

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA BREZNIK

**POSTAVITEV IN KARAKTERIZACIJA MODELOV TUMORSKE
INVAZIJE *IN VITRO* S POMOČJO CELIČNE LINIJE U-87**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA BREZNIK

**POSTAVITEV IN KARAKTERIZACIJA MODELOV TUMORSKE
INVAZIJE *IN VITRO* S POMOČJO CELIČNE LINIJE U-87**

**ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF *IN VITRO*
TUMOUR INVASION MODELS USING THE CELL LINE U-87**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, uni. dipl. kem., in somentorstvom dr. Bojane Mirković, mag. farm. Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravila v biotehnološkem in celičnem laboratoriju Katedre za biologijo na Fakulteti za farmacijo.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Janku Kosu za izkazano priložnost in strokovne nasvete.

Posebno zahvalo dolgujem somentorici dr. Bojani Mirković za nasvete, pomoč, družbo v laboratoriju in uvajanje v zanimiv svet celic.

Za dobro vzdušje v laboratoriju in pomoč pri delu bi se rada zahvalila vsem zaposlenim na Katedri za biologijo.

Izr. prof. dr. Darku Černetu in doc. dr. Petri Kocbek se zahvaljujem za strokovni pregled magistrske naloge.

Nazadnje bi se rada zahvalila družini in prijateljem, ki me podpirajo in mi stojijo ob strani.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, uni. dipl. kem., in somentorstvom dr. Bojane Mirković, mag. farm.

Barbara Breznik

VSEBINA

VSEBINA	II
KAZALO SLIK	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD	1
1.1 PROTEAZE	1
1.2 CISTEINSKE PROTEAZE	2
1.3 KATEPSIN B – SINTEZA, STRUKTURA IN AKTIVNOST	4
1.4 URAVNAVANJE AKTIVNOSTI KATEPSINA B	6
1.5 KATEPSIN X	8
1.6 FIZIOLOŠKA IN PATOLOŠKA VLOGA KATEPSINA B.....	9
1.7 VLOGA KATEPSINA B PRI RAKU	9
1.7.1 IZRAŽANJE IN AKTIVNOST KATEPSINA B PRI RAKU	10
1.7.2 LOKALIZACIJA KATEPSINA B PRI RAKU	10
1.7.3 KATEPSIN B IN RAZGRADNJA PROTEINOV ZCM	11
1.7.4 VLOGA KATEPSINA B PRI TUMORSKI INVAZIJU IN METASTAZIRANJU	13
1.7.5 VLOGA KATEPSINA B PRI ANGIOGENEZI.....	13
1.8 INHIBITORJI KATEPSINA B.....	14
1.8.1 ENDOGENI INHIBITORJI KATEPSINA B	14
1.8.2 EKSOGENI INHIBITORJI KATEPSINA B	15
1.9 SINERGISTIČEN UČINEK KATEPSINOV B IN X PRI RAKU	17
1.10 <i>IN VITRO</i> MODELI ZA TESTIRANJE PROTITUMORSKIH UČINKOVIN	17
2 NAMEN DELA	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 MATERIALI	21
3.1.1 KEMIKALIJE IN REAGENTI	21
3.1.2 STANDARDI IN PROTITELESA	22
3.1.3 LABORATORIJSKA OPREMA	23
3.1.4 PUFRI	24
3.1.5 CELIČNA LINIJA U-87.....	25
3.1.6 GOJIŠČA	26
3.2 METODE	27
3.2.1 DELO S CELIČNO LINIJO U-87.....	27
3.2.2 PRIPRAVA CELIČNIH LIZATOV IN KONDICIONIRANEGA GOJIŠČA CELIC U-87	28
3.2.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV PO LOWRY-JU	29
3.2.4 TEST ELISA.....	29

3.2.5	DOLOČANJE AKTIVNOSTI KATEPSINOV	30
3.2.6	UTIŠANJE IZRAŽANJA KATEPSINA B V CELIČNI LINIJI U-87	31
3.2.7	FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA	32
3.2.8	PRETOČNA CITOMETRIJA.....	33
3.2.9	DOLOČANJE INHIBICIJE ZUNAJCELIČNE RAZGRADNJE PROTEINOV ZCM	34
3.2.10	DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI INHIBITORJEV	34
3.2.11	POSTAVITEV 2D CELIČNEGA MODELA TUMORSKE INVAZIJE	35
3.2.12	3D IN VITRO MODEL TUMORSKE INVAZIJE	37
3.2.13	STATISTIČNA ANALIZA	38
4	REZULTATI	39
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN AKTIVNOSTI KATEPSINA B V CELICAH U-87	39
4.2	DOLOČANJE AKTIVNOSTI KATEPSINA X V CELICAH U-87	41
4.3	DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN AKTIVNOSTI KATEPSINA B V UTIŠANIH CELICAH U-87 ..	42
4.4	DOLOČANJE KATEPSINA B NA POVRŠINI CELIC U-87	44
4.5	FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA	44
4.6	DOLOČANJE INHIBICIJE ZNOTRAJCELIČNE RAZGRADNJE PROTEINOV ZCM.....	45
4.7	DOLOČANJE INHIBICIJE ZUNAJCELIČNE RAZGRADNJE PROTEINOV ZCM.....	46
4.8	DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI INHIBITORJEV	47
4.9	POSTAVITEV 2D CELIČNEGA MODELA TUMORSKE INVAZIJE	51
4.10	POSTAVITEV 3D CELIČNEGA MODELA TUMORSKE INVAZIJE	54
5	RAZPRAVA	57
6	SKLEP	62
7	LITERATURA.....	63

KAZALO SLIK

Slika 1. Mehanizem reakcije hidrolize peptidne vezi pri cisteinskih katepsinih.	3
Slika 2. Struktura katepsina B z inhibitorjem CA-030	5
Slika 3. Zaporna zanka na katepsinu B.....	6
Slika 4. Vloga katepsina B v proteolitični kaskadi	12
Slika 5. Prikaz znotrajcelične razgradnje proteinov ZCM.....	12
Slika 6. Kemijska struktura nitroksolina	17
Slika 7. Na podlagi upornosti merjena celična viabilnost in gibljivost.....	18
Slika 8. Shematični prikaz direktnega testa ELISA (84).....	29
Slika 9. Mehanizem utišanja gena s siRNA.....	32
Slika 10. Shematični prikaz CIM-ploščice	36
Slika 11. Umeritveni krivulji za določevanje celokupne koncentracije proteinov v celičnih lizatih (A) in kondicioniranem gojišču (B) celic U-87.....	39
Slika 12. Primerjava celokupnih koncentracij katepsina B v celičnih lizatih (A) in kondicioniranem gojišču (B) celičnih linij U-87 in MCF-10A neoT.....	40
Slika 13. Inhibitorni učinek inhibitorjev nitroksolina in CA-074 na aktivnost katepsina B v celičnih lizatih (A) in kondicioniranem gojišču (B) celic U-87 glede na negativno kontrolo.....	41
Slika 14. Inhibitorni učinek inhibitorjev nitroksolina in CA-074 na aktivnost katepsina X v celičnih lizatih U-87 glede na negativno kontrolo	42
Slika 15. Inhibicija izražanja katepsina B v odvisnosti od časa utišanja gena za katepsin B in koncentracije siRNA	43
Slika 16. Inhibicija aktivnosti katepsina B v odvisnosti od časa utišanja gena za katepsin B in koncentracije siRNA	43
Slika 17. Prisotnost katepsina B na površini celic U-87.....	44
Slika 18. Razgradnja DQ-kolagena IV v celicah U-87	45
Slika 19. Znotrajcelična razgradnja DQ-kolagena IV ob prisotnosti inhibitorjev ali negativne kontrole v celicah U-87	46
Slika 20. Zunajcelična razgradnja DQ-kolagena IV ob prisotnosti inhibitorjev ali negativne kontrole celic U-87	47

