dosegli čimširše delovno območje testa, pa tudi čim nižjo mejo detekcije (76,77). Koncentracijo katepsinov in cistatina C smo določili na podlagi umeritvenih krivulj, ki smo jih izdelali s pomočjo razredčitvenih vrst standardov antigenov (predstavljeni v poglavju 3.1.1). Absorbance, izmerjene pri 450 nm smo nanašali v odvisnosti od koncentracije standardnih raztopin katepsinov oziroma cistatina C. Pri tem smo upoštevali tudi meritve kontrol in povprečje njihovih absorbanco odšteli od izmerjenih absorbanco standardov in vzorcev. Nekaj naključnih vzorcev smo serijsko redčili, da smo določili linearnost metode in pa optimalne redčitve vzorcev za posamezne teste. Koncentracije vzorcev smo določali v dveh paralelnih poskusih. Uporabljene koncentracije, umeritvene krivulje in rezultati so predstavljeni v poglavju 4.1.

3.2.9 Statistično vrednotenje rezultatov

Rezultati določanja koncentracij katepsinov B, H, L in X ter cistatina C v vzorcih tekočine cist ovarijskega karcinoma, so statistično vrednotili s programom SPSS 16.0.2 (SPSS Benelux BV, Gorinchem) na Nizozemskem.

Vrednosti so predstavljene kot mediana v ng/mL (25.-75. percentil). Normalnost distribucije so za vse spremenljivke, razen katepsina X in cistatina C, določali s Kolmogorov-Smirnovim testom, za omenjena analita pa z Ln transformacijo. Razlike med dvema skupinama so testirali s Studentovim *t*-testom, za razlike med več kot dvema skupinama pa so uporabili test

ANOVA, s sledečimi Tukey's HSD testi. Razmerja med cistatinom C in različnimi katepsini so testirali neparametrično ter uporabili Mann-Whitneyev in Kruskal-Wallisov test. Za statistično analizo kliničnopatoloških spremenljivk so stadije FIGO razvrstili v dve skupini: stadij I (tumorji, lokalizirani v ovarijih) ter stadiji II, III in IV (tumorji, ki so metastazirali). Histološke podtipе so razdelili v tri skupine in sicer serozne, mucinske in endometroidne. Glede na diferenciacijo so podatke razdelili v dve skupini: dobro diferencirane tumorje (nižji razred) ter srednje in slabo diferencirane tumorje (višji razred), glede na velikost rezidualnega tumorja po operaciji so bolnice razdelili v skupino z velikostjo rezidualnega tumorja < 1 cm in skupino z velikostjo ≥ 1 cm. Za analizo preživetja so uporabili mediane koncentracij katepsinov in cistatina C ter mediane njihovih razmerij. Kot preživetje v odsotnosti bolezni so določili časovni interval od operacije in do ponovnega pojava bolezni ali smrti bolnice. Enakost distribucije preživetja so testirali z Cox-ovo univariatno regresijsko analizo (61). Rezultate koncentracij katepsinov H, S in X v serumih bolnikov s kolorektalnim rakom so statistično vrednotili s programom SAS (V9.2, SAS Institute, Cary, N.C., USA) na Danskem. Za statistično analizo so vrednosti koncentracij pretvorili v logaritemske vrednosti. Tako je bila izpolnjena normalnost porazdelitve in homogenost variance podatkov, razlike med razredi pa so lahko predstavili kot razmerja. Izračunali so geometrične sredine posameznih skupin ter jih primerjali s skupino zdravih osebkov. Pri 77 bolnikih s kolorektalnim karcinomom so analizirali tudi prognostično vrednost katepsinov H, S in X. Uporabili so Kaplan-Meierjevo metodo, ki vrednoti porazdelitev vrednosti glede na mediano.

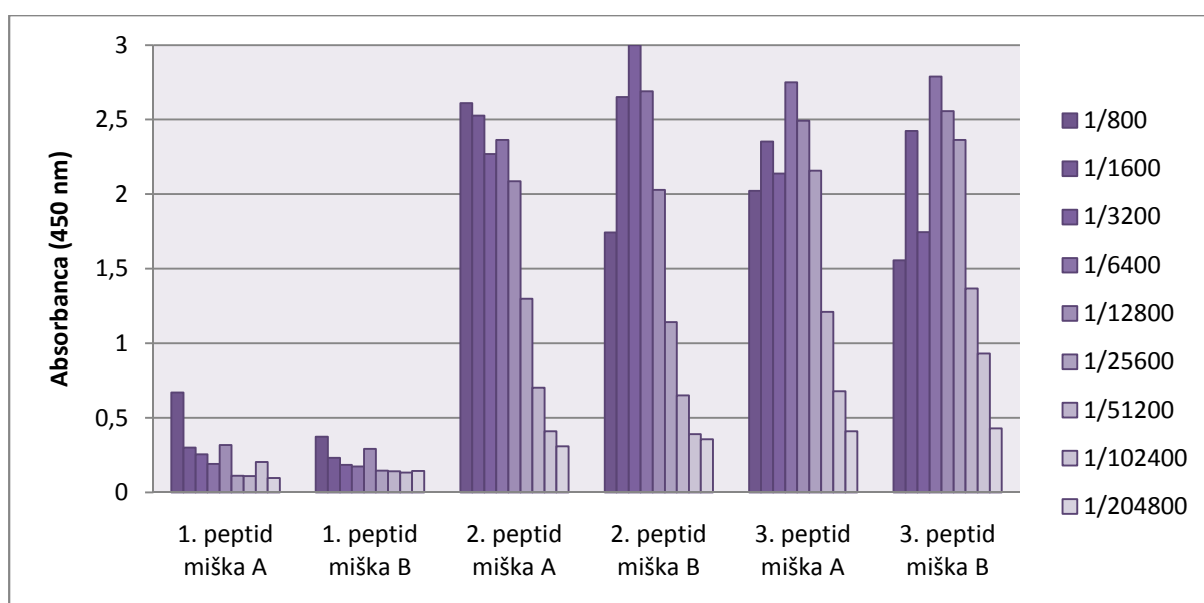
V obeh primerih so bile razlike statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES IN TESTA ELISA ZA DOLOČANJE PROKATEPSINA X

4.1.1 PROTITELESNI ODZIV PRI IMUNIZACIJI MIŠI S PEPTIDI PROREGIJE PROKATEPSINA X

Po imunizaciji mišk s konjugiranimi peptidi proregije smo z indirektnim testom ELISA preverili titer protiteles, ki je nastal kot odziv na vbrizgan antigen. Mikrotitersko ploščo smo čez noč prekrili z ustreznimi peptidi s koncentracijo 5 µg/mL. Sledil je nanos mišjega seruma v redčitvah od 1/800 do 1/200.000. Končno smo nanесли še sekundarna protitelesa; kozja protimišja Ab-HRP, redčena 1/3.000.



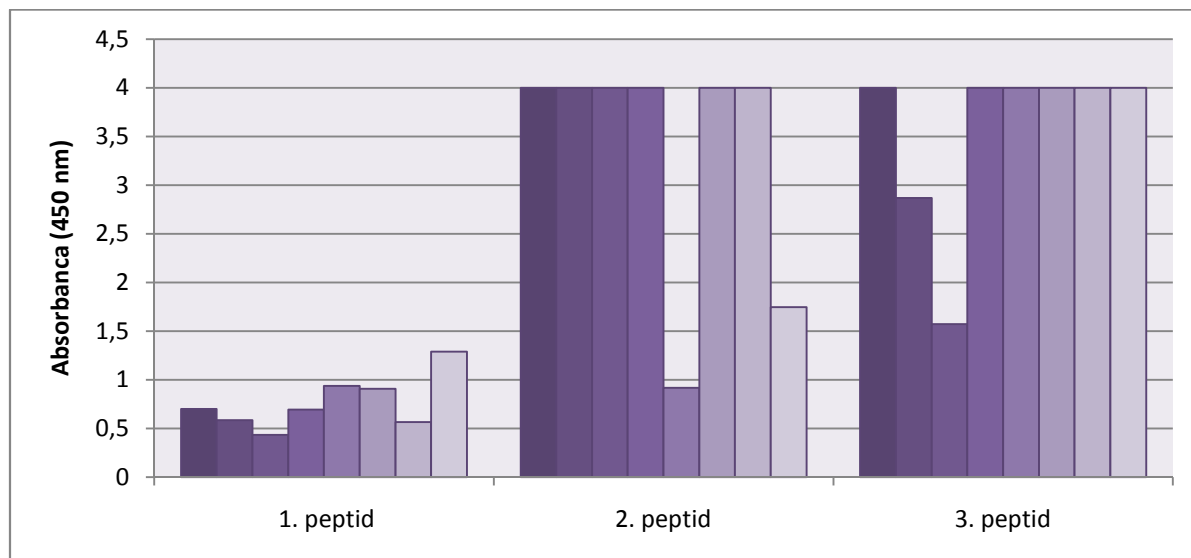
Slika 5: Izmerjene absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo preverjali protitelesni odziv miši po imunizaciji s posameznimi peptidi proregije.

Odziv pri miših, imuniziranih s prvim peptidom je veliko slabši kot pri tistih, ki so bile imunizirane z drugim in tretjim peptidom. Razlog je lahko slabša konjugacija z nosilcem, kar vodi v manjšo imunogenost in s tem manjši odziv. Zelo verjetno je tudi to, da do konjugacije pri prvem peptidu ni prišlo na terminalnem cisteinu, ki smo ga dodali, pač pa na cisteinu, ki je že prisoten v prvem peptidu (Slika 2). Konformacija vbrizganega peptida se je tako najverjetneje razlikovala in proizvedena protitelesa niso prepoznavala peptida v raztopini.

4.1.2 TESTIRANJE HIBRIDOMOV

Z indirektnim testom ELISA smo določili, kateri kloni hibridomov proizvajajo protitelesa z najboljšo afiniteto. Nanesli smo posamezne peptide s koncentracijo 1 µg/mL, nato po 100 µL

gojišč s hibridomi ter končno še sekundarna protimišja protitelesa Ab-HRP, redčena 1/3.000. Za vsak peptid smo določili po osem najboljših klonov.



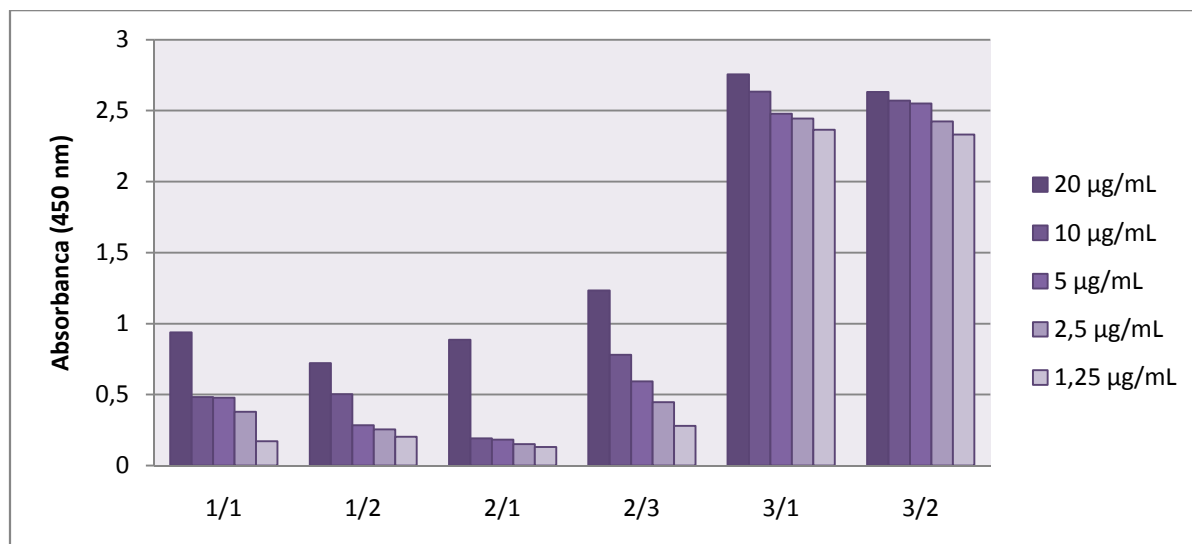
Slika 6: Izmerjene absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo določili hibridome, ki proizvajajo protitelesa z najboljšo afiniteto na posamezne peptide.

Tudi protitelesa, ki jih proizvajajo hibridomske celice, slabše prepoznavajo prvi peptid. Razlogi so najverjetneje enaki, kot pri testiranju koncentracije protiteles v mišjih serumih. Glede na odzive ter število hibridoma celic in njihovo stanje, smo za vsak peptid izolirali protitelesa iz dveh klonov. Tako smo izolirali protitelesa 1/1 in 1/2 proti p#1, protitelesa 2/1 in 2/3 proti p#2, ter protitelesa 3/1 in 3/2 za p#3.

4.1.3 DOLOČANJE AFINITETE VEZAVE IN SPECIFIČNOSTI IZOLIRANIH PROTITELES PROTI PROKATEPSINU X

Določanje jakosti vezave izoliranih protiteles na ustreznih peptid z indirektnim testom ELISA

Z indirektnim testom ELISA smo preverili vezavo izoliranih protiteles na ustrežajoče peptide proregije. Čez noč smo mikrotitersko ploščo prekrili z raztopinami ustrežajočih peptidov proregije z masno koncentracijo 5 $\mu\text{g/mL}$. Izolirana protitelesa smo nanjali v koncentracijah od 20 $\mu\text{g/mL}$ do 1,25 $\mu\text{g/mL}$. Sekundarna, protimišja protitelesa Ab-HRP, smo redčili 1/3.000.



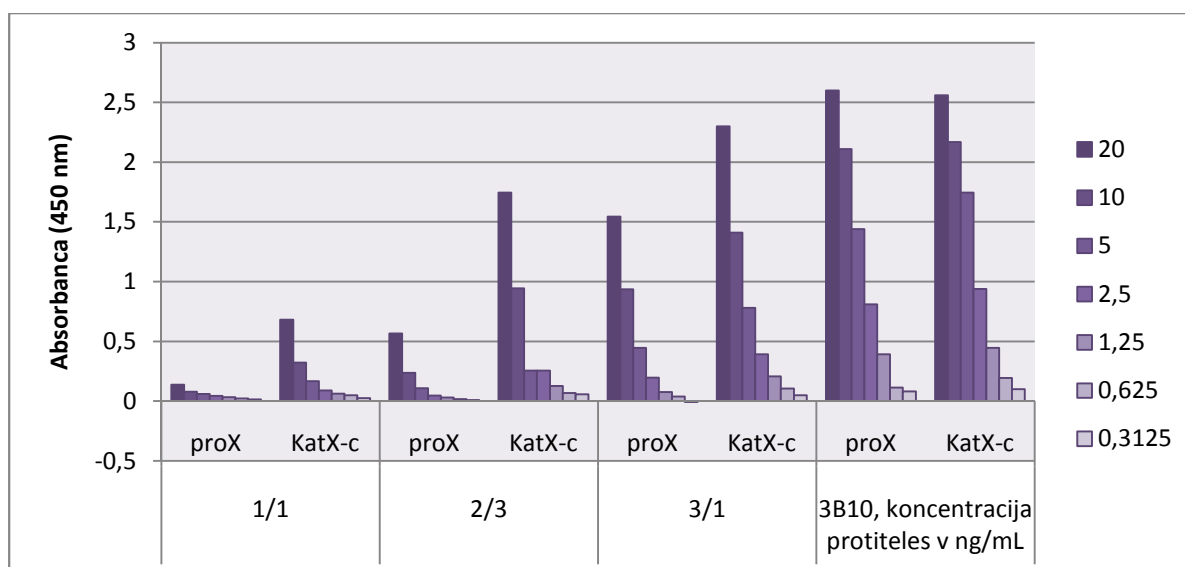
Slika 7: Izmerjene absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo določali jakost vezave izoliranih protiteles na posamezni peptid.

Protitelesa 3/1 in 3/2 proti p#3 najmočneje prepoznavajo ustrezni peptid.

Določanje jakosti vezave protiteles na prokatepsin X in njihove specifičnosti z indirektnim testom ELISA ter primerjava s protitelesi 3B10

Protitelesa 1/1, 2/3 in 3/1, ki so bolje prepoznavala ustrezajoče peptide, smo nato z indirektnim testom ELISA testirali še na prokatepsin X, kot kontrolo specifičnosti pa smo poleg nanесли še aktivni katepsin X v enaki molarni koncentraciji. Koncentracija prokatepsina X je bila 5 µg/mL, koncentracija katepsina X pa 4,60 µg/mL. Koncentracije nanešenih protiteles so bile od 20 µg/mL do 1,25 µg/mL, sekundarna protimišja protitelesa, Ab-HRP, smo redčili 1/3.000.

Vzporedno smo na enak način izvedli indirektni test ELISA še s protitelesi 3B10, ki prepoznavajo celokupni katepsin X, to je tako prokatepsin X, kot aktivni katepsin X. Koncentraciji prokatepsina X in katepsina X sta bili enaki (5 oz 4,60 µg/mL), po optimizaciji smo protitelesa 3B10 nanесли v koncentraciji od 20 ng/mL do 1,0625 ng/mL, kar je 1000-krat manj kot 3/1, saj imajo precej večjo afiniteto vezave na pro- oziroma aktivni katepsin X; s tem smo dosegli linearno območje krivulje. Kot sekundarna smo nanесли protimišja protitelesa Ab-HRP, redčena 1/3000.