Slika 21. Optimizacija števila celic za test citotoksičnosti inhibitorjev. Graf prikazuje celični indeks (vrednost celičnega indeksa je povprečje 4 ponovitev) v odvisnosti od časa inkubacije	48
Slika 22. Odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 4 ponovitev) od časa inkubacije prikazuje rast celic pri optimalnem številu celic (7500 celic/vdolbinico)	48
Slika 23. Odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 4 ponovitev) od časa inkubacije prikazuje vpliv različnih koncentracij nitroksolina na viabilnost celic U-87.....	49
Slika 24. Viabilnost celic po dodatku različnih koncentracij nitroksolina	49
Slika 25. Odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 4 ponovitev) od časa inkubacije prikazuje vpliv različnih koncentracij CA-074 na viabilnost celic U-87.	50
Slika 26. Viabilnost celic po dodatku različnih koncentracij CA-074.....	50
Slika 27. Optimizacija števila celic za test invazije. Graf prikazuje odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 3 ponovitev) v odvisnosti od časa inkubacije	51
Slika 28. Odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 3 ponovitev) utišanih in kontrolnih celic od časa inkubacije.....	52
Slika 29. Utišanje izražanja katepsin B s siRNA inhibira invazijo U-87 celic	52
Slika 30. Odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 3 ponovitev) od časa inkubacije in prisotnosti inhibitorjev CA-074 in nitroksolina.	53
Slika 31. Učinek inhibitorjev nitroksolina in CA-074 na invazijo celic U-87 glede na negativno kontrolo.....	53
Slika 32. Učinek inhibitorjev CA-074Me (A) in nitroksolina (B) na rast sferoidov implantiranih v Matrigel™ glede na negativno kontrolo.....	55
Slika 33. Učinek inhibitorjev (nitroksolina, CA-074 in CA-074Me) na tumorsko invazijo v 3D <i>in vitro</i> modelu tumorske invazije, ki temelji na implantiranju sferoidov v ZCM.	56

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I. Uporabljene kemikalije in reagenti ter njihovi proizvajalci.	21
Preglednica II. Uporabljena laboratorijska oprema in proizvajalec.....	23
Preglednica III. Koncentracija celokupnih proteinov v celičnih lizatih in gojišču celic U-87.....	39
Preglednica IV. Fotografije sferoidov 1.-7. dan po nasaditvi sferoidov pri 10-kratni povečavi.....	i

POVZETEK

Zaradi pomembne vloge katepsina B pri invaziji, angiogenezi in metastaziranju tumorskih celic je ta lizosomska cisteinska proteaza potrjena tarča za načrtovanje novih protitumorskih učinkovin. K tumorski invaziji katepsina B pripomore predvsem njegova vloga pri zunaj- in znotrajcelični razgradnji proteinov zunajceličnega matriksa. V magistrski nalogi smo se osredotočili na postavitev *in vitro* modelov razgradnje proteinov zunajceličnega matriksa in tumorske invazije s pomočjo celične linije U-87, na katerih bi lahko testirali nove inhibitorje katepsina B. V prvem delu magistrske naloge smo s pomočjo testa ELISA, pretočne citometrije in spremljanjem encimske aktivnosti pokazali, da se aktivni katepsin B nahaja znotraj celic U-87, na celični površini in da ga celice izločajo v zunajcelično okolje. Poleg tega smo s pomočjo spremljanja encimske aktivnosti pokazali, da se v celični liniji U-87 nahaja tudi aktivni katepsin X. Uporabljena inhibitorja katepsina B (nitroksolin in CA-074) sta statistično značilno inhibirala patološko endopeptidazno aktivnost znotraj- in zunajceličnega katepsina B. S fluorescenčno mikroskopijo smo posneli razgradnjo fluorescenčnega kolagena in ugotovili tako zunaj- kot znotrajcelično razgradnjo kolagena tipa IV v celicah U-87. V drugem delu naloge smo postavili modele zunaj- in znotrajcelične razgradnje proteinov zunajceličnega matriksa s pomočjo fluorescenčne spektrofotometrije in pretočne citometrije ter 2D in 3D *in vitro* modela tumorske invazije. 2D *in vitro* model smo razvili z uporabo aparature xCELLigence, ki z merjenjem upornosti kvantitativno meri invazivnost tumorskih celic. S pomočjo sferoidov, implantiranih v model zunajceličnega matriksa, smo postavili 3D *in vitro* model tumorske invazije, ki bolje ponazarja invazijo tumorskih celic *in vivo* ter omogoča vizualizacijo tega procesa. Razvite modele razgradnje zunajceličnega matriksa in tumorske invazije smo preizkusili z metodo interferenčne RNA, s katero smo utišali izražanje katepsina B v celicah, ter z uporabo že dokazanih inhibitorjev katepsina B, nitroksolina in CA-074. Dokazali smo, da imajo utišane celice U-87 statistično značilno manjšo invazivnost v 2D *in vitro* modelu tumorske invazije. Inhibitorji katepsina B so statistično značilno zmanjšali znotraj- in zunajcelično razgradnjo kolagena ter tumorsko invazijo celic U-87 na postavljenih 2D in 3D *in vitro* modelih tumorske invazije. Sklenemo lahko, da smo s pomočjo celične linije U-87 uspešno postavili sistem za testiranje novih inhibitorjev katepsina B.

Ključne besede: katepsin B, inhibitorji, *in vitro* modeli, tumorska invazija, katepsin X

ABSTRACT

Lysosomal cysteine protease cathepsin B is a validated target for development of new anti-tumour drugs due to its important role in tumour cell invasion, angiogenesis and metastasis. Particularly important for tumour invasion is its involvement in extra- and intracellular degradation of extracellular matrix proteins. The main goal of our study was to set up the *in vitro* cell-based models of extracellular matrix degradation and tumour invasion using U-87 cell line, which we could use for testing of new cathepsin B inhibitors. First, using ELISA assay, flow cytometry and enzyme kinetics we proved, that cathepsin B is present within the U-87 cells, on the cell surface and that it is secreted into the extracellular environment. In addition, we have also confirmed that the U-87 cells contain active cathepsin X using enzyme kinetics. Treatment of cell lysates and conditioned medium with cathepsin B inhibitors (nitroxoline and CA-074) significantly impaired the endopeptidase activity of cathepsin B. Using fluorescence microscopy we detected both extra- and intracellular degradation of DQ-collagen IV in U-87 cells. In the second part of this study we established cell-based *in vitro* models of extra- and intracellular degradation of extracellular matrix proteins using fluorescence spectrophotometry and flow cytometry. Additionally, we set up a 2D *in vitro* tumour invasion model using the xCELLigence System that quantitatively monitors tumour cell invasion in real-time by measuring the impedance induced by cells. Furthermore, using U-87 spheroids, implanted in extracellular matrix, we also set up a 3D *in vitro* tumour invasion model, which better mimics the avascular stages of tumour growth. The established cell-based models of extracellular matrix degradation and tumour invasion were validated using cathepsin B-specific siRNA-mediated silencing and cathepsin B-specific inhibitors, nitroxoline and CA-074. Cathepsin B-specific silencing of U-87 cells significantly reduced U-87 cell invasion in 2D *in vitro* tumour invasion model. Cathepsin B-specific inhibitors significantly impaired intra- and extracellular collagen degradation as well as U-87 cell invasion in the 2D and 3D *in vitro* tumour invasion models. Taken altogether, in this study we have successfully established a platform for testing new inhibitors of cathepsin B using the cell line U-87.