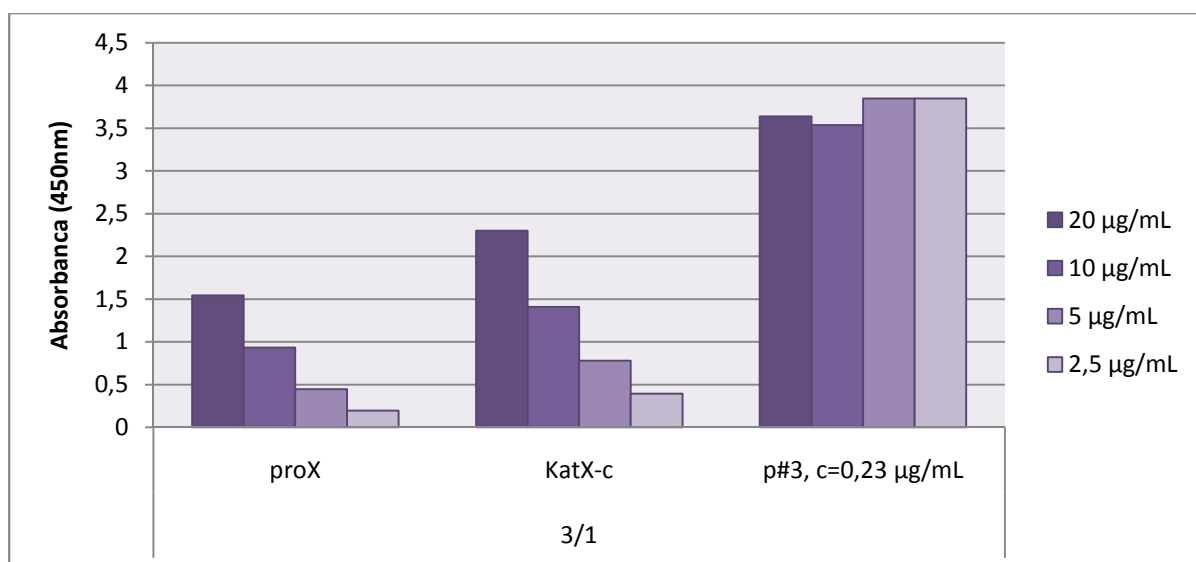
Slika 8: Izmerjene absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo določali jakost vezave izoliranih protiteles 1/1, 2/3 in 3/1 ter protiteles 3B10 na prokatepsin X in katepsin X.

Protitelesa 1/1, 2/3 in 3/1 so prepoznavala obe obliki katepsina X, s tem da so aktivno obliko prepoznavala celo bolje kot proobliko, kar nas je presentilo, saj v strukturi aktivne oblike naj ne bi bilo proregije. Možno je, da je v raztopini aktivnega katepsina X vendarle prisotna tudi proregija, ki je ostala v raztopini po aktivaciji in je najverjetneje še bila vezana na aktivni encim preko disulfidne vezi. V tem primeru je konformacija proregije lahko bolj iztegnjena in s tem bolj podobna peptidom, proti katerim so proizvedena protitelesa, pa tudi verjetno lažje dostopna protitelesom, saj je na aktivni del encima vezana samo na enem delu.

Protitelesa 3B10, kot pričakovano, enako močno prepoznavajo obe obliki katepsina X in imajo večjo afiniteto. V nadaljnih poskusih smo se odločili, da bomo izmed izoliranih monoklonskih protiteles uporabili le protitelesa 3/1, ki so kazala najmočnejšo afiniteto, saj smo sklepali, da bi bili poskusi z veliko slabšimi protitelesi 1/1 in 2/3 manj zanesljivi.

Določanje razlik v vezavi protiteles 3/1 pri enaki molarni koncentraciji prokatepsina X, katepsina X in p#3

Za primerjavo smo izvedli še indirektni test ELISA tako, da smo ploščo prekrili s p#3 v enaki molarni koncentraciji kot prokatepsin X in katepsin X. Koncentracije so bile: proX=5 $\mu\text{g/mL}$; KatX-c= 4,6 $\mu\text{g/mL}$; p#3= 0,23 $\mu\text{g/mL}$. Protitelesa 3/1 smo nanjali v koncentraciji od 20 do 2,5 $\mu\text{g/mL}$, sekundarna protimišja Ab-HRP pa smo redčili 1/3000.



Slika 9: Izmerjene absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo primerjali jakost vezave protiteles 3/1 na enake molarne koncentracije prokatepsina X, katepsina X in 3. peptida.

Protitelesa 3/1 so veliko bolje prepoznavala p#3 kot prokatepsin in aktivni katepsin X. Najverjetneje rahlo spremenjena konformacija proregije zelo vpliva na vezavo protiteles, ki so bila proizvedena proti peptidu p#3. Vzrok za večjo vezavo na peptid je tudi ta, da se približno 18-krat manjši peptidi v primerjavi s prokatepsinom in 15-krat manjši glede na aktivni katepsin X v večjem številu vežejo na mikrotitrsko ploščo.

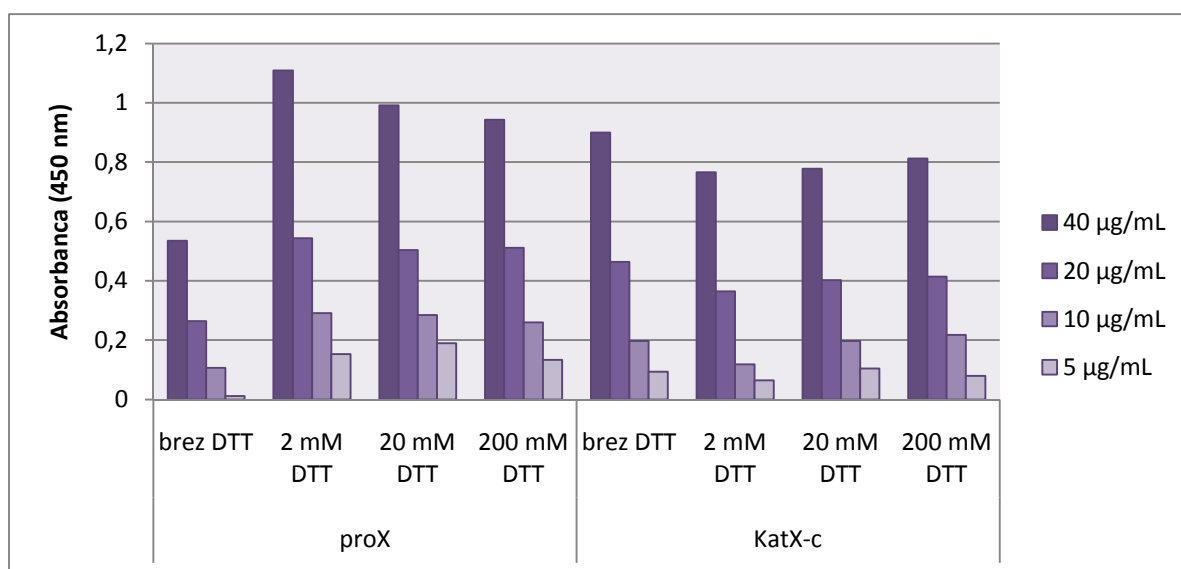
Prekloniranje hibridomov za protitelesa 3/1 in primerjava afinitet na p#3 in proX

V nadaljnjem delu smo s prekloniranjem z metodo omejenega redčenja celic za protitelo 3/1 poskusili pridobiti celične klone, ki bi bolje prepoznavali prokatepsin X. S prekloniranjem smo sicer dobili malenkost boljše klone, a še vedno nismo dosegli dovolj dobrih protiteles za merjenje koncentracij prokatepsina X v nanomolarnem območju. Ob naslednji morebitni selekciji klonov, bi bilo za selekcijo smiselno uporabiti izključno proX, kar pa si zaradi pomanjkanja le-tega v naši študiji nismo mogli privoščiti.

Vpliv dodatka DTT na prepoznavanje prokatepsina X in aktivnega katepsina X s protitelesi 3/1

Z namenom, da bi ugotovili, ali protitelesa 3/1 res prepoznavajo boljše aktivno obliko encima kot proobliko zaradi ugodnejše konformacije proregije, smo proX in KatX-c, za primerjavo pa še p#3 (v enakih koncentracijah kot pri prejšnjem testu ELISA), nanесли na mikrotitrsko ploščico skupaj z različnimi koncentracijami DTT (brez DTT, 2 mM, 20 mM, 200 mM). Pri prejšnjih študijah (78) se je pokazalo, da ob dodatku DTT (kot idealna se je izkazala koncentracija 20 mM), pride do cepitve disulfidne vezi med proregijo in Cys31 v aktivnem

mestu in do aktivacije prokatepsina X brez odcepitve proregije, katera se le »umakne«. Sklepali smo namreč, da bi cepitev disulfidne vezi pro proX najverjetneje povzročila boljše prepoznavanje s strani protiteles 3/1 zaradi bolj iztegnjene konformacije in s tem večje dostopnosti in podobnosti s p#3. Pri KatX-c pa smo pričakovali slabši odziv zaradi steričnih ovir, ki jih povzroča aktivni katepsin X, saj preprečuje dostop protiteles do prostih proregij (če so te res prisotne), ki se ob dodatku DTT odcepijo in samostojno adsorbirajo na ploščico med njimi. Protitelesa 3/1 smo nanесли v koncentracijah od 40 µg/mL do 5 µg/mL, sekundarna protimišja Ab-HRP smo redčili 1/3000.



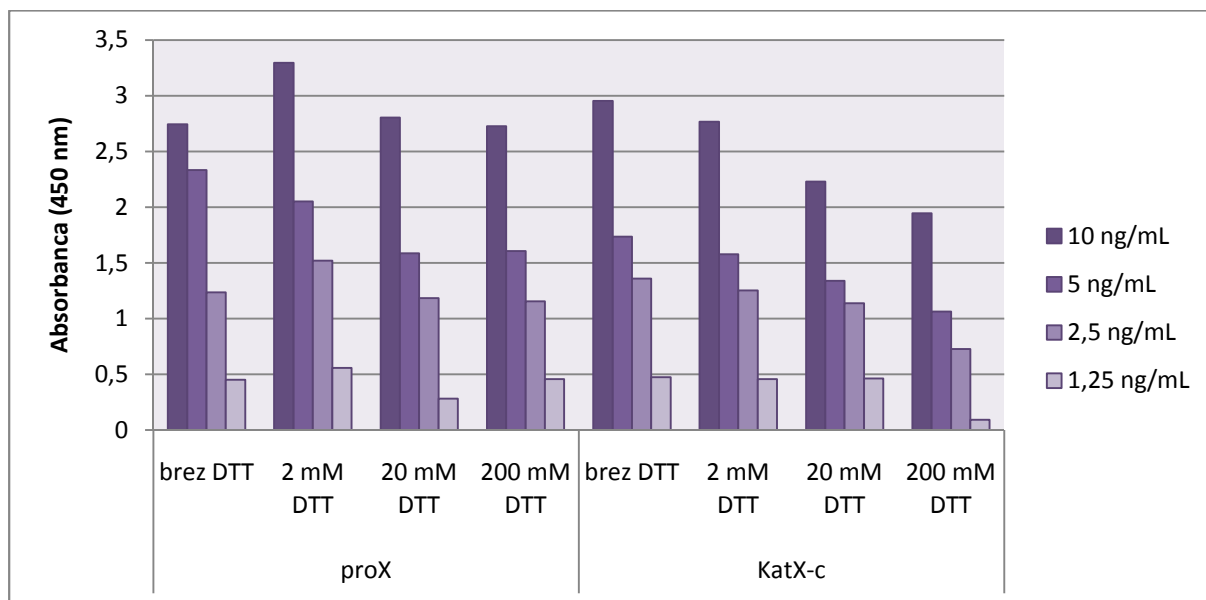
Slika 10: Absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo preučevali vpliv DTT na prepoznavanje prokatepsina X in katepsina X s protitelesi 3/1.

Glede na rezultate so bila naša sklepanja pravilna. Pri proX je dodatek DTT za približno 100% povečal absorbance, najmočneje pri minimalnem dodatku DTT. Pri KatX-c je dodatek DTT komaj opazno zmanjšal absorbance (za približno 15%), vendar razlike niso tako izrazite kot pri proX. Cepitev disulfidne vezi med proregijo in aktivnim katepsinom X najverjetneje povzroči manjšo dostopnost protiteles do proregije, saj se na mikrotitersko ploščico poleg odcepljene proregije veže tudi aktivni katepsin X, ki ovira dostop protitelesom do proregije. Zelo majhne razlike v absorbanci pri KatX-c pa so najverjetneje posledica tega, da je konformacija proregije, vezane na katepsin X, podobna konformaciji proste proregije, vsaj v tistem delu, ki je podoben p#3.

Dodatek DTT k raztopini p#3, kot pričakovano, ni povzročil sprememb v absorbanci. Sklepali smo namreč, da v raztopini p#3 pride do tvorbe medmolekulskih disulfidnih vezi med terminalnimi cisteini, kar pa na prepoznavanje s strani protiteles 3/1 najverjetneje ne vpliva.

Vpliv dodatka DTT na prepoznavanje prokatepsina X in aktivnega katepsina X s protitelesi 3B10

Podobno smo za primerjavo izvedli indirektni test ELISA za protitelesa 3B10. Koncentracija protiteles je bila od 10 ng/mL do 1,25 ng/mL, ostale vrednosti in razredčitve so bile enake.

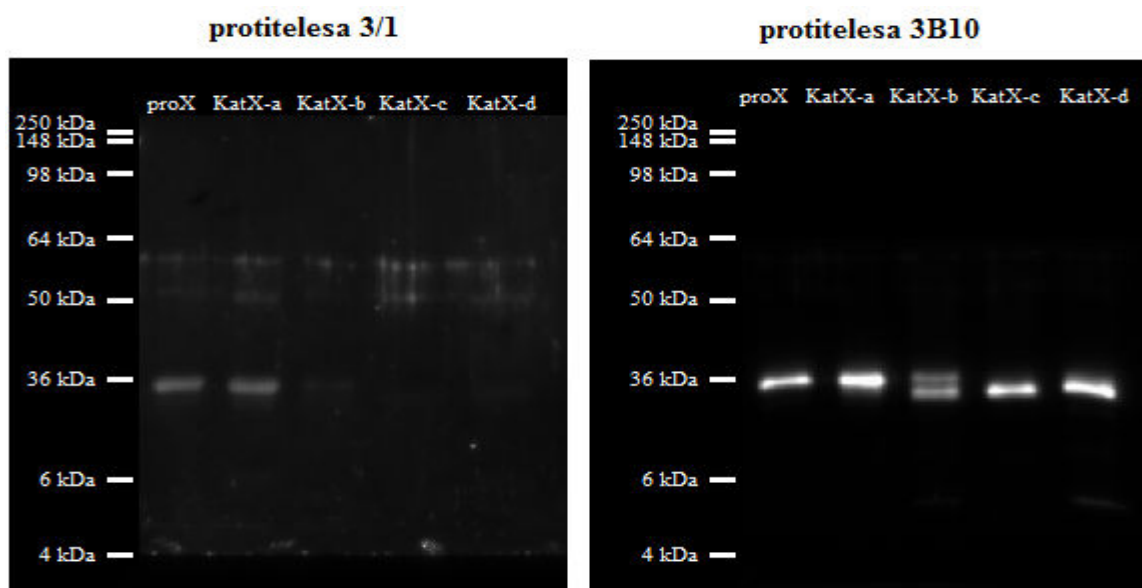


Slika 11: Absorbance pri indirektnem testu ELISA, s katerim smo preučevali vpliv DTT na prepoznavanje prokatepsina X in katepsina X s protitelesi 3B10.

Pri 3B10 se je absorbance pri pro X ob dodatku DTT minimalno povečala, vendar le pri koncentraciji DTT 2mM in sicer za približno 15%, pri višjih koncentracijah pa je bil rezultat enak. Tu cepitev disulfidne vezi med proregijo in aktivnim encimom najverjetneje nima pretiranega vpliva in začetni del proregije najverjetneje ni udeležen v strukturnem epitopu protiteles 3B10, saj bi v nasprotnem primeru signal najverjetneje padel.

Določanje specifičnosti vezave protiteles 3/1 na prokatepsin X z SDS-PAGE in prenosom Western

Specifičnost vezave 3/1 protiteles smo preverjali tudi s SDS-PAGE in prenosom Western. Za primerjavo smo analizirali še protitelesa 3B10.



Slika 12: Določanje specifičnosti vezave protiteles 3/1 in 3B10 na prokatepsin X in katepsin X po SDS-PAGE in prenosu Western; vizualizacija na G-BOXU.

Po redukciji z DTT pri SDS-PAGE ter prenosom na membrano, smo ugotovili, da protitelesa 3/1, sicer precej slabo, prepoznavajo proX in KatX-a, komaj opazno tudi KatX-b. Protitelesa 3B10 so, kot pričakovano, prepoznala vse nanešene oblike, razvidno pa je, da je KatX-a na isti višini (37 kDa), kot proX. Zelo verjetno je, da se med aktivacijo s katepsinom L ni procesiral v aktivno obliko in je najverjetneje še vedno v proobliki. Zaradi tega protitelesa 3/1 najverjetneje prepoznajo tudi KatX-a.

Poleg tega je SDS-PAGE in prenos Western po inkubaciji s protitelesi 3B10 pokazal, da KatX-b ni v celoti v aktivni obliki, pač pa, da je v raztopini prisotna tudi prooblika katepsina X, ki so jo protitelesa 3/1 komaj opazno prepoznala. KatX-c in KatX-d sta aktivni obliki katepsina X, ki ju protitelesa 3/1 ne prepoznavajo. Lise med 50 in 64 kDa so posledica nespecifične vezave protimišjih Ab-HRP, saj smo jih pri protitelesih 3/1 precej manj redčili, kar smo preverili z inkubacijo membrane samo v sekundarnimi protitelesi.

Zaključimo lahko, da naša protitelesa 3/1 specifično prepoznavajo proX, aktivne oblike encima pa ne. Glede na literaturo je to prvi primer izolacije monoklonskih protiteles, ki prepoznavajo izključno prokatepsin X (54).

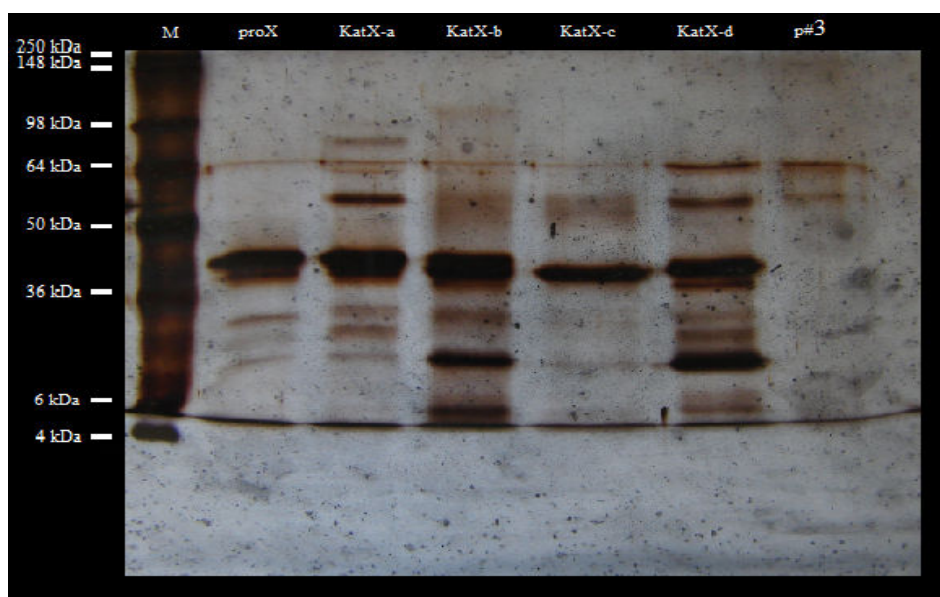
Pričakovali bi, da bodo protitelesa 3/1 prepoznala tudi proregijo z molekulska masa približno 4kDa, katera se po prekinitvi disulfidnih vezi ob dodatku DTT pri SDS-PAGE odcepi od aktivne oblike katepsina X in potuje hitreje, vendar tega pri nobeni obliki aktivnega katepsina X nismo opazili, niti po nanosu večjih količin proteinov na gel in ob inkubaciji pri višji

koncentraciji protiteles 3/1, niti pri povečanju intenzitete osvetlitve (elektroforeza je pri tem potekala le 1h, da odcepljena proregija ne bi oddifundirala iz gela).

Pri predhodnih raziskavah (78) so ugotovili, da protitelesa 3B10 v indirektnem testu ELISA prepoznavajo p#1 in predpostavili, da je 1. del proregije del epitopa, ki ga prepoznavajo protitelesa 3B10. Potemtakem bi morala protitelesa 3B10 (ki imajo 1000-krat večjo afiniteto do katepsina X) prepoznati odcepljeno proregijo, vendar tega, niti ob večjem nanosu proteinov, niti ob povečani intenziteti osvetlitve, nismo zaznali. Zaznali smo sicer dve komaj opazni lisi pri KatX-b in KatX-d, vendar sta bili pri višini približno 5 kDa, pri KatX-c pa lise nismo opazili.

Določanje prisotnosti proregije v raztopini aktivnega katepsina X z SDS-PAGE in barvanjem s srebrom

Da bi ugotovili ali je proregija v raztopini aktivne oblike katepsina X res prisotna in ker tega s prenosom Western ter uporabo protiteles nismo ugotovili, smo membrano po SDS-PAGE barvali s srebrom. Pri tej metodi se nespecifično pobarvajo vsi proteini na membrani. Na gel smo nanесли po 0,5 μg proteinov v enakem zaporedju kot prej, nanесли pa smo tudi 0,5 μg p#3 kot kontrolo ali je detekcija molekul z nižjo molekulsko maso sploh mogoča.



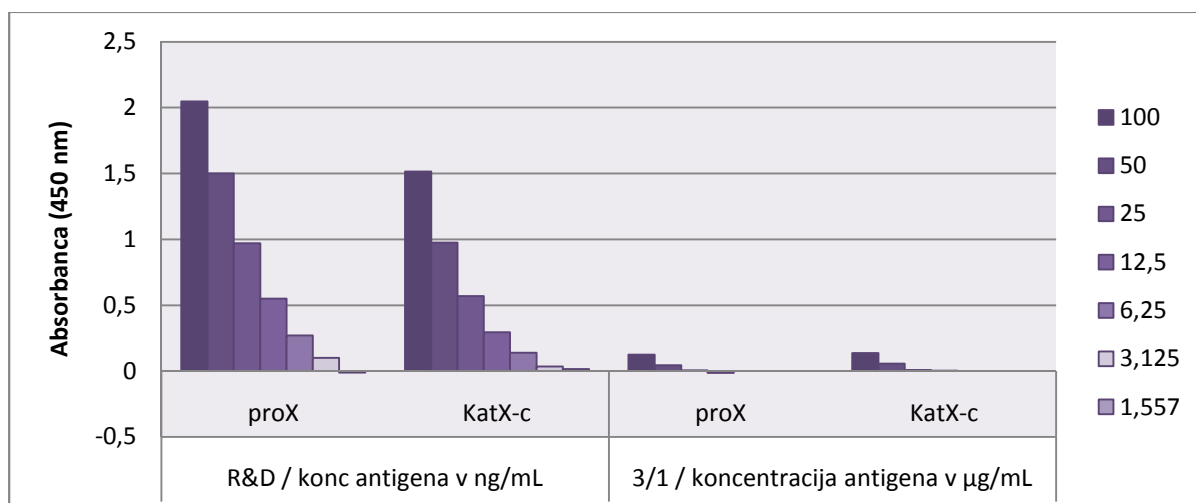
Slika 13: Gel po SDS-PAGE, obarvan s srebrom; določanje prisotnosti proregije v raztopini aktivnega katepsina X.

Ker je elektroforeza potekala manj časa, se prooblike in aktivne oblike katepsina X med sabo niso dobro ločile. Močnejši lisi med 6 in 36 kDa pri KatX-b in KatX-d sta zelo verjetno ostanka lahke verige katepsina L (15 kDa), ki je potreben za aktivacijo katepsina X in ne

proregiji. Nižje pa je mogoče zaznati dve lisi, ki ustrezata proregiji, ni pa lise na isti višini pri KatX-c. Pri p#3 sploh ni mogoče opaziti lise. Možna razlaga bi bila razgradnja proregije oz. peptida zaradi večje občutljivosti na reducent ali interferenca, ki jo povzroča fronta, oziroma »loading buffer«, ki ga dodamo vzorcem, saj je marker za 4 kDa lepo opazen pod fronto, pri vzorcih pa pod fronto ni ničesar. Možno je tudi, da so zelo majhne molekule proregije in še manjši peptidi že takoj po nanosu na gel oddifundirali v elektroforezni pufer. Ali je v raztopini KatX-c res prisotna proregija, ki se preko disulfine vezi drži aktivnega katepsina X, nam torej ni uspelo dokazati.

Določanje uporabnosti protiteles 3/1 v direktnem testu ELISA

Primarni namen izdelave protiteles je bil pridobiti protitelesa, ki bi specifično prepoznavala prokatepsin X, s katerimi bi lahko izvedli meritve v vzorcih z direktnim testom ELISA. Kot že omenjeno, ima prokatepsin najverjetneje večji pomen pri malignih in vnetnih procesih kot aktivna oblika katepsina X. Izvedli smo direktni test ELISA s protitelesi 3/1, kot primerjavo smo enak test izvedli še s protitelesi R&D, ki prepoznavajo vse oblike katepsina X, tudi preproobliko. Protitelesa 3/1 smo na mikrotitersko ploščo, zaradi slabe afinitete na mikrotitersko ploščo nanesli v zelo visoki koncentraciji, in sicer 40 µg/mL, standarde prokatepsina X in katepsina X smo, po številnih optimizacijah, nanesli v zelo visokem prebitku - kar 100 µg/mL, saj smo dobili zelo nizke odzive. R&D protitelesa smo nanesli na ploščo v koncentraciji 2 µg/mL, prokatepsin X in katepsin X pa v koncentracijah od 100 ng/mL do 1,0256 ng/mL (1000-krat nižje koncentracije kot pri protitelesih 3/1. V obeh primerih smo kot sekundarna protitelesa nanesli protitelesa 3B10-HRP, redčena 1/1000.



Slika 14: Izmerjene absorbance pri direktnem testu ELISA, s katerim smo določali uporabnost protiteles 3/1 za merjenje prokatepsina X v bioloških vzorcih in vrednosti primerjali z rezultati, dobljenimi z direktnim testom ELISA z R&D protitelesi.

S protitelesi 3/1 smo dosegli zelo nizko občutljivost, kljub zelo visoki nanešeni koncentraciji tako protiteles, kot antigena. Razlog za to je lahko, poleg slabe afinitete protiteles do antigena, sterično oviranje med protitelesi 3/1 in 3B10, ki mogoče prepoznavajo dva sosednja epitopa na katepsinu oziroma prokatepsinu X in se medsebojno ovirata. S to metodo in protitelesi ne bi detektirali fizioloških in patoloških koncentracij katepsina X v bioloških vzorcih. Direktni test ELISA s primarnimi protitelesi R&D ter 3B10 kot sekundarnimi, pa se je izkazal za dovolj občutljivega.

Zaključimo lahko, da nam ni uspelo proizvesti novih monoklonskih protiteles za test ELISA, ki bi dovolj dobro prepoznal prokatepsin X in ga detektiral in kvantificiral v bioloških vzorcih, kjer se nahaja v zelo majhnih koncentracijah. Za testiranje bioloških vzorcev cistične tekočine smo uporabili direktni test ELISA s kombinacijo protiteles 2F12 ter 3B10 protiteles, ki meri aktivni katepsin X. Za testiranje bioloških vzorcev seruma pa smo uporabili direktni test ELISA s kombinacijo protiteles R&D ter 3B10 protiteles, ki meri celokupni katepsin X, to je prokatepsin X in aktivni katepsin X. Bolje bi bilo, če bi vse vzorce testirali z obema omenjenimi testi, vendar pa si tega, zaradi pomanjkanja protiteles, v naši študiji nismo mogli privoščiti.

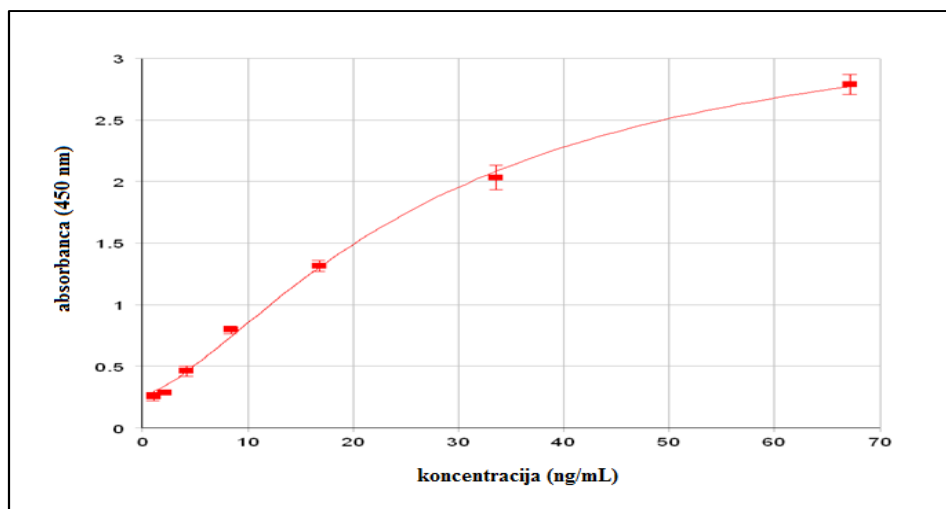
4.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJ KATEPSINA X IN OSTALIH KATEPSINOV TER CISTATINA C V CISTIČNI TEKOČINI RAKA JAJČNIKOV

Z direktnim testom ELISA (poglavje 3.2.8) smo določali koncentracijo katepsinov in cistatina C v vzorcih. Uporabili smo optimizirane teste ELISA, ki jih je razvila skupina prof. dr. Janka Kosa. Za vsak analit smo z optimizacijo metode določili optimalne razredčitve reagentov (poglavje 3.1.1) in pripravili umeritveno krivuljo, s pomočjo katere smo določili koncentracijo katepsinov in cistatina C v vzorcih. Določili smo tudi optimalno redčitev vzorcev; to je tista redčitev, pri kateri večina meritev absorbanc serumskih vzorcev zavzema vrednosti znotraj merilnega območja, določenega na podlagi razredčitvene vrste standardov.

KATEPSIN B

Test smo izvedli z naslednjimi koncentracijami oz. razredčitvami reagentov: primarna protitelesa antiKatB: $c = 5 \mu\text{g/mL}$; standard antigena KatB - redčitvena vrsta $c = 67,2 \text{ ng/mL}$, $33,6 \text{ ng/mL}$, $16,8 \text{ ng/mL}$, $8,4 \text{ ng/mL}$, $4,2 \text{ ng/mL}$, $2,1 \text{ ng/mL}$, $1,05 \text{ ng/mL}$; sekundarna protitelesa, konjugirana z encimom antiKatB-HRP, razredčena s pufrom C 1:2500.

Redčitveno vrsto in vzorce smo na mikrotitersko ploščico nanesti v paralelnih meritvah. Vzorce smo redčili s pufrom C v razmerju 1/16 (en del vzorca in petnajst delov pufru C). Meja detekcije je bila 0,9 ng/mL.

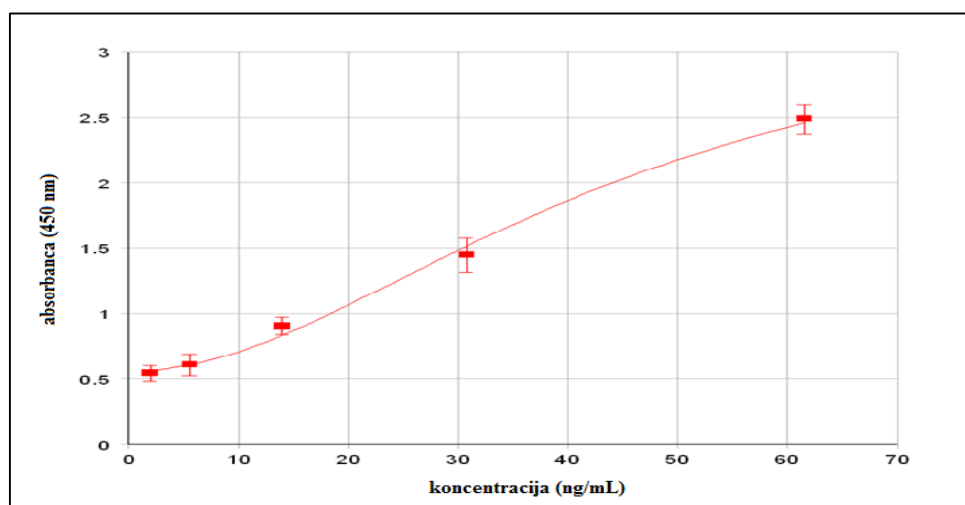


Slika 15: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina B v vzorcih.

KATEPSIN H

Test smo izvedli z naslednjimi koncentracijami oz. razredčitvami reagentov: primarna protitelesa antiKatH: $c = 5 \mu\text{g/mL}$; standard antigena KatH - redčitvena vrsta: $c = 61,6 \text{ ng/mL}$, $30,8 \text{ ng/mL}$, 14 ng/mL , $5,6 \text{ ng/mL}$, $1,96 \text{ ng/mL}$; sekundarna protitelesa, konjugirana z encimom antiKatH-HRP-a, razredčena s pufrom C 1:3000.

Redčitveno vrsto in vzorce smo na mikrotitersko ploščico nanesti v paralelnih meritvah. Vzorce smo redčili s pufrom C v razmerju 1/8 (en del vzorca in sedem delov pufru C); meja detekcije je bila 2 ng/mL.

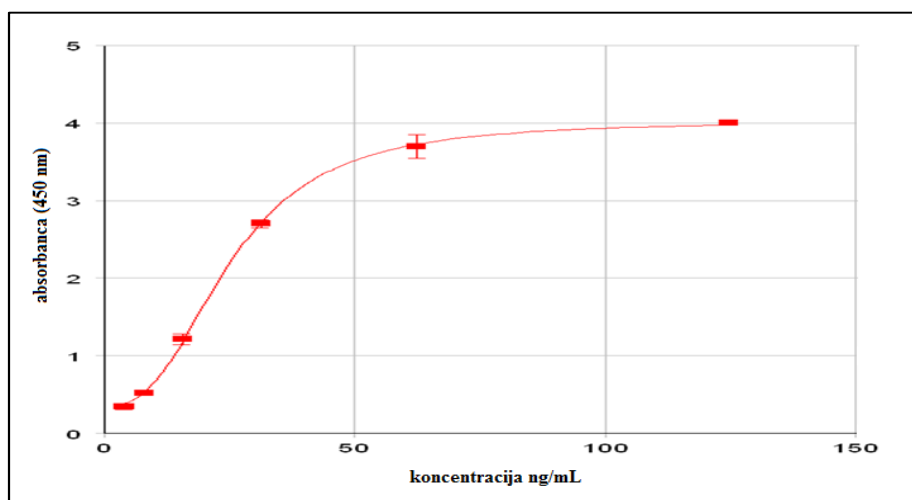


Slika 16: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina H v vzorcih.