Keywords: cathepsin B, inhibitors, *in vitro* models, tumour invasion, cathepsin X

SEZNAM OKRAJŠAV

ADMEM	izboljšano Eaglovo gojišče, prilagojeno po Dulbecco-u (<i>angl. Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
AK	aminokislina
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	aspartat, asparaginska kislina
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (<i>angl. bovine serum albumin</i>)
CIM	celična invazija in migracija (<i>angl. cell invasion & migration</i>)
Cys	cistein
Da	Dalton
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiaminotetraacetat
FBS	fetalni goveji serum (<i>angl. fetal bovine serum</i>)
Gly	glicin
Gln	glutamin
Glu	glutamat, glutaminska kislina
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonska kislina
HIF-1 α	s hipoksijo induciran dejavnik 1 α
His	histidin
HRP	hrenova peroksidaza
Ile	izolevcin
MMP	metaloproteaze
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
MT-MMP	membranski tip metaloproteaz (<i>angl. membrane type metaloproteases</i>)
obr	obrat
PBS	fosfatni pufer z dodatkom soli
PEG	polietilenglikol
PET	polietilen tereftalat
Pro	prolin
RFU	relativna enota fluorescence (<i>angl. relative fluorescence unit</i>)
RNA	ribonukleinska kislina
siRNA	mala interferenčna ribonukleinska kislina

TGF- β	transformirajoči rastni dejavnik β
TIMP	tkivni inhibitor metaloproteaz
TMB	tetrametil benzidin
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α
tPA	tkivni aktivator plazminogena
uPA	urokinazni aktivator plazminogena
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik
ZCM	zunajcelični matriks
2D	dvodimenzionalno
3D	trodimenzionalno

1 UVOD

1.1 PROTEAZE

Proteaze (tudi peptidaze, proteinaze ali proteolitični encimi) so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi. Proteaze so udeležene v številnih fizioloških procesih ter vpletene v številne patološke procese v živih organizmih. Poleg nespecifične razgradnje peptidov proteaze prepoznajo ter cepijo specifične substrate, kar omogoča natančno regulacijo mnogih procesov v telesu, kot so uravnavanje celičnega cikla, celična proliferacija, programirana celična smrt, podvajanje DNA, preoblikovanje tkiv, hemostaza, celjenje ran, imunski odziv, oploditev, razvoj zarodka, resorpcija kostnega tkiva, aktivacija citokinov in prohormonov, razraščanje nevronov in angiogeneza (1, 2, 3, 4).

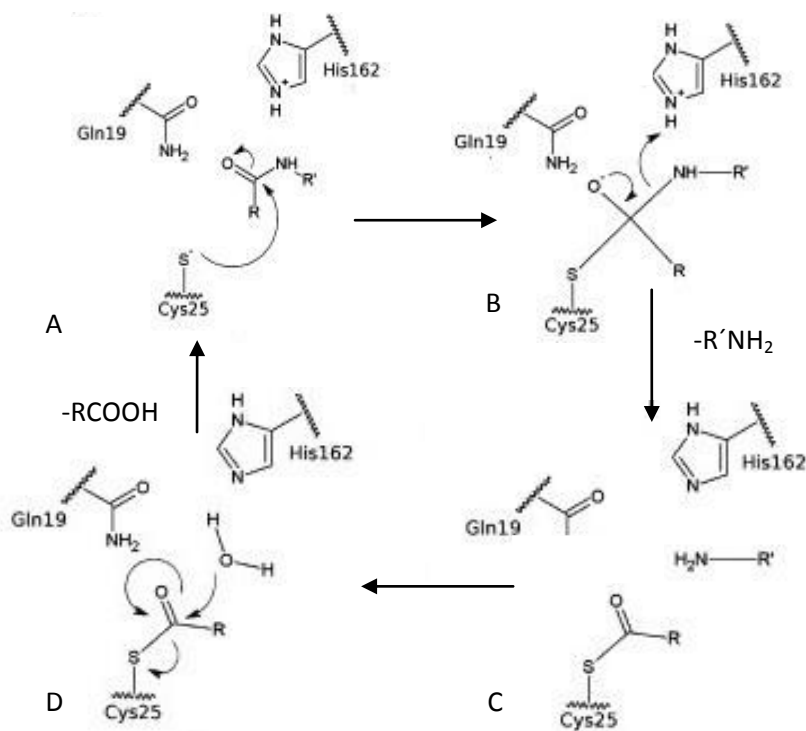
Proteaze lahko razdelimo glede na mehanizem katalize, mesto cepitve substrata in glede na število od substrata odcepljenih aminokislin (1). Glede na mehanizem katalize jih delimo na asparaginske, cisteinske, metalo, serinske, treoninske proteaze in proteaze neznanega tipa (5). Pri cisteinskih, serinskih in treoninskih proteazah kot nukleofil v hidrolizo peptidne vezi vstopajo katalitični aminokislinski ostanki v aktivnem mestu - cistein, serin in treonin (kovalentna kataliza), medtem ko pri metalo in asparaginskih proteazah kot nukleofil za hidrolizo peptidne vezi služi aktivirana molekula vode (nekovalentna hidroliza) (1, 5). Proteaze delimo na eksopeptidaze in endopeptidaze, odvisno od mesta cepitve njihovega substrata. Eksopeptidaze, ki cepijo substrat na koncu polipeptidne verige, delimo na karboksipeptidaze (cepitev na C-terminalnem koncu) in aminopeptidaze (cepitev na N-terminalnem koncu). Eksopeptidaze lahko odcepijo različno število aminokislin, zato jih delimo na mono-peptidaze (1 odcepljena aminokislina), dipeptidaze, tripeptidaze, omegapeptidaze, itn. Endopeptidaze cepijo peptidno vez znotraj polipeptidne verige (5). Zaradi pomembne vloge proteaz v številnih bioloških procesih, ima njihovo nepravilno delovanje za posledico različne bolezni: nevrodegenerativne, kardiovaskularne, vnetne in avtoimunske bolezni, bakterijske, virusne in parazitske okužbe ter rak (1, 2, 6).