KATEPSIN L

Test smo izvedli z naslednjimi koncentracijami oz. razredčitvami reagentov; primarna protitelesa antiKatL: $c = 5 \mu\text{g/mL}$; standard antigena proKatL - redčitvena vrsta: $c = 124,8 \text{ ng/mL}$, $62,4 \text{ ng/mL}$, $31,2 \text{ ng/mL}$, $15,6 \text{ ng/mL}$, $7,8 \text{ ng/mL}$, $3,9 \text{ ng/mL}$; sekundarna protitelesa, konjugirana z encimom antiKatL-HRP, razredčena s pufrom C 1:1500.

Redčitveno vrsto in vzorce smo na mikrotitersko ploščico nanesti v paralelnih meritvah. Vzorce smo redčili s pufrom C v razmerju 1/4 (en del vzorca in trije deli pufru C); meja detekcije je bila $1,7 \text{ ng/mL}$.

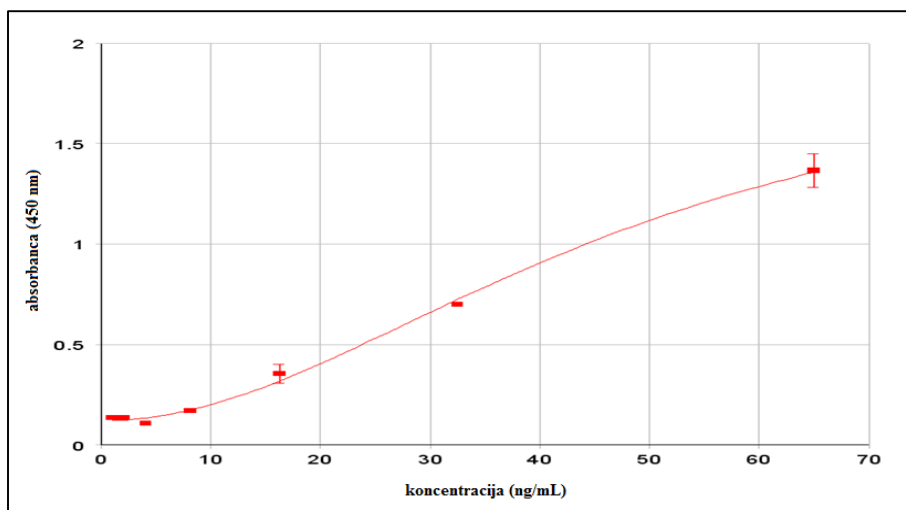


Slika 17: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina L v vzorcih.

AKTIVNI KATEPSIN X

Test smo izvedli z naslednjimi koncentracijami oz. razredčitvami reagentov: primarna (nevtralizacijska) protitelesa 2F12: $c = 5 \mu\text{g/mL}$; standard antigena KatX-b - redčitvena vrsta: $c = 65,0 \text{ ng/mL}$, $32,5 \text{ ng/mL}$, $16,25 \text{ ng/mL}$, $8,125 \text{ ng/mL}$, $4,06 \text{ ng/mL}$, $2,03 \text{ ng/mL}$, $1,016 \text{ ng/mL}$; protitelesa, konjugirana z encimom RB10-HRP, razredčena s pufrom C 1:1000.

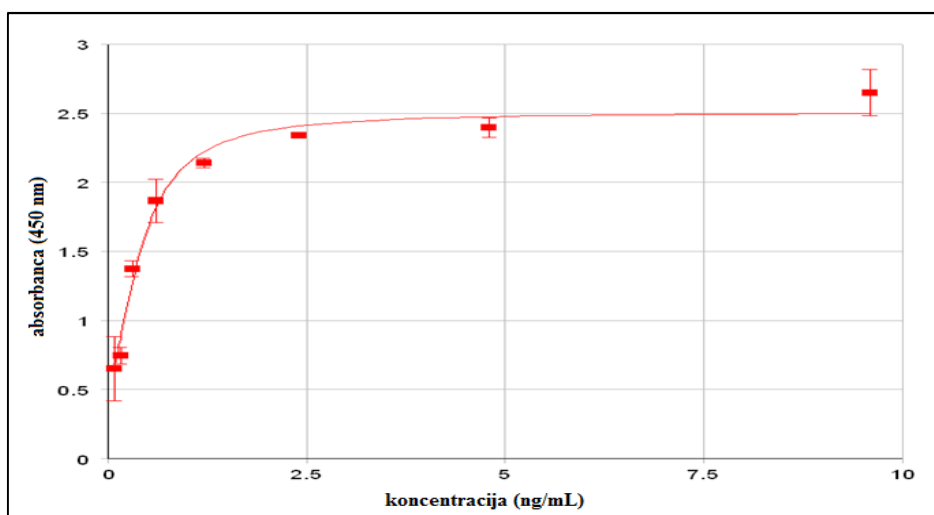
Redčitveno vrsto in vzorce smo na mikrotitersko ploščico nanesti v paralelnih meritvah. Vzorce smo redčili s pufrom C v razmerju 1/2 (en del vzorca in en del pufru C); meja detekcije je bila 2 ng/mL .



Slika 18: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina X v vzorcih.

CISTATIN C

Test smo izvedli z naslednjimi koncentracijami oz. razredčitvami reagentov: primarna protitelesa antiCysC: $c = 5 \mu\text{g/mL}$; standard antigena CysC - redčitvena vrsta: $c = 9,6 \text{ ng/mL}$, $4,8 \text{ ng/mL}$, $2,4 \text{ ng/mL}$, $1,2 \text{ ng/mL}$, $0,6 \text{ ng/mL}$, $0,3 \text{ ng/mL}$, $0,15 \text{ ng/mL}$, $0,075 \text{ ng/mL}$; sekundarna protitelesa, konjugirana z encimom antiCysC-HRP, razredčena s pufrom C 1:500. Redčitveno vrsto in vzorce smo na mikrotitersko ploščico nanesli v paralelkah. Vzorce smo redčili s pufrom C v razmerju 1/100 (en del vzorca in 99 delov puфра C); meja detekcije je bila $0,6 \text{ ng/mL}$.



Slika 19: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije cistatina C v vzorcih.

4.2.1 STATISTIČNA ANALIZA MERITEV

Kot omenjeno v poglavju 3.2.8, smo koncentracije vzorcev določili s pomočjo standardov znanih koncentracij, ki smo jih nanašali v paralelkah. Izmerjene koncentracije so znašale od 85 do 104% vrednosti pričakovanih koncentracij. Koefficient variance znotraj posamezne plošče je bil med 5,6 in 11,6%, med ploščami pa med 8,5% in 14,5% (81). Vse izmerjene vrednosti se nahajajo v PRILOGI 1.

Vrednosti katepsinov B, H, L, X in cistatina C ter njihova povezanost s klinično-patološkimi spremenljivkami

Mediane (25. - 75. percentil) koncentracij katepsinov B, H, L, X in cistatina C so bile 97 (42-203), 18 (12-32), 61 (37-108), 20 (13-47), 657 (501-805).

Tabela XIV: Povezava med medianami (25.-75. percentil) koncentracij katepsinov H, B, L in X ter cistatina C (ng/mL) v cistični tekočini in klinično-patološkimi značilnostmi bolnic; statistična značilnost je za katepsine B, H in L definirana glede na test ANOVA in Studentov t-test, za katepsin X in cistatin C pa so bile vrednosti še dodatno normalizirane z Ln transformacijo.

značilnost		katepsin B	katepsin H	katepsin L	katepsin X	cistatin C
starost		p = 0,049	p = 0,931	p = 0,950	p = 0,403	p = 0,673
	< mediana	64 (32-159)	19 (11-32)	67 (16-110)	21 (13-40)	640 (501-805)
	≥ mediana	126 (60-251)	18 (12-29)	54 (40-104)	19 (11-49)	663 (491-805)
histologija		p = 0,791	p = 0,055	p = 0,485	p = 0,329	p = 0,037
	serozni	86 (48-234)	18 (12-24)	66 (45-116)	19 (6-46)	640 (561-804)
	mucinski	55 (23-196)	30 (12-62)	85 (1-108)	20 (16-45)	531 (296-805)
	endometroidni	80 (25-162)	16 (1-36)	46 (1-89)	20 (10-58)	811 (594-1079)
stadij FIGO		p = 0,087	p = 0,654	p = 0,502	p = 0,913	p = 0,415
	I	53 (21-164)	15 (9-51)	61 (1-109)	19 (14-39)	728 (350-822)
	≥ II	115 (61-246)	18 (15-28)	61 (40-108)	20 (11-50)	645 (516-762)
diferenciacija		p = 0,545	p = 0,059	p = 0,678	p = 0,266	p = 0,071
	dobra (1)	45 (22-203)	25 (11-59)	67 (1-115)	21 (17-43)	501 (287-805)
	srednja (2) slaba (3)	99 (45-212)	18 (12-26)	57 (36-93)	19 (10-49)	665 (541-806)
velikost tumorja po operaciji		p = 0,802	p = 0,373	p = 0,554	p = 0,484	p = 0,591
	< 1 cm	94 (38-214)	18 (11-30)	64 (40-111)	20 (12-48)	650 (491-805)
	≥ 1 cm	98 (54-236)	21 (18-46)	62 (27-80)	20 (17-42)	652 (540-798)

Katepsin B je bil značilno povišan pri bolnicah, starejših od 57 let ($p = 0,049$). Koncentracije cistatina C so se med različnimi histološkimi podtipi značilno razlikovale in so bile najvišje pri endometroidnem podtipu ($p = 0,037$). Koncentracija katepsina H je bila rahlo višja pri bolnicah z mucinskim histološkim podtipom ($p = 0,055$) ter pri bolj diferenciranih tumorjih ($p = 0,059$), vendar ne statistično značilno.

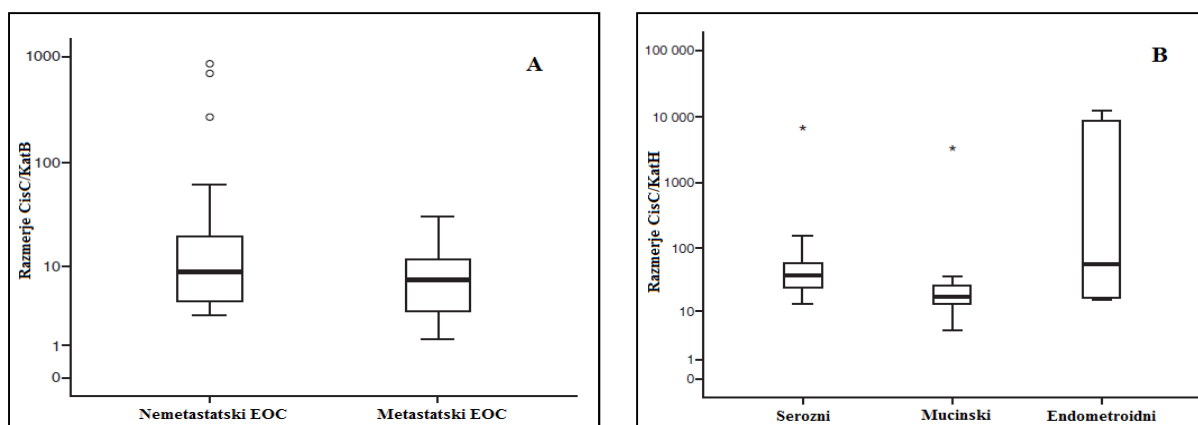
Razmerja med cistatinom C in katepsini ter njihova povezanost s klinično-patološkimi spremenljivkami

Mediane (25.-75. percentil) razmerij med cistatinom C in katepsini B, H, L in X so 7 (3-13), 28 (17-56), 10 (7-21) in 30 (13-54).

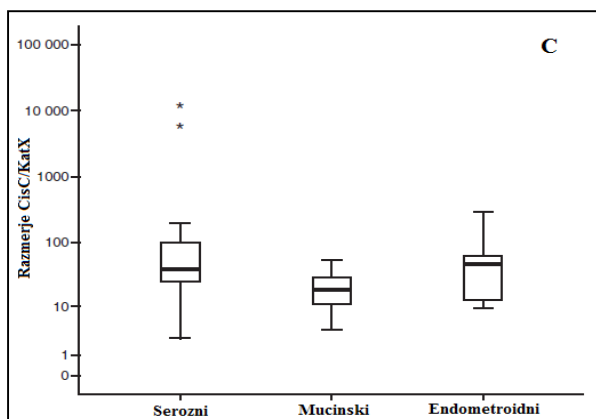
Tabela XV: Povezave med medianami (25.-75. percentil) razmerij cistatina C (cisC) in katepsinov (kat) cistični tekočini ter klinično-patološkimi spremenljivkami.

značilnost		cisC/katB	cisC/katH	cisC/katL	cisC/katX
starost		p = 0,07	p = 0,691	p = 0,635	p = 0,517
	< mediana	10 (4-17)	26 (17-61)	11 (7-63)	30 (13-54)
	≥ mediana	6 (3-11)	36 (18-55)	10 (7-21)	32 (13-56)
histologija		p = 0,717	p = 0,012	p = 0,216	p = 0,035
	serozni	9 (3-16)	38 (14-90)	10 (7-17)	40 (24-138)
	mucinski	6 (3-13)	17 (13-27)	17 (5-150)	19 (10-30)
	endometroidni	10 (4-261)	70 (16-9433)	15 (9-993)	47 (12-122)
stadij FIGO		p = 0,025	p = 0,890	p = 0,579	p = 0,867
	I	9 (4-26)	28 (14-90)	12 (7-238)	25 (12-50)
	≥ II	7 (3-12)	30 (21-52)	10 (7-20)	32 (13-56)
stopnja diferenciacije		p = 0,742	p = 0,031	p = 0,414	p = 0,039
	dobra (1)	7 (3-13)	18 (12-33)	8 (5-194)	20 (10-30)
	srednja (2) + slaba (3)	8 (3-15)	36 (21-62)	10 (8-21)	37 (13-70)
velikost tumorja po operaciji		p = 0,871	p = 0,482	p = 0,465	p = 0,808
	< 1 cm	8 (3-13)	27 (17-61)	10 (7-20)	30 (13-54)
	≥ 1 cm	6 (3-16)	29 (18-36)	11 (9-25)	82 (17-40)

Razmerje cisC/katB je bilo značilno nižje ($p = 0,025$) pri bolnicah v višjih stadijih FIGO (\geq II), kar pomeni, da je razmerje večje pri nemetastatskem epitelijskem ovarijskem karcinomu kot pri metastatskem. Razmerji cisC/katH in cisC/katX se statistično značilno razlikujeta ($p = 0,012$ in $p = 0,035$) med različnimi histološkimi podtipi in sta najnižji pri mucinskem podtipu. Značilno višji sta pri slabo diferenciranih tumorjih ($p = 0,031$ in $p = 0,039$).



Slika 20: A: razlika v razmerjih CisC/KatB med bolnicami z metastatskim tipom ($n=20$) in nemetastatskim ($n=30$) EOK; $p = 0,025$. B: razlika v razmerjih CisC/KatH med bolnicami s seroznim ($n=23$), mucinoznim ($n=14$) in endometroidnim ($n=6$) tipom EOK; $p = 0,012$.



Slika 21: C: razlika v razmerjih CisC/KatX pri bolnicah s seroznim (n=23), mucinoznim (n=14) in endometroidnim (n=6) tipom EOK; p=0,035.

Katepsini in cistatin C kot napovedni dejavniki preživetja bolnic z ovarijskim rakom

Tabela XVI: Univariantna analiza katepsinov B, H, L, X, cistatina C in drugih potencialnih pokazateljev preživetja do ponovnega pojava bolezn pri ovarijskem raku.

	mediana	relativna rizičnost	95% interval zaupanja	vrednost p
starost	57 let	1,5	(0,65-3,42)	0,345
histologija	serozni	5,36	(1,20-23,89)	0,028
	mucinski	1		
	endometroidni	1,31	(0,12-14,34)	0,827
FIGO	stadij I	1		
	stadij \geq II	85	(2,44-2961)	0,014
diferenciacija	dobra (1)	1		
	slaba (2+3)	59,9	(1,13-3162)	0,043
velikost tumorja po operaciji	< 1 cm	1		
	\geq 1 cm	5,63	(2,15-14,76)	< 0,001
CA125 v serumu pred operacijo	126 U/mL	2,66	(1,04-6,85)	0,042
KatB (CT)	97 ng/mL	1,29	(0,56-2,95)	0,551
KatH (CT)	18 ng/mL	1,17	(0,51-2,67)	0,707
KatL (CT)	61 ng/mL	1,03	(0,45-2,33)	0,952
KatX (CT)	20 ng/mL	1,16	(0,51-2,64)	0,722
CisC (CT)	657 ng/mL	1,38	(0,59-3,21)	0,448
CisC/KatB (CT)	7	1,13	(0,49-2,60)	0,771
CisC/KatH (CT)	28	1,19	(0,52-2,73)	0,68
CisC/KatL (CT)	10	1,14	(0,50-2,59)	0,759
CisC/KatX (CT)	30	1,95	(0,82-4,66)	0,132

Vrednosti cistatina C in katepsinov ter njihovih razmerij smo porazdelili na vrednosti nižje od mediane ter vrednosti višje od mediane. Z upoštevanjem 95% intervala zaupanja in uporabo univariantne analize, smo določili stopnjo tveganja za ponoven pojav bolezn. Noben izmed katepsinov ali razmerja med cistatinom C in katepsini, se niso izkazali kot značilni napovedni dejavniki preživetja brez pojava bolezn, kot značilni pa so se izkazali ostali klinični in patološki pokazatelji, med katerimi je najbolj relevantna velikost rezidualnega tumorja po operaciji.