1.2 CISTEINSKE PROTEAZE

Razred cisteinskih proteaz delimo na klane (CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO, CP in nerazvrščene proteaze), klane pa v družine. Največja od 24 družin je družina C1, ki se naprej deli na poddružini C1A in C1B. V poddružino C1A uvrščamo papain in njemu podobne lizosomske cisteinske proteaze ali imenovane tudi cisteinski katepsini (5, 7). Človeški genom vsebuje 11 cisteinskih katepsinov (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W in X), ki so dobro poznani in definirani (molekularno, strukturno in biokemijsko) (8). Cisteinski katepsini so papainu podobni encimi, saj imajo podobno aminokislinsko zaporedje in strukturo, vendar se razlikujejo v substratni specifičnosti, inhibitorski aktivnosti in specifičnosti regulacije (7, 9). Za lizosomske cisteinske proteaze so dolgo časa predvidevali, da se nahajajo le v lizosomih in endosomih, kar pove že samo ime. Novejše raziskave pa so pokazale nahajanje cisteinskih katepsinov v jedru, citosolu in na celični membrani, izločajo pa se tudi v okolico celic. Aktivacija prohormonov, sprožitev programirane celične smrti, sodelovanje pri migraciji celic in napredovanju raka so vloge cisteinskih katepsinov izven lizosomov (8, 10, 11, 12). Z raziskavami na miškah z izbitimi geni za katepsine so ugotovili pomembno vlogo cisteinskih katepsinov v specializiranih bioloških procesih, kot so razgradnja proteinov, resorpcija kostnega tkiva, uravnavanje rasti dlak, imunski odziv, apoptoza, diferenciacija keratinocitov, celična proliferacija, aktivacija proencimov ter prohormonov. Njihovo nepravilno delovanje se kaže v nevrodegenerativnih boleznih, osteoporozi, virusnih okužbah, revmatoidnem artritisu, aterosklerozi, raku in periodontitisu. Če pride do mutacije na genih, ki kodirajo za katepsine, se lahko izrazijo nekatere dedne bolezni, kot so piknodisostoza, sindrom Papillo-Lefevre in sindrom Haim-Munk (4, 13, 14, 15).

Cisteinski katepsini so monomeri z molekularno maso približno 30 kDa (izjema je tetramerni katepsin C) in so zgrajeni iz težke in lahke verige, ki sta povezani z disulfidno vezjo. Katepsini so sestavljeni iz leve domene (N-terminalni konec polipeptidne verige), ki je sestavljena iz treh α -vijačnic, in desne domene (C-terminalni konec polipeptidne verige), kjer prevladuje β -motiv v obliki sodčka. Med obema domenama se nahaja aktivna reža v obliki črke V, kamor se veže substrat v iztegnjeni konformaciji. (7). Aktivno mesto tvorita Cys25 (številčenje po papainu), ki se nahaja na osrednji α -vijačnici N-terminalega dela, in His159, ki je na desni domeni. Cys25 ima neobičajno nizek pKa za tiolno skupino (2,5-3,5) in tvori s His159 tiolat-imidazolijev ionski par. Nižji pKa zaradi tvorbe ionske

vezi poveča katalitično učinkovitost Cys25, ki s tiolno skupino napade karbonilni C-atom na substratu. Poleg teh dveh aminokislin imata pri proteolizi pomembno vlogo še Gln19 in Asn175. Prva aminokislina sodeluje pri vzpostavitvi oksanionskega intermedata, druga pa pomaga pri orientaciji imidazolovega obroča (5, 7, 14). Mehanizem katalize cisteinskih proteaz je prikazan na Sliki 1.



Slika 1. Mehanizem reakcije hidrolize peptidne vezi pri cisteinskih katepsinih. Po napadu nukleofilnega tiolata (A) nastane tetraedrični oksanionski intermedat (B). Sledi odcep C-terminalnega dela polipeptidne verige in nastanek tioestrsko vezi med substratom in encimom (C). Molekula vode napade tioestrsko vez in odcepi še N-terminalni del peptidne verige (D) (16).

Večina cisteinskih proteaz je endopeptidaz, razen katepsinov B, C, H in X. Te delujejo kot eksopeptidaze zaradi dodatnega strukturnega elementa v reži z aktivnim mestom, ki omejuje dostop daljšim substratom do aktivnega mesta, hkrati pa omogoča dodatne elektrostatske vezi z aminokislinskimi ostanki substrata. Dodatna struktura je lahko zaporna zanka (katepsin B in X), propetid (katepsin H) ali izključitvena domena (katepsin C). Katepsina B in H imata endo- in eksopeptidazno aktivnost, katepsina C -in X pa le eksopeptidazno aktivnost (7, 14).

Spremenjeno delovanje cisteinskih katepsinov pripomore k različnim bolezenskim procesom v telesu, zato so obetajoče tarče pri terapiji raka, motnjah imunskega sistema,

osteoporozе, revmatoidnega artritisa in osteoartritisa. Ker je njihovo izražanje spremenjeno pri mnogih boleznih, imajo velik potencial tudi kot prognostični, diagnostični in napovedni kazalci. Velik potencial imajo zlasti pri raku, saj je njihovo izražanje pri številnih rakih povečano (9, 10, 14, 17, 18, 19, 20).

1.3 KATEPSIN B – SINTEZA, STRUKTURA IN AKTIVNOST

Katepsin B uvrščamo v razred lizosomskih cisteinskih proteaz (klan CA, družina C1, poddružina C1A) (5). Gen za katepsin B leži na kromosomu 8 v regiji p22-p23.1 in je sestavljen iz 13 eksonov (vključuje eksona 2a in 2b) (21, 22).

Sinteza prokatepsina B (339 AK), ki je sestavljen iz vodilnega peptida, inhibitornega propeptida, zrele oblike encima in C-terminalnega propeptida, poteka na ribosomih zrnatega endoplazmatskega retikuluma, kjer ob sintezi poteče tudi cepitev 17 AK dolgega vodilnega peptida. Prokatepsin B potem vstopi v lumen zrnatega endoplazmatskega retikuluma in naprej v Golgijev aparat, kjer poteče N-glikozilacija proencima. Sledi fosforilacija manoznih ostankov in vezava proencima na manozna-6-fosfatne receptorje, ki se nahajajo na membrani Golgijevega aparata. To omogoči razvrščanje prokatepsina v zgodnje endosome, ki se kasneje zlijejo z lizosomi. Med zorenjem se v lizosomih zniža pH, kar povzroči disociacijo prokatepsina B od receptorjev in odstranitev obeh propeptidov prokatepsina B (na N- in C- terminalnem delu). Nastane enoverižni aktivni katepsin B, ki se lahko nadalje cepi do nastanka dvoverižne oblike encima. Dvoverižno obliko sestavljata težka (25/26 kDa) in lahka (5 kDa) veriga, povezani z disulfidno vezjo (23, 24, 25). Aktivacijo katepsina B lahko katalizirajo proteaze (katepsin D, G, L, pepsin, tPA, uPA, elastaze) ali pa pride do avtokatalitične aktivacije encima pri kislem pH ali ob prisotnosti glikozaminoglikanov, kar povzroči odmik propeptida iz reže z aktivnim mestom. Po odmiku propeptida iz aktivnega mesta proencima nastane aktiven proencim. Hkrati pa pri odmiku iz reže z aktivnim mestom propeptid postane tudi substrat. Ko prideta dve molekuli aktiviranega proencima blizu skupaj, ena molekula cepi propeptid druge molekule aktiviranega proencima. Nastane aktivni encim, ki potem cepi druge proencime. Propeptid katepsina B deluje kot inhibitor encima, kot stabilizator pri alkalnem pH in skrbi za razvrščanje encima v celici (7, 23, 26, 27, 28, 29).

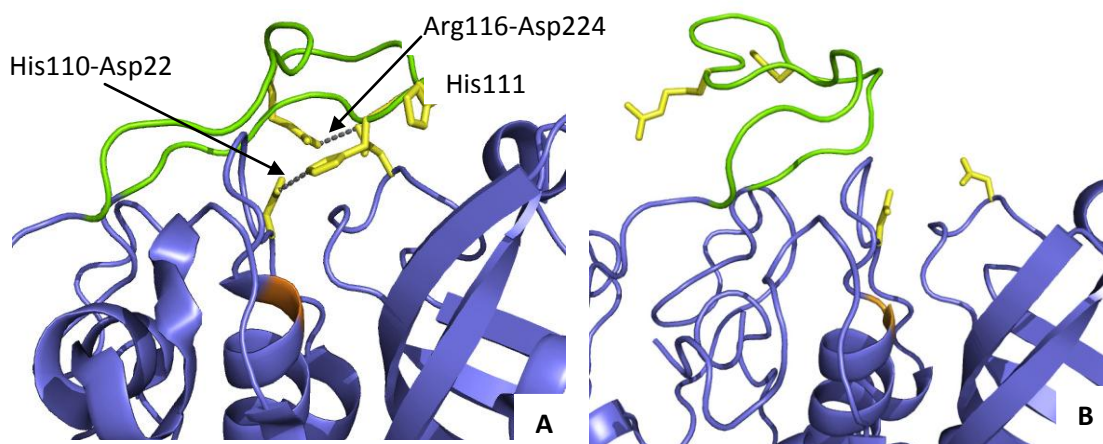
Katalitično triado katepsina B sestavljajo aminokisliline Cys29, His199 in Asn219. Cys29 in His199 se nahajata na dnu reže z aktivnim mestom. Sprva poteče deprotonizacija tiolne skupine Cys29 z bazičnim imidazolom His199 pri pH 4,0-8,5. Aktivirana tiolna skupina (tiolatni anion) pa potem napade karbonylni C-atom v polipeptidni verigi substrata (23, 30). Pri cisteinskih katepsinih poznamo 5 dobro definiranih podmest, kamor se vežejo substrati - S3, S2, S1, S1' in S2'. Podmesto je površina na encimu, ki tvori interakcije z enim aminokislinskim ostankom polipeptidnega substrata. Prispevki vseh podmest skupaj so odgovorni za specifičnost encima za substrat. Pri katepsinu B se v podmestu S1 nahaja Cys29, v podmestu S1' pa His199 (30, 31).



Slika 2. Struktura katepsina B z inhibitorjem CA-030. Z rumeno barvo je označen katalitični Cys29, z roza His199 in Asn219, z vijolično pa His110. S sivo barvo je predstavljen inhibitor CA-030 (5).

Katepsin B ima podobno strukturo (Slika 2) kot ostale cisteinske proteaze, razlikuje se le v enem dodatnem strukturnem elementu - zaporni zanki. Zaporna zanka (21 AK) se nahaja na vrhu molekule encima, kjer zapira režo z aktivnim mestom in je tako odgovorna za endo- in eksopeptidazno (peptidildipeptidazno) aktivnost katepsina B. Katepsin B se lahko nahaja v eksopeptidazni ali endopeptidazni konformaciji (32). V eksopeptidazni ali zaprti konformaciji (Slika 3A) je zaporna zanka vezana na telo encima z dvema solnima mostičkoma (His110-Asp22 in Arg116-Asp224), kar onemogoči dostop endopeptidaznih substratov v podmesta S2'-S3'v aktivnem mestu. Zaradi tega je katepsin B šibkejša endopeptidaza od ostalih cisteinskih katepsinov. Poleg tega se na vrhu zanke nahaja aminokislina His111, ki v zaprti konformaciji vstopa v interakcije s C-terminalnim

karboksilatoma substrata in tako ojača eksopeptidazno aktivnost encima (33). Ko pride do prekinitve solnih mostičkov, ki vežejo zanko na telo encima, se zaporna zanka odmakne od reže z aktivnim mestom in omogoči vezavo endopeptidaznih substratov (Slika 3B) (31, 34).



Slika 3. Zaporna zanka na katepsinu B. Katepsin B v eksopeptidazni (A) in endopeptidazni (B) konformaciji. Z zeleno barvo je označena zaporna zanka, z rumeno pa aminokislinski ostanki. S puščicami so prikazani solni mostički. Z oranžno barvo je na sliki A in B označen aktivni Cys29 (35).

1.4 URAVNAVANJE AKTIVNOSTI KATEPSINA B

Delovanje katepsina B je odvisno od številnih dejavnikov: regulacije izražanja katepsina B, procesiranja encima, pH in redoks potenciala mikrookolja, lokalizacije encima (zunaj- ali znotrajcelična), prisotnosti glikozaminoglikanov ter inhibicije z endogenimi proteinskimi inhibitorji. Ker je katepsin B vpleten v številne fiziološke procese v telesu, je njegova aktivnost strogo regulirana na vseh zgoraj naštetih nivojih.

a) Regulacija izražanja katepsina B

Poznanih je več različnih transkriptov katepsina B, katerih prisotnost je odvisna od tipa in stopnje diferenciacije celic. Lahko so posledica alternativnega spajanja 13 eksonov ali izbire alternativnih promotorjev na genu za katepsin B. Različne spojivene variante se razlikujejo v stabilnosti in hitrosti prevajanja, le-ti pa se lahko odražata v prekomernem izražanju katepsina B, kar privede do patoloških procesov (22, 36). Poleg tega so odkrili, da lahko alternativno spajanje vpliva tudi na lokalizacijo encima. Spojitvena varianta brez eksonov 2 in 3 tako povzroči nastanek krajše oblike katepsina B, ki nima vodilnega peptida

in propeptida. Ta oblika encima ne potuje v endosome in lizosome, ampak na citosolno stran membranskih celičnih organelov, kot so mitohondriji in jedro, kjer sodeluje pri celični smrti in drugih pomembnih celičnih procesih (37).

b) Lokalizacija Katepsina B

Aktivnost Katepsina B je odvisna od njegove lokalizacije. Poleg že dolgo znane proteolitične razgradnje proteinov v lizosomih ima encim še druge pomembne vloge v citosolu celic, kot je npr. sprožitev apoptoze celic. Katepsin B se lahko nahaja tudi na površini celic in izloča v okolico celic, kjer razgrajuje ZCM in pripomore k invaziji, angiogenezi in metastaziranju tumorskih celic (25, 26, 38).