Naša študija je bila enojno slepa in retrospektivna. Sklepali smo, da rakave celice izločajo v cistično tekočino mnoge presnovke in encime, med katerimi so tudi katepsini. Izmerili smo

visoke koncentracije katepsinov B, H, L in X ter cistatina C, kar našo predpostavko tudi potrjuje. Naša hipoteza je bila, da je nesorazmerje med katepsini in njihovim endogenim inhibitorjem cistatinom C odgovorno za progresijo in metastaziranje epiteljskega ovarijskega karcinoma (EOK), kar potrjujejo tudi številne študije, kjer so proučevali razmerje med katepsinom B in cistatinom C pri rakavih bolnikih in nerakavih kontrolah (56,60,76,77).

Razmerje CisC/KatB v cistični tekočini je bilo značilno nižje pri višjih stadijih ovarijskega raka v primerjavi z začetnimi lokaliziranimi tumorji in je najverjetneje povezano z metastatskim potencialom tumorja. Znižana koncentracija cistatina C ne uspe zavirati povečane aktivnosti cisteinskih katepsinov pri malignih procesih, poleg tega pa je tudi sposobnost vezave na katepsine najverjetneje slabša zaradi manjše afinitete, kar prepreči njihovo inhibicijo. Tudi pri drugih vrstah raka so izmerili nižje razmerje CisC/KatB pri bolnikih z metastazami v primerjavi z bolniki v zgodnejših stadijih (60,76,77). V podobno izvedeni študiji, kjer so izmerili višje vrednosti katepsina B v cistični tekočini malignih seroznih tumorjih kot v benignih, so opazili tudi visoko povezanost s cistatinom C, ki se je dodatno zvišal (56), kar najverjetneje kaže njegovo slabšo možnost inhibicije. Tudi razmerje CisC/KatB bi lahko bilo uporabno za raziskovanje same agresivnosti in napredovanja EOK, vendar niti koncentracija katepsina B niti razmerje s cistatinom C ni povezano s celokupnim preživetjem bolnic do ponovitve bolezni.

Razlike v vrednostih katepsina L se niso izkazale kot značilne, kar nas je presentilo, saj so v podobno izvedeni študiji v različnih histoloških podtipih izmerili nasprotno (56); slednje le še potrjuje, da so potrebne še dodatne študije na obsežnejših skupinah bolnic z različnimi vrstami ovarijskega raka.

Razmerji CisC/KatX in CisC/KatH sta bili značilno nižji pri mucinskem histološkem podtipu EOK ter pri dobro diferenciranih tumorjih v primerjavi z drugimi histološkimi podtipi in slabo diferenciranimi tumorji. Za to povezavo je najverjetneje vzrok, da je bilo 92,3% dobro diferenciranih tumorjev mucinskega tipa, slabo diferencirani pa so bili seroznega ali endometroidnega podtipa. Katepsin H je bil precej bolj izražen pri mucinskem tipu EOC, in je bil mejno značilno nižji pri slabo diferenciranih tumorjih. Naši rezultati se ujemajo z ugotovitvami, da je katepsin H pri različnih vrstah raka bodisi povišan ali znižan (80). Koncentracije katepsina H in cistatina C, niti njuno razmerje niso povezani s celokupnim preživetjem bolnic do ponovitve bolezni.

Sprva so menili, da je katepsin X večinoma udeležen v regulaciji imunskega odziva in ne v razgradnji zunajceličnega matriksa. Povečano izražanje v tumorjih večinoma povezujejo z večjo invazivnostjo celic, najverjetneje preko mehanizma aktivacije integrinov (24). Sklepajo

pa, da je najverjetneje udeležen v zgodnejših fazah napredovanja raka in manj v poznejših fazah, kot je metastaziranje (26). V cistični tekočini smo izmerili približno 10-krat višje vrednosti katepsina X, kot so jo izmerili v serumu rakavih bolnikov (52), kar kaže, da se katepsin X iz rakavih celic sprošča v cistično tekočino. Katepsin X, še bolj kot tumorske celice, izločajo imunske celice, infiltrirane v tumorskem tkivu, ki ga ob aktivaciji še bolj pospešeno izločajo v aktivni, še bolj pa v prekuzorski obliki. Vrednosti aktivnega katepsina X se niso razlikovale med različno starimi bolniki, histološkimi podtipi, stadiji, stopnjami diferenciacije ali glede na velikost rezidualnega tumorja.

Razmerje CisC/KatX se ni bistveno razlikovalo glede na starost bolnikov, stadij FIGO ter velikost rezidualnega tumorja. So pa bile vrednosti, kot že prej omenjeno, nižje pri mucinskem tipu, ter pri bolj diferenciranih tumorjih, kar je, podobno kot pri katepsinu H, povezano z boljšo prognozo in bi bilo lahko uporabno pri načrtovanju terapije. Vendar pa je ta povezava precej vprašljiva, saj cistatin C precej slabše inhibira katepsin X kot ostale katepsine (33). Katepsin X je udeležen tudi v procesih protitumorskega imunskega odziva (20), zaradi česar ima pri raku lahko protektivno vlogo. Preživetvena analiza v tej študiji ni razjasnila protektivne ali spodbujajoče vloge aktivnega katepsina X pri raku, saj nismo opazili povezanosti s preživetjem bolnic do ponovnega pojava bolezni.

Različne vrednosti katepsinov pri različnih kliničnopatoloških parametrih, kot je na primer histološki podtip, bi lahko bile v pomoč pri razumevanju razvoja in progresije EOK. Potrebno bi bilo izvesti študijo na večji in čimbolj heterogeni skupini bolnic, da bi lahko bolje opredelili vlogo posameznih katepsinov in cistatina C pri ovarijskem raku, najboljše ob sočasnem merjenju vrednosti tako v cistični tekočini kot v serumu, s čimer bi pridobili veliko več informacij o samem poteku bolezni. Poleg tega bi bilo bolj smiselno izmeriti vrednosti tudi prokatepsina X ali vsaj vrednosti celokupnega katepsina X (to je prokatepsina X in katepsina X), glede na to, da imunske celice, infiltrirane med tumorsko tkivo najverjetneje pospešeno izločajo predvsem prokatepsin X.

4.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJ KATEPSINA X IN OSTALIH KATEPSINOV V SERUMU BOLNIKOV S KOLOREKTALNIM RAKOM IN KONTROLNIH SKUPINAH

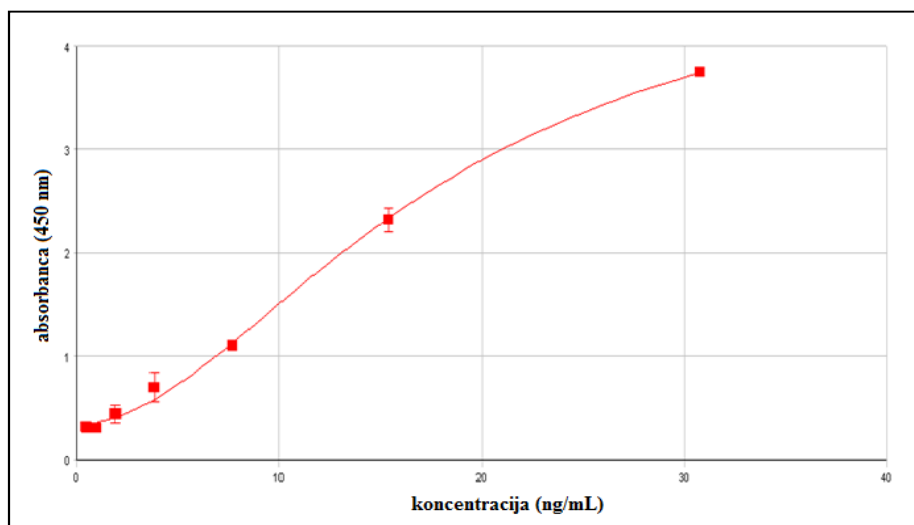
Tudi vrednosti omenjenih katepsinov v serumih smo določali z direktnimi testi ELISA (poglavje 3.2.8), ki jih je razvila skupina prof. dr. Janka Kosa. Teste smo optimizirali za določanje serumskih vrednosti podobno kot pri cističnih tekočinah.

Vse izmerjene vrednosti se nahajajo v PRILOGI 2.

KATEPSIN H

Test smo izvedli z naslednjimi koncentracijami oz. razredčitvami reagentov: primarna protitelesa antiKatH: $c = 5 \mu\text{g/mL}$; standard antigena KatH - redčitvena vrsta: $c = 30,8 \text{ ng/mL}$, $15,4 \text{ ng/mL}$, $7,7 \text{ ng/mL}$, $3,85 \text{ ng/mL}$, $1,925 \text{ ng/mL}$, $0,9625 \text{ ng/mL}$, $0,4813 \text{ ng/mL}$; protitelesa, konjugirana z encimom antiKatH-HRP-b, razredčena s pufrom C 1:2000.

Vzorci smo redčili s pufrom C v razmerju 1/2 (en del vzorca in en del pufru C). Redčitveno vrsto standardov smo na mikrotitersko ploščico nanašali v paralelkah; meja detekcije je bila 2 ng/mL .

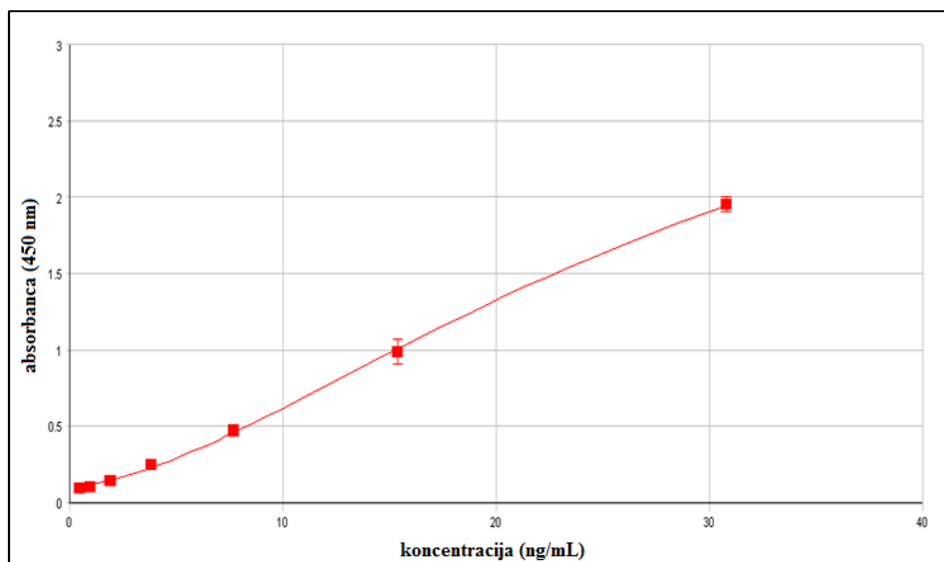


Slika 22: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina H v vzorcih.

KATEPSIN S

Test smo izvedli z naslednjimi koncentracijami oz. razredčitvami reagentov: primarna protitelesa antiKatS: $c = 5 \mu\text{g/mL}$; standard antigena proKatS - redčitvena vrsta: $c = 30,8 \text{ ng/mL}$, $15,4 \text{ ng/mL}$, $7,7 \text{ ng/mL}$, $3,85 \text{ ng/mL}$, $1,925 \text{ ng/mL}$, $0,9625 \text{ ng/mL}$, $0,4813 \text{ ng/mL}$; protitelesa, konjugirana z encimom antiKatS-HRP, razredčena s pufrom C 1:9000.

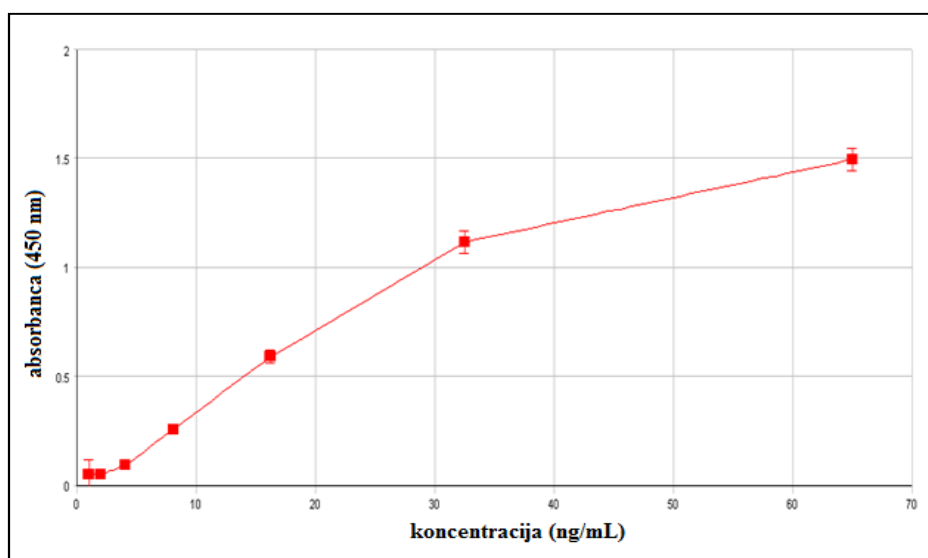
Vzorci smo redčili s pufrom C v razmerju 1/2 (en del vzorca in en del pufru C). Redčitveno vrsto standardov smo na mikrotitersko ploščico nanesli v paralelkah; meja detekcije je bila 4 ng/mL .



Slika 23: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije katepsina S v vzorcih.

CELOKUPNI KATEPSIN X

Test smo izvedli z naslednjimi koncentracijami oz. razredčitvami reagentov: primarna protitelesa R&D: $c = 5 \mu\text{g/mL}$, nanos po $50 \mu\text{L/luknjico}$; standard antigena proX - redčitvena vrsta: $c = 65,0 \text{ ng/mL}$, $32,5 \text{ ng/mL}$, $16,25 \text{ ng/mL}$, $8,125 \text{ ng/mL}$, $4,06 \text{ ng/mL}$, $2,03 \text{ ng/mL}$, $1,016 \text{ ng/mL}$; sekundarna konjugirana z encimom 3B10-HRP, razredčena s pufrom C 1:1000. Redčitveno vrsto standardov smo na mikrotitersko ploščico nanесли v paralelkah. Vzorce smo redčili s pufrom C v razmerju 1/2 (en del vzorca in en del puфра C); meja detekcije je bila 2 ng/mL .



Slika 24: Standardna krivulja, ki smo jo uporabili pri določanju koncentracije celokupnega katepsina X v vzorcih.

4.3.1 STATISTIČNA ANALIZA MERITEV

Kot omenjeno v poglavju 3.2.8, smo koncentracije vzorcev določili s pomočjo standardov znanih koncentracij, ki smo jih nanašali v paralelkah. Izmerjene koncentracije so znašale od 81 do 109% vrednosti pričakovanih koncentracij. Koefficient variance znotraj posamezne plošče je bil med 1,2 in 18,4% (upoštevane so samo vrednosti standardov, saj vzorcev nismo nanašali v paralelkah), med ploščami pa med 1,2 in 8,8% (81).

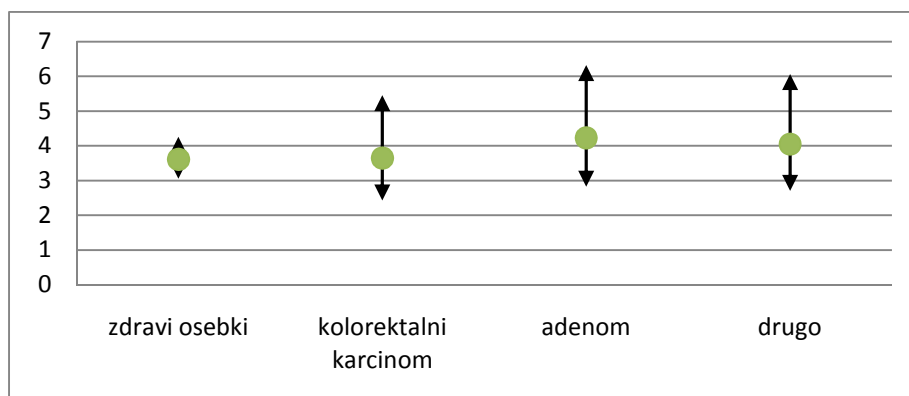
Tabela XVII: Primerjava izmerjenih vrednosti Katepsinov X, S in H med posameznimi skupinami vzorcev.

skupina	število opazovanih	analit	število	mediana	minimum	maksimum	povprečna vrednost	standardna deviacija
kolorektalni karcinom	77	katx	77	16,26	5,86	40,37	17,37	6,99
		kats	77	15,78	5,98	40,08	16,56	5,78
		kath	77	2,79	1,99	19,64	4,72	4,04
adenom	77	katx	77	17,12	4,06	39,96	17,78	6,47
		kats	77	15,37	7,07	42,99	16,45	5,66
		kath	77	4,01	1,45	26,66	5,69	4,92
drugo	77	katx	77	17,39	2,00	61,49	18,45	8,70
		kats	77	14,83	1,53	33,86	15,78	5,52
		kath	77	3,67	1,43	52,34	5,72	6,68
zdravi osebki	77	katx	77	17,12	5,36	99,52	18,69	11,39
		kats	77	15,58	2,01	61,60	16,53	7,58
		kath	77	2,00	1,24	39,70	5,20	5,91

KATEPSIN H

Tabela XVIII: Mediane in intervali zaupanja za vrednosti Katepsina H glede na skupino zdravih osebkov.