c) pH in redoks potencial mikrookolja

pH je eden izmed pomembnejših regulatorjev aktivnosti Katepsina B. Katepsin B ima dva pH optimuma delovanja, ki sta posledica prisotnosti zaporne zanke. Pri nizkem pH zaporna zanka zapira režo z aktivnim mestom in tako omogoča le eksopeptidazno aktivnost encima. Ob dvigu pH se zaporna zanka odmakne in Katepsin B lahko cepi tudi endopeptidazne substrate. Endopeptidazna aktivnost ima maksimum delovanja pri pH višjem od 7,0 (34). Kot endopeptidaza Katepsin B cepi predvsem proteine ZCM in pripomore k tumorski invaziji ter metastaziranju. Endopeptidazna aktivnost Katepsina B je bila opažena v endosomih, na površini celic in pri Katepsinu B, ki ga celica izloči v okolico. Eksopeptidazna aktivnost Katepsina B ima optimum pri pH okrog 5,0. Kot eksopeptidaza encim deluje večinoma le v lizosomih (25, 34, 39). Tudi reducirajoče okolje pomembno vpliva na aktivnost in stabilnost Katepsina B. Katepsin B ima največjo aktivnost v reducirajočem okolju znotraj lizosomov zaradi reaktivne tiolne skupine v aktivnem mestu, ki ima tendenco za tvorjenje disulfidne vezi v oksidirajočem okolju. Vendar so nekatere raziskave pokazale na možnost razgradnje substratov Katepsina B tudi v oksidirajočem mikrookolju zunaj celic (40).

d) Glikozaminoglikani

Na aktivnost Katepsina B vplivajo tudi glikozaminoglikani, kot je heparan sulfat. Le-ta se nahaja na površini celic in v ZCM ter vstopa v interakcije s His111 na zaporni zanki encima. Heparan sulfat inhibira eksopeptidazno aktivnost Katepsina B in stabilizira encim pri višjih vrednostih pH, s čimer potencira endopeptidazno aktivnost Katepsina B, ki je odgovorna za razgradnjo proteinov ZCM in tumorsko invazijo (39).

e) **Endogeni proteinski inhibitorji**

Regulacija aktivnosti katepsina B z endogenimi proteinskimi inhibitorji je natančneje predstavljena v nadaljevanju v poglavju 1.8 Inhibitorji katepsina B.

1.5 KATEPSIN X

Katepsin X, imenovan tudi katepsin Z, Y ali P, je lizosomska cisteinska proteaza (klan CA, družina C1, poddružina C1A), ki v svoji strukturi poseduje več posebnosti v primerjavi z drugimi lizosomskimi cisteinskimi proteazami: zelo kratko proregijo (38 AK) in dva peptidna vključka. Poseben pa je tudi v lokaciji gena, ki se nahaja na 20. kromosomu v regiji q13 (41). Krajši peptidni vključek, velik 3 AK (His-Ile-Pro), se nahaja v bližini Gln v oksanionski luknji in je odgovoren za substratno specifičnost katepsina X. Ta kratki peptidni vključek je del mini zanke, ki naj bi bila odgovorna za strogo eksopeptidazno aktivnost katepsina X (42). Drugi peptidni vključek je velik 15 AK (Cys109-Asn123) in tvori β -vijačnice. Njegova vloga ni poznana. Izjemno kratka propeptidna regija, ki je pri katepsinu X najkrajša, vsebuje Cys^{10p}, ki mu pripisujejo vlogo v regulaciji in katalitični aktivnosti encima (43).

Katepsin X je monomerna molekula, sestavljena iz dveh domen. Leva domena je pretežno zgrajena iz α -vijačnic, desna pa iz β -strukture. Med domenama se nahaja reža z aktivnim mestom, v katerem se nahajajo Cys31, His180 in Asn200 (43). Katepsin X ima lahko karboksimonopeptidazno ali karboksidiptidazno aktivnost. Z raziskavami so pokazali, da His23, ki se nahaja v mini zanki katepsina X, preko pozitivno nabitega imidazolnega obroča preklaplja med dvema konformacijama encima in posledično med karboksimonopeptidazno in karboksidiptidazno aktivnostjo katepsina X (42).

Katepsin X se nahaja pretežno v imunskih celicah, predvsem v makrofagih, monocitih in dendritičnih celicah. Povečano izražanje katepsina X so odkrili v tumorskih in imunskih celicah prostate, karcinomu želodca (po okužbi s *Helicobacter pylori*), možganih bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo, v celicah živčnega sistema ob staranju ter v mišjih možganskih celicah, zlasti v gliomu (44). V novejših študijah preučujejo uporabo katepsina X v serumu bolnikov s kolorektalnim rakom kot prognostičnega kazalca preživetja teh bolnikov (20). Zaradi vezave heparan sulfata na površini celice in prisotnosti vezavnih mest za integrine (RGD regija (Arg-Gly-Asp) v prokatepsinu in ECD regija (Glu-Cys-Asp) v zrelem

katepsinu) je katepsin X udeležen v preko integrinov posredovanem celičnem signaliziranju, adheziji in migraciji celic. Katepsin X cepi β 2-podenoto integrinov in se tako vpleta v regulacijo aktivnosti imunskih celic. Integrini posredujejo dinamične adhezivne medcelične interakcije ter interakcije med celicami in ZCM, ki so ključne za številne fiziološke procese, vključno z učinkovitim imunskim sistemom (45). Spremenjena aktivnost katepsina X povzroči nepravilno uravnavanje imunskega sistema, kar ima lahko za posledico patološke procese, med njimi tudi maligne. Prekomerno aktivne imunske celice namreč sproščajo različne pro-tumorigene dejavnike (46). Zaradi povečanega izražanja katepsina X v tumorskih celicah, ga povezujejo z rastjo in napredovanjem tumorjev. Na transgenih miškah z izbitimi geni za katepsin B in X so pokazali pomembno vlogo obeh katepsinov (neodvisno drug od drugega) pri zgodnji tvorbi tumorjev, kjer naj bi katepsin X preko vezave na integrine prispeval k začetnim stopnjam nastanka tumorjev (47).

1.6 FIZIOLOŠKA IN PATOLOŠKA VLOGA KATEPSINA B

Katepsin B se nahaja v različnih tipih celic v telesu. Gen za katepsin B je hišni gen in se izraža konstitutivno v različnih celičnih tipih (22). Poleg že dolgo poznane vloge pri lizosomski razgradnji proteinov, ki so eksogenega izvora ali celici lastni, ima katepsin B pomembne funkcije tudi v bolj specializiranih fizioloških in patoloških procesih. Fiziološki procesi, kjer že vemo, da ima katepsin B pomembno vlogo so: predstavitev antigenov, preoblikovanje ZCM, kostna resorpcija, aktivacija encimov, razvoj in vzdrževanje ravnovesja centralnega živčnega sistema, migracija keratinocitov, apoptoza in sproščanje ščitničnih hormonov iz tiroglobulina (10, 23, 38, 48). Kadar pride do sprememb v regulaciji aktivnosti katepsina B v telesu, se lahko pojavijo bolezni, kot so vnetje trebušne slinavke, revmatoidni artritis, osteoartritis, virusne infekcije, Alzheimerjeva bolezen in rak (10, 49, 50).