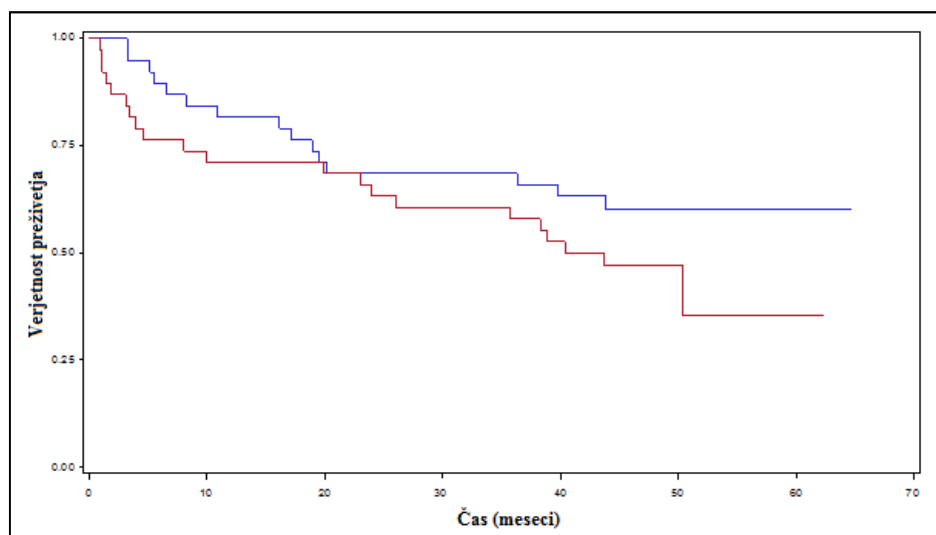
skupina	mediana	razlika v % glede na zdrave osebke	95% interval zaupanja (primerjava z zdravimi osebki)
zdravi osebki	3,61		3,05-4,26
kolorektalni karcinom	3,65	1,1% višji	2,43-5,46 (20,2 nižji-28,2% višji)
adenom	4,23	17,1% višji	2,82-6,32 (7,4% nižji-48,4% višji)
drugo	4,05	12,2% višji	2,70-6,07 (11,4% nižji-42,4% višji)



Slika 25: Prikaz median posameznih skupin ter območje vrednosti koncentracij Katepsina H v vzorcih v v intervalu s 95% zaupanjem.

Vrednost $p(\text{tip III})=0,48$, kar pomeni, da se vrednosti skupin bolnikov s kolorektalnim karcinomom, adenomom in drugimi boleznimi statistično značilno ne razlikujejo od vrednosti skupine zdravih osebkov.

Kaplan-Meierjeva ali preživetvena krivulja prikazuje porazdelitev median in njihov pomen pri času preživetja bolnikov.



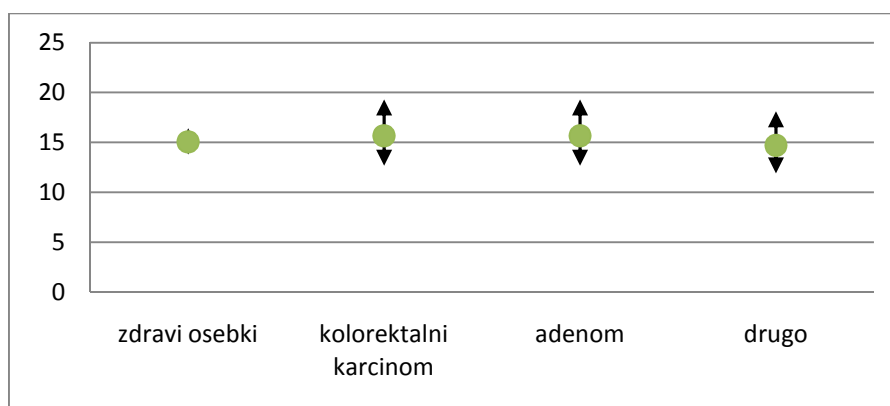
Slika 26: Kaplan-Meierjeva krivulja prikazuje povezavo med koncentracijami katepsina H in verjetnostjo preživetja bolnikov. Rdeča barva pomeni vrednosti katepsina H, ki so višje od mediane, modra pa vrednosti, ki so nižje od mediane.

Vrednost $p=0,12$, kar pomeni da višje vrednosti katepsina H v serumu bolnikov s kolorektalnim rakom niso povezane s prognozo bolezni. Relativna rizičnost je pri 95% koeficientu zaupanja (0,87-3,24) 1,68.

KATEPSIN S

Tabela XIX: Mediane in intervali zaupanja za vrednosti katepsina S glede na skupino zdravih osebkov.

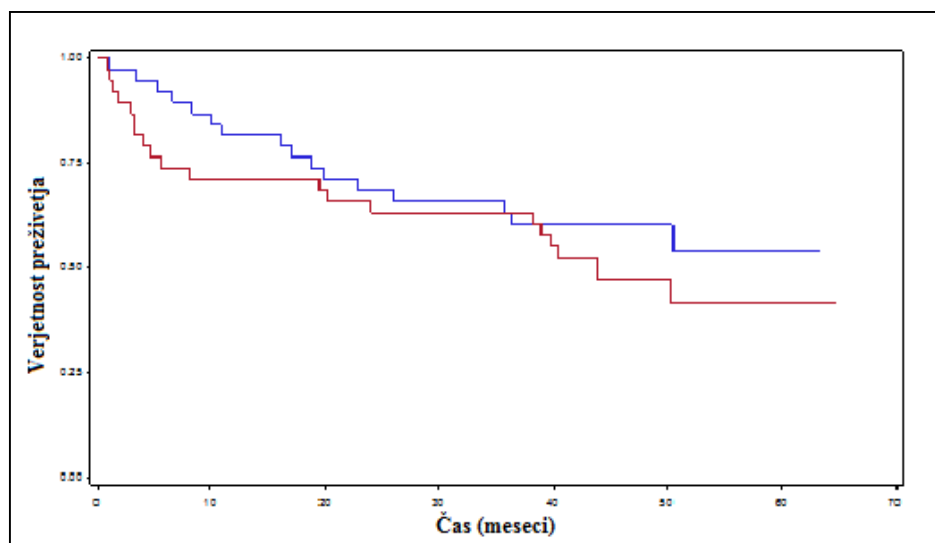
skupina	mediana	razlika v % glede na zdrave osebkke	95% interval zaupanja (primerjava z zdravimi osebki)
zdravi osebki	15,06		13,80-16,43
kolorektalni karcinom	15,66	4% višji	12,68-19,32 (8,1% nižji-17,6% višji)
adenom	15,65	3,9% višji	12,68-19,32 (8,1% nižji-17,6% višji)
drugo	14,7	2,4% nižji	11,91-18,14 (13,7% nižji-10,4% višji)



Slika 27: Prikaz median posameznih skupin ter območje vrednosti koncentracij katepsina S v vzorcih v intervalu s 95% zaupanjem.

Vrednost p (tip III) je 0,69, kar pomeni, da se vrednosti skupin bolnikov s kolorektalnim karcinomom, adenomom in drugimi boleznimi črevesja statistično značilno ne razlikujejo od vrednosti skupine zdravih osebkov.

Kaplan-Meierjeva ali preživetvena krivulja prikazuje porazdelitev median in njihov pomen pri času preživetja bolnikov.



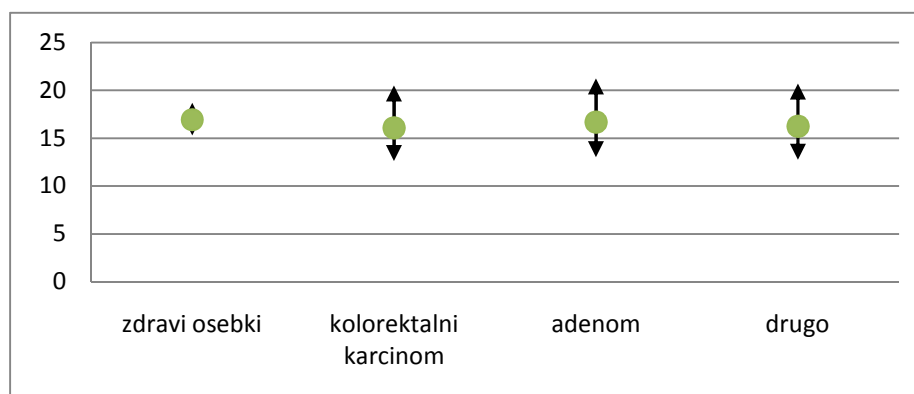
Slika 28: Kaplan-Meierjeva krivulja prikazuje povezavo med koncentracijami katepsina S in verjetnostjo preživetja bolnikov. Rdeča barva pomeni vrednosti katepsina S, ki so višje od mediane, modra pa vrednosti, ki so nižje od mediane.

Vrednost $p=0,27$, kar pomeni da vrednosti katepsina S v serumu bolnikov s kolorektalnim rakom niso povezane s prognozo bolezni. Relativna rizičnost je pri 95% koeficientu zaupanja (0,75-2,76) 1,44.

KATEPSIN X

Tabela XX: Mediane in intervali zaupanja za vrednosti katepsina X glede na skupino zdravih osebkov.

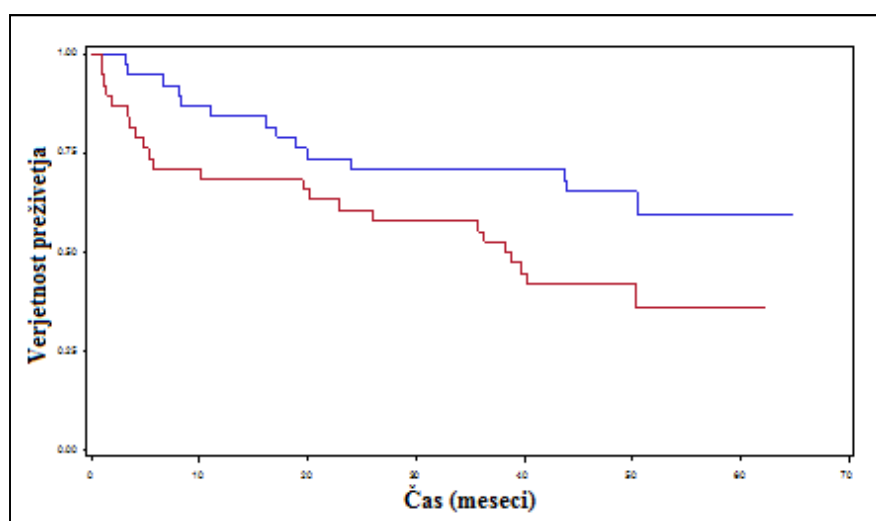
skupina	mediana	razlika v % glede na zdrave osebke	95% interval zaupanja (primerjava z zdravimi osebkami)
zdravi osebki	16,92		15,30-18,71
kolorektalni karcinom	16,07	5% nižja	12,61-20,49 (17,6% nižji-9,5% višji)
adenom	16,68	1,4% nižja	13,01-21,25 (15,0% nižji-13,6% višji)
drugo	16,24	4% nižja	12,74-20,71 (16,7% nižji-10,7% višji)



Slika 29: Prikaz median posameznih skupin ter območje vrednosti koncentracij katepsina X v vzorcih v intervalu s 95% zaupanjem.

Vrednost $p(\text{tip III})=0,89$, kar pomeni, da se vrednosti skupin bolnikov s kolorektalnim karcinomom, adenomom in drugimi boleznimi črevesja statistično signifikantno ne razlikujejo od vrednosti skupine zdravih osebkov.

Kaplan-Meierjeva krivulja prikazuje porazdelitev median in njihov pomen na čas preživetja bolnikov.



Slika 30: Kaplan-Meierjeva krivulja prikazuje povezavo med koncentracijami katepsina X in verjetnostjo preživetja bolnikov. Rdeča barva pomeni vrednosti katepsina X, ki so višje od mediane, modra pa vrednosti, ki so nižje od mediane.

Vrednost $p=0,028$, kar pomeni da so višje vrednosti katepsina X v serumu bolnikov s kolorektalnim rakom povezane s slabšo prognozo in s tem krajšim preživetjem. Relativna rizičnost je pri 95% koeficientu zaupanja (1.07-4.05) 2,08.

Tudi v tem primeru smo izvedli enojno slepo retrospektivno študijo bolnikov s kolorektalnim rakom. Za določitev diagnostičnega pomena katepsinov X, H in S smo v študijo vključili tudi skupine bolnikov z adenomom, ostalimi, predvsem vnetnimi boleznimi črevesja in skupino zdravih oseb. Skupine so se ujemale glede spola in starosti. V dosedanjih študijah so že določali serumske koncentracije katepsinov B, L, D in H pri kolorektalnem raku (1,51,59), ne pa katepsinov X ali S.

Iz rezultatov je razvidno, da nobeden izmed katepsinov nima diagnostičnega potenciala niti za odkrivanje bolnikov s kolorektalnim rakom, niti za razlikovanje med benignimi in malignimi spremembami na črevesni sluznici. Pri bolnikih z rakom prostate so bile celokupne vrednosti katepsina X v serumu precej višje od naših (54), kar razlagamo z uporabo različnih protiteles in standardov v testu ELISA. Za primerjavo rezultatov med študijami bi bilo smiselno poenotiti teste in standardizirati postopek.

Zanimivo je, da celokupni katepsin X ni bil spremenjen v skupini bolnikov z vnetnimi boleznimi črevesja, glede na vlogo, ki jo ima katepsin X v teh procesih. Ta rezultat se razlikuje od prejšnje študije naše skupine, kjer so bile pri bolnicah z vnetno obliko raka dojke serumske vrednosti aktivnega katepsina X močno znižane (52), ujema pa se s sklepanjem o večjem pomenu in izločanju predvsem prokatepsina X, na račun katerega se katepsin X verjetno zniža. To kaže na heterogenost mehanizmov in vloge katepsinov pri posameznih vrstah raka.

Sprva je bil namen te študije določiti zgolj diagnostično vrednost katepsinov, za določanje prognostične vrednosti pri skupini z rakom pa smo se odločili šele naknadno. Zaradi same narave prvotno načrtovane študije zbrani klinični in patološki podatki za to vrsto analize niso popolni.

Izkazalo se je, da so višje vrednosti celokupnega katepsina X v serumu bolnikov s kolorektalnim rakom statistično značilno povezane s krajšim preživetjem in s tem slabšo prognozo bolezni. To nas je precej presenetilo, saj naj bi bil katepsin X udeležen predvsem v začetnih fazah malignih bolezni (26). Razlika od študije na ovarijskem karcinomu je ta, da smo tu določali celokupni katepsin X, torej tudi prokatepsin X. Katepsin X je, najverjetneje preko imunskih celic infiltriranih v tumorsko tkivo, udeležen pri povečani invazivnosti tumorja in s tem s krajšim preživetjem. Aktivirane imunske celice izločajo namreč velike

količine predvsem prokatepsina X, ki poveča motiliteto celic zaradi interakcij z integrinskimi receptorji, pri tem pa spodbuja tudi druge imunske celice, ki imajo tumor promotorsko delovanje zaradi sproščanja citokinov in drugih vnetnih faktorjev. Aktivirane imunske celice, kot so makrofagi in limfociti T, namreč razgrajujejo zunajcelični matriks, kar najverjetneje dodatno vpliva na potek bolezni.

Celokupni in verjetno prokatepsin X v serumu bi lahko bil uporaben prognostični kazalec za določanje rizičnosti pacientov s kolorektalnim rakom za ponovitev bolezni in bi lahko služil za izbiro optimalne terapije in oskrbe pacientov. Uporabnost bi bilo potrebno potrditi na dodatnih kliničnih študijah, ki bi vključevale večje število pacientov.

Katepsina S in H nista izkazala prognostične vrednosti za napoved celokupnega preživetja bolnikov.

5 SKLEPI

Glede na literaturo smo predvidevali, da ima povečano izražanje in izločanje prokatepsina X pomembno vlogo v malignih procesih.

Z imunizacijo miši s peptidi, ki predstavljajo proregijo, smo pridobili monoklonska protitelesa, ki specifično prepoznavajo prokatepsin X. Ugotovili smo, da minimalne razlike v strukturi epitopa med posameznim peptidom in proregijo prokatepsina X, povzročijo precej slabše prepoznavanje nativnega antigena s strani pridobljenih protiteles. Z dodatkom reducenta DTT, ki cepi disulfidno vez med proregijo in Cys31 v aktivnem mestu, smo dosegli 100% boljšo afiniteto protiteles na prokatepsin X, najverjetneje zaradi bolj iztegnjene konformacije proregije in s tem večje podobnosti s peptidom proregije. Pri indirektnem testu ELISA so pridobljena protitelesa prepoznavala tudi aktivno obliko katepsina X, za kar je mogoče kriva prisotnost proregije v standardu.

Ker se pri fizioloških pogojih proregija po odcepitvi in redukciji disulfidne vezi najverjetneje odstrani, bi taka protitelesa omogočala detekcijo izključno prokatepsina X v bioloških vzorcih. Pridobljena protitelesa so imela premajhno afiniteto do prokatepsina X za prepoznavanje nanomolarnih koncentracij v bioloških vzorcih z direktnim testom ELISA. To bi bilo možno izboljšati z dodatnim prekloniranjem ali ponovno imunizacijo miši s prokatepsinom X.

Aktivna oblika katepsina X, določana v cistični tekočini ovarijskega raka z testom ELISA, ni izkazala napovednega potenciala za potek in ponovitev bolezni. Razmerja vrednosti med cistatinom C in posameznimi katepsini pa so bila povezana s stopnjo bolezni. Nižje razmerje CisC/KatB pri višji stopnji je pokazatelj slabe prognoze, kar je najverjetneje povezano s slabšim inhibitornim potencialom cistatina C. Nižje vrednosti razmerij Cis/KatH in CisC/KatX pri manj agresivnem in bolj diferenciranem ovarijskem raku pa so pokazatelji boljše prognoze.

Celokupne vrednosti katepsina X smo z testom ELISA določali v serumih bolnikov s kolorektalnim rakom. V povprečju se te vrednosti niso razlikovale med skupinami bolnikov s kolorektalnim rakom, adenomom, drugimi (vnetnimi) črevesnimi boleznimi in kontrolno skupino zdravih oseb. Izkazalo pa se je, da so višje vrednosti celokupnega katepsina X, za razliko od katepsina H in S, v serumu bolnikov s kolorektalnim rakom značilno povezane s krajšim preživetjem bolnikov. To kaže na pomembno vlogo

prokatepsina X v malignih procesih, ki smo ga skupaj z ostalimi oblikami določali s tem testom.

Katepsin X, posebej pa njegova prooblika, bi lahko bil uporaben prognostični kazalec za napoved poteka rakavega obolenja in kot pomoč pri načrtovanju ustrezne obravnave bolnikov. Vendar je za natančnejšo opredelitev njegove uporabnosti potrebno razviti teste, ki bodo specifično določali prokatepsin X v serumu, jih standarizirati in preveriti njihovo delovanje na večjih in bolj heterogenih skupinah bolnikov z rakom.

6 LITERATURA

1. Vozelj S, Obermajer N, Kos J: Proteaze in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci. *Farm Vestn.* **2007**; 58: 133-138.
2. Rawlings N D, Barrett A J & Bateman A *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*; **2011**; 38, D227-D233.
3. Jedinak A, Maliar T: Inhibitors of proteases as anticancer drugs. *Neoplasma* **2005**; 52(3): 185-92.
4. Duffy M J: Proteases as Prognostic Markers in Cancer. *Clinical Cancer Research* **1996**; 2: 613-618.
5. Koblinski J E, Ahram M, Sloane BF: Unraveling the role of proteases in cancer. *Clinica Chimica Acta* **2000**; 291: 113-135.
6. Kos J, Lah T T: Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: Target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (Review). *Oncology Reports*; **1998**; 5: 1349-1361.
7. Nagase H, Woessner J F: Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem.* **1999**; 247: 21491-21494.
8. Turk B :Targeting proteases: successes, failures, and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*; **2006**; 5:785-799.
9. Fear G, Komarnytsky S, Raskin I: Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacology & Therapeutics*; **2007**; 113: 354–368.
10. Kodre V, Černelč P: Zdravljenje diseminiranega plazmocitoma z zdravilom bortezomib. *Zdrav Vestn*; **2008**; 77: I-87–92.
11. Lah T T, Duran Alonso MB, Van Noorden JFC: Antiprotease therapy in cancer: hot or not? *Expert Opin Biol Ther*; **2006**; 6: 257-79.
12. Sloane B F, Sameni M, Podgorski I, Cavallo-Medved D, Moin K: Functional imaging of tumor proteolysis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**; 46: 301-315.
13. Binder B R, Mihaly J: The plasminogen activator inhibitor »paradox« in cancer. *Immunology Letters*; **2008**; 118: 116–124.
14. Balbin M *et al.*: Loss of collagenase-2 confers increased skin tumors susceptibility to male mice. *Nature Genet.*; **2003**; 35: 252-257.
15. Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S: Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions. *Biochimie*; **2008**; 90: 194-207.

16. Reiser J, Adair B, Reinheckel T: Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest.*; **2010**; 120(10): 3421-3431.
17. Turk V, Turk B, Turk D: Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal*; **2001**; 20(17): 4629-4633.
18. http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine_protease; povzeto maja **2011**.
19. Fox T, de Miguel E, Mort J S, Storer A C: Potent Slow-Binding Inhibition of Cathepsin B by Its Propeptide. *Biochemistry*; **1992**; 31: 12571-12576.
20. Obermajer N, Doljak B, Kos J: Cysteine cathepsins : regulators of antitumour immune response. *Expert Opin. Biol. Ther.*; **2006**; 6(12): 1295-1309.
21. Conus S, Simon H: Cathepsins: Key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochemical pharmacology*; **2008**; 76: 1374-1382.
22. Zavašnik-Bergant T, Turk B: Cysteine cathepsins: destruction ability versus immunomodulation capacity in immune cells. *Biol. Chem.*; **2007**; 388: 1141-1149.
23. Gocheva V, Joyce J A: Cysteine Cathepsins and the Cutting Edge of Cancer Invasion. *Cell Cycle*; **2007**; 6: 60-64.
24. Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Kos J: Role of Cysteine Cathepsins in Matrix Degradation and Cell Signalling. *Connective Tissue Research*; **2008**; 49: 193-196.
25. Mohamed M M, Sloane B F: Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer*; **2006**; 6: 764-775.
26. Sevenich L, Schurigt U, Sachse K, Gajda M, Werner F, Müller S, Vasiljeva O, Schwinde A, Klemm N, Deussing J, Peters C, Reinheckel T: Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *PNAS*; **2010**; 107(6); 2497-2502.
27. Kos J, Lah T: Cystatins in cancer. *NOVA Science Publishers, Inc*; **2006**; 153-65.
28. Nägler D K, Ménard 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.
29. Pungercar J, Ivanovski G: Identification and molecular cloning od cathepsin P, a novel human putative cysteine protease of the papain family. *Pflugers Arch.*; **2000**; 439: R116-R118.
30. Sakamoto E, Sakao Y, Taniguchi Y, Yamafuji K: Cathepin Y (a novel thiol enzyme) produces kinin potentiating peptide from the component protein of rat plasma. *Immunopharmacology*; **1999**; 45: 207-214.

31. Santamaria I, Velasco G, Pendás A M, Fueyo A, López-Otin C: Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and unique chromosomal location. *J. Biol. Chem.*; **1998**; 273: 16816-16823.
32. Barret A J, Rawlings N D, Woessner J F: The Handbook of Proteolytic Enzymes.; *Elsevier, Academic Press*; **2004**; 342: 1113-1116.
33. Sivaraman J, Nägler D K, Zhang R, Ménard R, Cygler M: Crystal structure of Human Prokatepsin X: A Cysteine Protease with the Proregion Covalently Linked to the Active Site Cysteine. *J. Mol. Biol.*; **2000**; 295: 939-951.
34. Puzer L, Cotrin S 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: 1191-1195.
35. Pečar Fonovič U, Kos J: Efficient Removal of Cathepsin L from Active Cathepsin X using Immunoprecipitation Technique. *Acta Chim.*; **2009**; 56(4): 985-988.
36. Obermajer N, Premzl A, Zavašnik Bergant T, Turk B, Kos J: Carboxypeptidase cathepsin X mediates β 2-integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Experimental Cell Research*; **2006**; 312 (13): 2515-2527.
37. Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N: The role of cathepsin X in cell signalling. *Cell Adh. Migr.*; **2009**; 3(2): 164-166.
38. Nascimento F D, Rizzi C C A, 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. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; **2005**; 436: 323-332.
39. Obermajer N, Svajger U, Bogyo M, Jeras M, Kos J: Maturation of dendritic cells depends on proteolytic cleavage by cathepsin X. *J. Leukoc. Biol.*; **2008**; 84: 1306-1315.
40. Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Sadaghiani A M, Bogyo M, Kos J: Cathepsin X-mediated β 2-integrin activation results in nanotube outgrowth. *Cell. Mol. Life. Sci.*; **2009**; 66: 1126-1134.
41. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonovič U P, Kos J: Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*; **2009**; 41: 1685-1696.
42. Staudt N D, Aicher W K, Kelbacher H, Stevanovic S, Carmona A K, Bogyo M, Klein G: Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and

- impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts. *Haematologica*; **2010**; 95(9): 1452-1460.
43. Ratovitski T, Chighladze E, Waldron E, Hirschhorn R R, Ross C A: Cysteine proteases bleomycin hydrolase (BLMH) and cathepsin Z mediate N-terminal proteolysis and toxicity of mutant huntingtin. *JBC Papers in Press.*; **2011**; 286(14): 12578-12589.
44. Nägler D K, Krüger S, Kellner A, Ziomek E, Menard R, Buhtz P, Krams M, Roessner A, Kellner U: Up-regulation of Cathepsin X in Prostate Cancer and Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *The Prostate*; **2004**; 60: 109-119.
45. Krueger S, Kalinski T, Hundertmark T, Wex T, Küster D, Peitz U, Ebert M, Nägler D K, Kellner U, Malfertheiner P, Naumann M, Röcken C, Roessner A: Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol.*; **2005**; 207: 32-42.
46. Devanathan G, Turnbull J L, Ziomek E, Purissima E O, Ménard R, Sulea T: Carboxy-monopeptidase substrate specificity of human cathepsin X. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; **2005**; 329: 445-452.
47. Baker A R, Zalwango S, Malone LS L, Igo Jr. R P, Qiu F, Nsereko M, Adams M D, Supelak P, Mayanja-Kizza H, Boom W H, Stein C M: Genetic susceptibility to tuberculosis associated with cathepsin Z haplotype in a Ugandan Household contact study. *Human Immunology*; **2011**; 72: 426-430.
48. Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Zavašnik Bergant V, Langerholc T, Turk B, Werle B, Golouh R, Repnik U, Jeras M, Turk V: Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Experimental Cell Research*; **2005**; 306: 103-113.
49. Chang W-S W, Wu H-R, Yeh C-T, *et al.*: Lysosomal Cysteine Proteinase Cathepsin S as a Potential Targer for Anti-Cancer Therapy. *Journal of Cancer Molecules*; **2007**; 3(1): 5-14.
50. Nouh M A *et al.*: Cathepsin B: a potential prognostic marker for inflammatory breast cancer. *Journal of Translational Medicine*; **2011**, 9: 1.
51. Berdowska I: Cysteine proteases as disease markers. *Clinica Chimica Acta*; **2004**; 342: 41-69.

52. Decock J, Obermajer N, Vozelj S, Hendrickx W, Paridaens R, Kos J: Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin X and cystatin C in sera of patients with early-stage and inflammatory breast cancer. *Int J Biol Markers*; **2008**; 23(3); 161-168.
53. Colin C, Voutsinos-Porche B *et al.*: High expression of cathepsin B and plasminogen activator inhibitor type-1 are strong predictors of survival in glioblastomas. *Radiol Oncol*; **2011**; 45(2): 102-115.
54. Nägler D K, Lechner A M, Oettl A, Kozaczynska K, Scheuber H-P, Gippner-Steppert C, Bogner V, Biberrthaler P, Jochum M: An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *Journal of Immunological Methods*; **2006**; 308: 241-250.
55. Uršič Vrščaj M, Snoj R, Cerar O, Frković-Grazio S, Stržinar V: Prikaz bolnice z rakom jajčnikov s komentarji. *Onkologija/ klinično-patološka konferenca*; **2001**; 29-34.
56. Kolwijck E, Massuger L F A G, Thomas C M G, Span P N, Krasovec M, Kos J, Sweep F C G J: Cathepsins B, L and cystatin C in cyst fluid of ovarian tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*; **2010**; 136: 771-778.
57. Agrawal A K, Ekonjo G B, Teterycz E, Zyško D, Grzebieniak Z, Milan M, Marek G, Siewiński M: Cysteine peptidases and their inhibitors in breast and genital cancer. *Folia Histochem Cytobiol.*; **2010**; 48(3) 323-327.
58. Zavoral M, Suchanek S, Zavada F, Dusek L, Muzik J, Seifert B, Fric P: Colorectal cancer screening in Europe. *World J Gastroenterol*; **2009**; 15(47): 5907-5915.
59. Kuester D, Lippert H, Roessner A, Krueger S: The cathepsin family and their role in colorectal cancer. *Pathology - Research and Practice*; **2008**; 204: 491-500.
60. Zore I, Krašovec M, Cimerman N, Kuhelj R, Werle B, Nielsen H J, Brüner N, Kos J: Cathepsin B/Cystatin C Complex Levels in sera from Patients with Lung and Colorectal Cancer. *Biol. Chem.*; **2001**; 382: 805-810.
61. Kolwijck E., Kos J.: The balance between extracellular cathepsins and cystatin C is of importance for ovarian cancer. **2010**; *Eur J Clin Invest.*; 40(7): 591-9.
62. <http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=01010103>; povzeto maja 2011.
63. http://en.wikipedia.org/wiki/Keyhole_limpet_hemocyanin; povzeto maja 2011.
64. <http://www.piercenet.com/instructions/2162184.pdf>

65. Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*; **1975**; 256(5517):495-7.
66. Operating instructions for Amicon Ultrafilters , Publication I-101U.
67. Kuhelj R.: Biokemija v praksi: načela in tehnike, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana; **2003**; 28-29, 50-52, 67-74.
68. http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_A, povzeto maja 2011.
69. <http://www.gelifesciences.com/protein-purification> GE Healthcare, nProtein A Sepharose 4 Fast Flow, Instructions 71-5027-85 AB.
70. Štrukelj B., Kos J.: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1.izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, **2007**: 126-129, 140-147, 174, 538-539.
71. John R. Crowther, ELISA Theory and Practice, 1st Ed., *Humana Press*; **1995**; str. 7-19 in 35-50.
72. <http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>, povzeto maja **2011**.
73. Vozelj M., Temelji imunologije, 1st Ed., DZS; **2001**; 91-97 in 112-113.
74. Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt I., *Immunology*, 7th Ed., **2006**, str: 68-71
75. <http://www.piercenet.com>, povzeto maja 2011.
76. Kos J., Smid A., Svetic B., Lenarčič B., Vrhovec I. *et al.*: Lysosomal proteases cathepsins D, B, H, L and their inhibitors stefins A and B in head and neck cancer. *Biol Chem Hoppe Seyler*; **1995**; 376: 401-405.
77. Kos J., Stabuc B., Schweiger A., Krasovec M., Cimerman N., Kopitar-Jerala N. *et al.*: Cathepsins B, H and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res* **1997**; 3, 1815-22.
78. Dremelj A: Proučevanje vloge katepsina X v celicah raka prostate. Diplomsko delo; FFA; **2011**.
79. Chapman H A, Riese R J, Shi G P: Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.*; **1997**; 59: 63-88.
80. Schweiger A, Staib A, Werle B, Krasovec M, Lah T T, Ebert W *et al.*: Cysteine proteinase cathepsin H in tumours and sera of lung cancer patients: relation to prognosis and cigarette smoking. *Br J Cancer*; **2000**; 82: 782-788.
81. <http://www.salimetrics.com>; povzeto maja 2011.