1.7 VLOGA KATEPSINA B PRI RAKU

V letu 2012 so raka diagnosticirali 3,45 milijonom prebivalcem Evrope, 1,75 milijona Evropejcev pa je istega leta zaradi posledic raka umrlo (51). Poznanih je šest bioloških lastnosti celic, ki so potrebne za razvoj in napredovanje raka: neodvisnost od zunanjih

rastnih dejavnikov, neodzivnost na dejavnike, ki zavirajo rast, sposobnost neomejene delitve celic, izogibanje programirani celični smrti, sposobnost spodbujanja angiogeneze ter aktivacija tumorske invazije in metastaziranja. Na podlagi raziskav v zadnjem desetletju bi lahko k tem značilnostim dodali še zmožnost izogibanja imunskemu sistemu in reprogramiranje celičnega metabolizma, ki zagotavlja tumorskim celicam energijo (52). Katepsin B ima pomembno vlogo pri rasti in napredovanju raka. Sodeluje namreč pri nastanku, rasti, angiogenezi, invaziji in metastaziranju tumorjev (18, 53). Povezavo katepsina B z rakom so pokazali s številnimi raziskavami na mišjih modelih z izbitim genom za katepsin B, z inhibitorji katepsina B in spremenjenim izražanjem katepsina B v različnih celičnih linijah (8).

1.7.1 IZRAŽANJE IN AKTIVNOST KATEPSINA B PRI RAKU

V tumorskih celicah sta izražanje in aktivnost katepsina B močno povečana. Razlogi za povečano izražanje encima v tumorskem tkivu so povečano število kopij, povečan obseg prepisovanja in stabilnost gena za katepsin B, prisotnosti alternativnih spojitenih variant ter alternativnih promotorjev gena za encim. Povečano izražanje katepsina B so zaznali tudi v okoliških celicah tumorja (imunskih celicah, makrofagih, fibroblastih, endotelijskih in mioepitelijskih celicah), kar dodatno pripomore k širjenju in napredovanju tumorja s preoblikovanjem ZCM. Poleg spremenjenega izražanja v tumorskih celicah se poveča tudi aktivnost katepsina B, ki je povezana s porušenim ravnovesjem med katepsinom B in njegovimi endogenimi inhibitorji v organizmu (19, 53, 54). Ker je napredovanje raka povezano s spremenjenim izražanjem in aktivnostjo katepsina B, je katepsin B primeren kot prognostični kazalec pri bolnikih z rakom. Klinične študije so pokazale potencialno vlogo katepsin B kot prognostičnega kazalca preživetja bolnikov z različnimi oblikami raka (dojke, jajčnikov, materničnega vratu, prostate, možganov, glave in vratu, pljuč, melanomu, debelega črevesa, ščitnice in trebušne slinavke) (10, 26, 55).

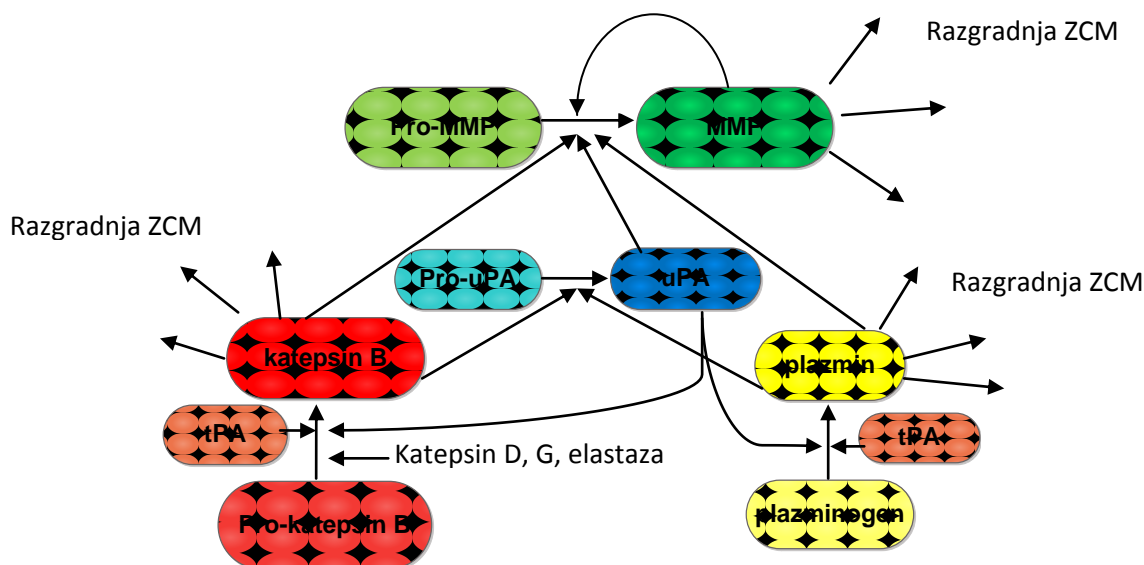
1.7.2 LOKALIZACIJA KATEPSINA B PRI RAKU

Katepsin B je normalno prisoten predvsem v lizosomih in endosomih okrog jedra, kjer proteolitično razgrajuje proteine. Pri transformiranih in rakavih celicah pa se katepsin B nahaja tudi v perifernih regijah citoplazme in na zunanji strani membrane (v kaveolah). Katepsin B se nahaja tudi v veziklih psevdopodijev - izrastkov celice, v katerih poteka razgradnja ZCM. Poleg tega je povečano izločanje katepsina B in njegovega proencima v okolico tumorskih celic, kjer katepsina B razgrajuje ZCM in pripomore k invaziji,

angiogenezi in metastaziranju tumorskih celic (25, 26, 56, 57). Povečano izražanje katepsina B je prisotno na robu tumorskega tkiva zaradi interakcije med tumorskimi in stromalnimi celicami s komponentami ZCM. Tako so pokazali, da interakcija stromalnih fibroblastov dojke s kolagenom tipa I poveča izločanje katepsina B (25, 26, 58). O mehanizmu izločanja katepsina B in prokatepsina B iz celic je še veliko neznanega. Predvideva se, da je izločanje prokatepsina B posledica eksocitoze lizosomov zaradi povečane kislosti mikrookolja tumorja. Ker je lizosomska eksocitoza neselektiven proces, naj bi bilo povečano izražanje katepsina B vzrok za izločanje le prokatepsina B in ne tudi drugih cisteinskih proteaz. Možen vzrok za povečano izločanje katepsina B je tudi okvara manoza-6-fosfatnih receptorjev (25).