PRILOGE

PRILOGA 1

Tabela i: Izmerjene vrednosti Katepsinov in cistatina C v vzorcih cistične tekočine ovarijskega raka.

	katepsin B	katepsin H	katepsin L	katepsin X	cistatin C
št. vzorca	koncentracija (ng/mL)				
1	>268,8	18,504	25,19	47,815	663,18
2	104,12	7,3541	33,57	68,129	734,06
3	244,89	11,416	130,75	>Max	628,98
4	>268,8	17,879	336,09	>Max	604,78
5	29,99	10,772	43,94	9,2349	760,22
6	80,30	3,5381	102,39	18,92	828,25
7	104,66	17,366	< 0,95	26,376	719,11
8	35,20	18,212	107,04	>Max	467,02
9	19,15	0,1	< 0,95	19,278	1204,91
10	85,52	18,132	32,71	21,112	640,08
11	66,85	23,685	30,58	50,212	624,75
12	319,95	30,528	63,21	65,507	693,84
13	-0,45	0,1	< 0,95	2,8329	856,04
14	24,62	57,889	54,03	31,175	263,54
15	59,65	18,246	134,69	33,598	1436,98
16	171,90	28,422	122,60	16,618	501,18
17	146,14	12,116	68,44	22,534	764,96
18	0,98	60,904	< 0,95	35,437	691,52
19	<1,008	9,868	< 0,95	8,7177	473,80
20	45,36	0,1	< 0,95	19,34	324,01
21	71,25	50,182	115,78	0,1	1177,22
22	247,42	25,111	48,62	38,145	501,63
23	26,63	42,086	57,30	24,855	820,14
24	48,06	>Max	66,32	24,886	808,06
25	61,33	18,664	110,31	40,525	1828,11
26	>268,8	17,769	70,66	49,958	482,27
27	110,37	18,853	73,64	18,832	459,14
28	<1,008	4,2194	22,76	0,1	< 1,00
29	102,80	33,91	49,04	16,288	400,29
30	29,67	14,815	134,48	>Max	318,09
31	129,43	23,554	55,44	35,365	495,29
32	42,15	9,6227	44,83	0,1	561,21
33	168,34	17,015	100,17	14,878	830,12
34	<1,008	7,4804	< 0,95	12,947	268,66
35	43,97	10,408	43,79	17,196	304,62
36	>268,8	>Max	119,49	>Max	805,58

37	72,24	33,52	50,65	3,685	681,72
38	70,39	28,598	53,41	13,39105	632,74
39	64,37	>Max	66,89	39,4035	804,94
40	125,91	12,127	38,41	10,50995	803,93
41	37,08	12,182	< 0,95	16,033	597,65
42	49,98	23,874	111,20	24,71	582,18
43	25,82	19,582	< 0,95	7,86855	400,99
44	18,96	12,292	< 0,95	9,22345	< 1,00
45	19,74	20,468	71,00	5,67425	718,44
46	126,25	32,235	64,32	11,7705	500,10
47	178,54	14,856	< 0,95	19,432	665,17
48	>268,8	35,894	64,80	56,442	621,62
49	234,37	18,222	136,37	46,1145	2745,91
50	263,77	51,991	110,04	21,3595	827,60
51	>268,8	22,953	81,51	19,0315	765,97
52	271,03	26,63	47,54	8,4636	344,88
53	175,71	31,667	106,98	12,84505	707,24
54	26,56	21,491	< 0,95	4,99625	293,44
55	227,12	48,345	61,90	25,478	939,10
56	>268,8	48,159	79,11	80,113	765,78
57	169,52	25,436	102,55	18,742	560,44
58	139,01	32,79	57,74	75,4175	520,66
59	13,21	5,5357	40,09	2,9332	404,16
60	64,04	16,837	56,62	3,1384	630,95
61	99,07	14,965	39,72	>Max	829,50
62	265,39	22,878	53,58	19,184	607,13
63	256,88	>Max	105,06	62,0655	818,98
64	192,85	12,136	121,50	51,4895	649,92
65	40,70	0,1	73,03	12,772	679,09
66	119,91	18,035	117,05	6,31555	921,98
67	94,00	9,1248	116,99	20,0695	1037,59

PRILOGA 2

Tabela ii: Izmerjene vrednosti katepsinov v serumu bolnikov s kolorektalnim rakom in kontrolnih skupinah.

	katepsin X	katepsin S	katepsin H
št. vzorca	koncentracija v serumu (ng/mL)		
01 0007 05	12,05	12,6704	<2
01 0020 05	23,53	27,344	19,6846
01 0038 05	12,2092	11,9402	<2
01 0052 05	36,192	10,7742	10,9664
01 0055 05	99,518	9,7458	<2
01 0072 05	11,6638	9,1176	<2

01 0083 05	12,4024	7,3676	<2
01 0089 05	16,9246	18,5924	2,0564
01 0090 05	13,7574	19,2666	7,3306
01 0098 05	24,686	15,8284	2,8098
01 0105 05	19,633	16,5758	10,8478
01 0133 05	20,762	17,0548	7,316
01 0140 05	27,258	9,5118	7,0026
01 0145 05	39,956	31,112	26,66

01 0148 05	15,8374	16,9106	<2
01 0170 05	29,242	8,0642	<2
01 0177 05	17,8128	9,7216	<2
01 0190 05	38,646	33,354	12,6248
01 0195 05	14,5894	9,9704	3,6076
01 0196 05	19,1742	18,8228	2,4178
01 0204 05	23,546	10,48	2,2684
01 0217 05	25,54	17,3104	5,0664
01 0244 05	13,7516	14,9248	5,2178
01 0255 05	16,5194	15,674	<2
01 0276 05	16,1728	20,79	5,1354
01 0316 05	12,5762	23,81	2,49
01 0361 05	16,2578	23,594	<2
01 0370 05	17,1248	16,0016	3,411
01 0394 05	14,853	15,4236	8,8144
01 0395 05	8,5226	15,4998	<2
01 0399 05	17,0112	14,85	<2
01 0404 05	61,492	21,756	7,5152
01 0406 05	14,2408	15,394	9,6548
01 0409 05	20,426	10,4792	5,035
01 0416 05	32,442	17,8536	8,7614
01 0429 05	8,0582	22,254	7,0544
01 0440 05	25,034	11,1562	12,1614
01 0444 05	16,9198	17,4448	2,6632
01 0447 05	21,342	11,6436	12,1032
01 0459 05	38,75	11,85	<2
01 0500 05	5,8594	16,0862	5,5242
01 0513 05	21,184	13,4396	8,8412
01 0522 05	8,7232	13,1692	5,1062
01 0537 05	7,189	10,5594	4,9404
01 0538 05	9,3726	11,9706	<2
01 0609 05	21,332	16,6988	<2
01 0611 05	14,9852	16,6342	<2
01 0612 05	13,5514	17,984	3,6892
01 0724 05	20,188	12,558	<2
01 0725 05	20,138	13,9626	<2
01 0769 05	17,116	14,7584	5,2596
01 0789 05	16,2426	25,982	7,5346
01 0792 05	12,4438	4,2474	9,5766
01 0847 05	21,188	22,388	6,1834
01 0849 05	21,9	21,194	<2
01 0917 05	17,3742	17,4836	2,002
01 0947 05	9,5776	19,746	5,4622
01 0967 05	11,233	17,7458	17,7242
02 0001 05	15,2844	9,4908	<2
02 0013 05	16,306	18,6616	14,1198
02 0024 05	17,3074	13,3934	<2
02 0048 05	27,386	21,984	<2

02 0056 05	16,2642	10,8876	<2
02 0057 05	12,9388	18,2822	<2
02 0059 05	9,441	15,5366	<2
02 0074 05	32,29	13,8322	3,6286
02 0085 05	4,0624	14,7058	<2
02 0091 05	18,4456	18,3442	<2
02 0100 05	7,9338	9,0916	<2
02 0108 05	17,1896	15,5832	<2
02 0112 05	19,9764	19,4512	12,2764
02 0142 05	15,2514	19,4634	3,7144
02 0147 05	15,0598	15,3744	6,6864
02 0154 05	24,118	33,864	8,7028
02 0165 05	25,33	20,742	4,5748
02 0193 05	17,3486	18,7208	<2
02 0206 05	6,8784	15,7516	<2
02 0232 05	24,732	15,776	<2
02 0249 05	19,9302	12,0258	3,0938
02 0251 05	21,066	14,5656	<2
02 0319 05	20,968	20,33	10,071
02 0328 05	27,224	19,9806	<2
02 0338 05	16,7024	8,5854	39,698
02 0334 05	14,3428	9,6836	21,222
02 0353 05	8,8426	15,8482	8,2006
02 0360 05	20,968	16,0806	6,618
02 0379 05	22,088	19,5916	4,5834
02 0381 05	18,9468	8,8442	<2
02 0389 05	13,2742	12,4268	<2
02 0396 05	20,394	18,8758	3,4252
02 0439 05	17,0808	18,0406	5,8268
02 0488 05	14,5844	12,4418	4,0022
02 0498 05	20,256	10,3684	<2
02 0513 05	14,6402	14,124	2,9966
02 0517 05	17,6644	19,1788	3,8152
02 0535 05	18,3402	12,762	2,822
02 0538 05	21,436	21,88	3,279
02 0555 05	23,404	19,308	7,729
02 0584 05	23,896	10,371	14,909
02 0591 05	24,218	18,6466	1,23794
02 0595 05	19,5896	10,731	<2
02 0611 05	13,6196	12,8012	1,42606
02 0612 05	21,61	12,0838	1,45448
02 0618 05	<2	1,53226	10,9594
02 0635 05	12,2444	11,6994	<2
02 0639 05	15,8946	13,5714	<2
02 0655 05	9,0024	10,4898	10,826
02 0674 05	15,5594	10,8044	4,4746
02 0679 05	16,3786	18,4278	<2
02 0682 05	11,9692	18,5086	4,6512

02 0697 05	22,306	15,946	6,5624
02 0713 05	16,1992	7,4898	<2
02 0729 05	18,693	13,131	14,7248
02 0732 05	22,224	13,5624	18,9148
02 0763 05	8,4692	11,735	<2
02 0765 05	19,0688	18,398	2,6574
02 0770 05	24,458	25,718	11,6842
02 0784 05	7,9982	25,404	2,787
02 0798 05	6,1112	11,9192	2,725
02 0801 05	11,1414	12,147	<2
02 0803 05	23,49	15,7264	<2
02 0829 05	17,9222	16,7202	9,7594
02 0837 05	8,2928	8,9324	6,6516
02 0848 05	7,9188	14,6438	<2
02 0853 05	26,03	9,9708	10,7996
02 0870 05	10,0744	13,4492	<2
02 0885 05	22,748	18,7186	6,3716
02 0892 05	17,6638	16,6726	5,7286
02 0905 05	16,3426	9,4142	<2
02 0920 05	12,7452	13,9844	<2
02 0922 05	11,5768	14,379	<2
02 0933 05	23,832	25,488	3,4586
02 0950 05	30,202	11,3132	4,975
02 0958 05	13,3196	30,19	<2
02 0963 05	2,0312	12,9994	10,5176
02 0992 05	18,0508	17,8512	<2
02 1000 05	14,6418	14,865	6,9984
03 0006 05	17,1248	12,8036	<2
03 0039 05	17,6446	16,6596	3,7516
03 0090 05	16,2896	12,7574	7,4528
03 0128 05	15,232	13,0126	<2
03 0137 05	9,7144	12,44	5,8994
03 0151 05	12,8686	11,2982	5,1062
03 0197 05	21,4	13,5754	7,3658
03 0238 05	25,138	2,94	<2
03 0242 05	16,282	9,9354	3,4464
03 0263 05	16,3752	19,0794	<2
03 0266 05	17,1454	8,8366	<2
03 0298 05	5,356	13,2556	2,8852
03 0301 05	15,395	14,9052	10,0784
04 0006 05	22,504	23,608	6,5752
04 0022 05	19,1276	17,0496	14,7162
04 0038 05	21,716	15,5846	<2
04 0051 05	12,007	15,2918	<2
04 0058 05	14,691	17,184	4,2148
04 0090 05	17,4434	13,3404	7,544
04 0102 05	15,6254	11,8862	<2
04 0105 05	21,374	22,734	52,34

04 0118 05	13,9424	15,6952	2,676
04 0137 05	19,6556	24,942	6,6414
04 0147 05	19,9094	20,856	2,819
04 0182 05	21,55	22,376	<2
04 0204 05	18,2186	16,2114	<2
04 0208 05	20,432	40,076	2,9524
04 0230 05	13,7132	16,3002	4,9288
04 0241 05	16,0916	29,176	9,2746
04 0283 05	26,492	24,368	2,8954
04 0290 05	9,9596	5,9794	<2
05 0012 05	24,04	16,7486	<2
05 0036 05	28,794	13,7878	2,5184
05 0041 05	27,004	16,9844	<2
05 0133 05	17,815	>61,6	<2
05 0149 05	18,3566	12,3454	<2
05 0153 05	15,7524	23,862	<2
05 0169 05	18,0302	21,636	4,8814
05 0248 05	16,9324	17,2296	6,5304
05 0258 05	14,2164	13,2822	<2
05 0262 05	15,9016	14,2754	<2
05 0304 05	16,5668	11,6764	<2
05 0307 05	15,402	9,2646	<2
05 0336 05	29,62	14,1698	<2
05 0349 05	9,8352	7,066	<2
05 0384 05	19,9996	11,457	<2
05 0421 05	6,83	15,5218	<2
05 0428 05	20,312	15,3126	<2
05 0452 05	14,1162	17,0004	<2
05 0455 05	10,6548	8,854	<2
05 0462 05	14,512	13,5296	2,6818
05 0465 05	12,9286	13,7794	<2
05 0509 05	13,5852	19,4758	6,1242
05 0535 05	18,6798	17,3618	2,7072
05 0593 05	13,4548	14,8128	<2
05 0611 05	20,602	15,3002	<2
05 0615 05	21,544	12,3558	<2
05 0616 05	24,782	18,9312	6,9696
05 0646 05	24,17	17,2624	9,3816
05 0694 05	20,126	15,236	<2
05 0697 05	4,8404	11,5658	<2
05 0704 05	14,8108	12,0934	<2
05 0728 05	12,9598	14,737	<2
06 0012 05	16,3686	20,084	2,9674
06 0036 05	18,1062	18,311	<2
06 0079 05	13,6926	14,7144	<2
06 0080 05	36,784	11,7012	<2
06 0095 05	8,6668	10,7576	<2
06 0100 05	16,0846	9,881	9,1982

06 0102 05	29,012	12,544	<2
06 0115 05	8,4488	14,5478	<2
06 0181 05	20,762	19,6256	18,3338
06 0193 05	39,302	21,244	4,9312
06 0200 05	11,3886	13,564	<2
06 0201 05	23,614	17,857	<2
06 0208 05	20,03	12,5128	16,3886
06 0222 05	19,4318	8,6876	10,1368
06 0281 05	14,71	28,426	<2
06 0313 05	17,0494	18,0934	<2
06 0319 05	14,7052	10,8666	3,7772
06 0367 05	11,3548	13,2022	8,544
06 0405 05	20,564	25,544	13,1292
06 0439 05	14,1324	12,815	2,4756
06 0470 05	18,6764	14,8344	4,6174
06 0485 05	18,1556	13,4854	7,5018
06 0510 05	26,264	21,72	4,9794
06 0548 05	17,386	20,69	2,7562
06 0566 05	26,172	19,9236	<2
06 0574 05	20,264	21,488	3,6656
06 0578 05	15,3618	18,7718	<2
06 0605 05	16,9084	13,9098	<2
06 0638 05	11,1934	18,5362	8,3788
06 0640 05	23,288	25,104	5,8618
06 0644 05	7,3516	12,7574	5,1676
06 0667 05	35,824	18,6492	22,524
06 0748 05	14,932	10,904	<2
06 0749 05	14,8258	13,5234	<2
06 0767 05	22,932	16,6834	<2
06 0775 05	18,3034	20,742	5,519
06 0782 05	12,132	18,8614	5,3524
06 0793 05	14,1064	14,3974	<2
06 0797 05	19,8686	18,7216	8,6298
06 0809 05	10,003	9,7208	5,693
06 0812 05	25,028	15,4858	5,3226
06 0816 05	15,1106	9,3158	14,334
06 0840 05	13,7734	16,1828	5,7854
06 0870 05	22,696	18,2316	9,586
06 0887 05	14,6858	14,425	<2
06 0918 05	19,8534	14,9468	4,0084
06 0955 05	17,1602	13,347	1,52458
06 0964 05	20,356	16,6228	<2
06 0995 05	16,176	26,752	<2
06 0999 05	20,706	15,362	<2
07 0009 05	40,372	28,348	19,639
07 0055 05	13,8678	19,004	6,1962
07 0059 05	16,6078	12,1822	4,7484
07 0086 05	13,5228	42,994	<2

07 0090 05	13,7904	11,8548	<2
07 0097 05	19,8578	13,297	4,9982
07 0110 05	10,4472	16,1562	<2
07 0151 05	19,108	17,6006	10,7142
07 0171 05	11,98	22,748	5,397
08 0001 05	18,31	24,822	6,601
08 0014 05	25,658	21,766	6,5956
08 0020 05	15,8248	12,4722	<2
08 0047 05	14,3042	21,892	10,0874
08 0057 05	21,634	21,764	10,2306
08 0065 05	12,1264	14,4492	1,98584
08 0068 05	13,7476	16,106	3,1428
08 0090 05	15,398	15,3808	4,9658
08 0100 05	13,147	11,3946	<2
08 0111 05	11,145	14,178	<2
08 0112 05	14,519	2,014	9,4968
08 0122 05	13,4986	21,816	10,9856
08 0131 05	14,0196	17,6778	8,6314
08 0142 05	10,872	30,86	<2
08 0149 05	12,0886	11,7856	4,2104
08 0168 05	<2	16,643	9,2652
08 0182 05	33,304	24,182	14,4644
08 0187 05	18,1434	14,173	<2
08 0194 05	17,1588	19,4816	<2
08 0206 05	13,9666	27,628	<2
08 0221 05	17,7816	23,694	18,4608
08 0223 05	14,5652	19,2942	18,062
08 0229 05	17,386	20,354	9,9592
08 0251 05	12,89	19,2032	6,242
08 0273 05	26,968	15,6936	9,7346
08 0316 05	19,382	18,245	6,396
08 0327 05	16,7972	14,7482	6,555
08 0344 05	6,6784	10,082	10,9196
08 0364 05	24,834	12,1494	1,4825
08 0374 05	17,9078	11,4804	5,9848
08 0382 05	9,793	12,8958	<2
08 0397 05	18,6652	18,833	<2
08 0406 05	15,7528	21,092	1,74842
08 0410 05	16,5636	13,7198	<2
08 0416 05	19,3724	15,6808	<2
08 0422 05	15,4136	10,2522	10,5202
08 0440 05	51,154	17,646	8,5624
08 0451 05	22,25	25,248	<2
08 0480 05	11,374	17,6952	2,9302
08 0498 05	23,288	19,1494	11,4052
08 0506 05	24,286	21,432	<2
09 0816 05	17,3608	8,7566	<2
09 0825 05	13,4452	10,1114	5,2518

09 0837 05	31,54	20,61	10,7582
09 0859 05	24,324	20,138	<2
09 0875 05	15,6128	29,822	<2
09 0893 05	21,748	21,252	4,777
09 0920 05	11,9848	10,016	5,7004
09 0946 05	13,8598	11,6092	5,383