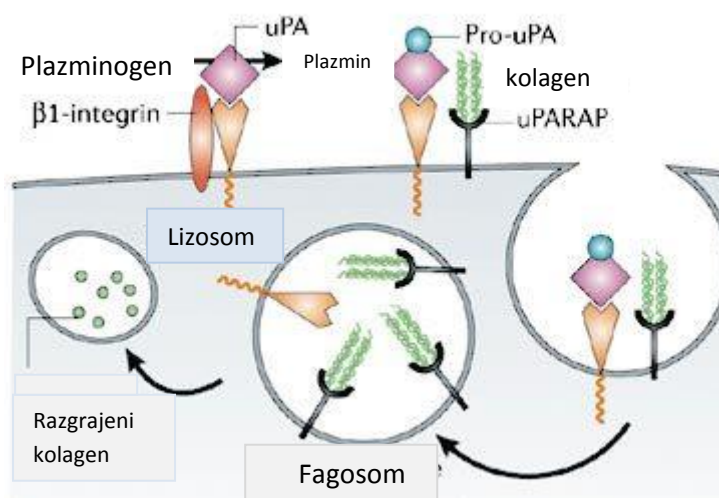
1.7.3 KATEPSIN B IN RAZGRADNJA PROTEINOV ZCM

Katepsin B razgrajuje proteine ZCM tako znotraj kot tudi zunaj tumorskih celic, kar so potrdili na modelu razgradnje s fluoresceinom označenega kolagena tipa IV. Udeležnost katepsina B v teh procesih so dokazali z visoko specifičnimi inhibitorji katepsina B, ki so zmanjšali obseg znotraj- in zunajcelične razgradnje kolagena tipa IV v tumorskih celicah raka dojke (53, 57). Poleg tega so na primeru glioblastomske celične linije pokazali, da katepsin B kolokalizira z razgradnjo laminina na površini tumorskih celic (57). Katepsin B se na površini tumorskih celic nahaja v t.i. kaveolah, ki so s proteinom kaveolinom 1 bogati uvihki membrane. Kaveole so udeležene pri endocitozi, transportu holesterola in pri celičnem signaliziranju. Prokatepsin B je v kaveolah vezan na lahko verigo aneksin II heterotetramera, na katero so vezani še proteazi plazminogen in tPA, kolagen tipa I, heparin in tenascin. V kaveolah se nahajajo še receptor za uPA, β 1-integrin in metaloproteaze (MMP-2 in MT-MMP). Katepsina D in G, tPA, uPA in elastaze pretvorijo prokatepsin v katepsin B. Aktivirani katepsin B v kaveolah igra pomembno vlogo kot direktni aktivator uPA, ki potem cepi plazminogen v aktivni plazmin, in MMP. Katepsin B pa lahko tudi preko aktivacije uPA posredno aktivira MMP. Metaloproteaze, npr. MMP-14, lahko razgrajujejo proteine ZCM (kolagen tipa I in IV ter proteoglikane) ali pa aktivirajo še druge MMP (npr. MMP-2). Plazmin razgrajuje fibrin, fibronektin, laminin in proteoglikane, ki so vse sestavine ZCM. Katepsin B torej predstavlja pomemben člen v proteolitični kaskadi znotraj kaveol (Slika 4); prekomerno izražanje le ene od proteaz proteolitične kaskade pa vodi v pospešeno razgradnjo ZCM (25, 53, 59).



Slika 4. Vloga katepsina B v proteolitični kaskadi (26).

Katepsin B v lizosomih znotrajcelično razgrajuje že delno razgrajene proteine ZCM, ki se po fagocitozi nahajajo znotraj celice (Slika 5). Za prevzem kolagena v fagosom je odgovoren endocitozni receptor uPARAP (protein povezan z receptorjem za urokinazni aktivator plazminogena), ki tvori trimolekularni kompleks s pro-uPA in uPAR. Razgradnja komponent ZCM lahko poteka pri kislem (v lizosomih) in nevtralnem pH (na površini in v okolici celice) (53, 60).



Slika 5. Prikaz znotrajcelične razgradnje proteinov ZCM (53).

1.7.4 VLOGA KATEPSINA B PRI TUMORSKI INVAZIJI IN METASTAZIRANJU

Katepsin B ima pomembno vlogo pri invaziji in metastaziranju tumorskih celic, saj direktno ali indirektno (preko proteolitične aktivacije drugih proteaz – MMP, uPA, plazmina) razgrajuje proteine ZCM, kar omogoča invazijo celic v okoliško tkivo in prehod tumorskih celic iz mesta primarnega tumorja v krvni obtok. Kadar tumorske celice tvorijo tumorsko tkivo, ki se nahaja na mestu oddaljenem od primarnega tumorja, govorimo o sekundarnih tumorjih ali metastazah (26). Na modelu transgenih mišk, ki spontano razvijejo raka dojke in imajo izbit gen za katepsin B, so pokazali, da katepsin B bistveno pripomore k invaziji in metastaziranju rakavih celic, saj je izbitje gena za katepsin B povzročilo manjšo rast tumorjev in manjše število metastaz v pljučih (54).

1.7.5 VLOGA KATEPSINA B PRI ANGIOGENEZI

Angiogeneza ali neovaskularizacija je proces, ki je nujno potreben za invazivno tumorsko rast in metastaziranje. Ko tumor doseže velikost 1-2 mm, se zaradi omejenega dostopa do hranil in kisika, prične proces nastanka novih žil. V tumorju pride do t.i. angiogenega preklopa, pri katerem pro-angiogeni dejavniki prevladajo nad anti-angiogenimi dejavniki, kar ima za posledico začetek razgradnje ZCM, ki spodbuja nastanek novih žil. Katepsin B pomembno prispeva tudi pri procesu angiogeneze z razgradnjo komponent ZCM, ki je predpogoj za nastanek novega žilja, saj le-ta omogoči premik proliferiranih endotelijskih celic k tumorju (26, 59). Poleg tega katepsin B razgrajuje tkivne inhibitorje metaloproteaz (TIMP), kar povzroči večjo aktivnost MMP, razgradnjo ZCM in posledično angiogenezo. Katepsin B povzroči tudi sproščanje pro-angiogenih rastnih dejavnikov, kot so VEGF in TGF- β , iz komponent ZCM. Le-ti so namreč vezani na proteine ZCM (fibronektin in kolagen tipa IV) in se sprostijo po razgradnji ZCM s proteazami (katepsinom B, MMP). Znano je tudi, da katepsin B preko uPA aktivira rastni dejavnik TGF- β (18, 26). V nedavno opravljeni raziskavi so pokazali, da sočasno utišanje gena za katepsina B in uPAR zmanjša migracijo in proliferacijo endotelijskih celic preko delovanja na VEGF/VEGFR signalno pot (61). Pri nastanku novega žilja v tumorju pa ima katepsin B tudi anti-angiogeno delovanje. Katepsin B razgrajuje kolagen tipa XVIII in tako sprošča anti-angiogeni dejavnik endostatin. Zmanjša pa tudi izražanje VEGF preko destabilizacije njegovega transkripcijskega dejavnika HIF-1 α s proteolizo proteina, ki stabilizira HIF-1 α . (62). V raziskavah *in vitro* ter *in vivo* na glioblastomskih tumorskih celicah so dokazali, da se z

inhibicijo izražanja katepsina B in metaloproteaze MMP-9 z metodo interferenčne RNA zmanjša tumorska invazija, rast in angiogeneza (63).

1.8 INHIBITORJI KATEPSINA B

Inhibitorje katepsina B delimo glede na izvor na endogene in eksogene inhibitorje.

1.8.1 ENDOGENI INHIBITORJI KATEPSINA B

Zelo pomemben mehanizem regulacije aktivnosti katepsina B predstavljajo endogeni proteinski inhibitorji iz naddružine cistatinov, ki inhibirajo endopeptidazne katepsine v pikomolarnem območju in eksopeptidazne katepsine v nanomolarnem območju (7). V naddružino cistatinov spadajo številni homologni proteini, ki inhibirajo papainu podobne proteaze in jih nadalje razdelimo v 3 družine: stefine (družina I), cistatine (družina II), in kininogene (družina III). Vsi cistatini so reverzibilni, tesno prilegajoči in neselektivni inhibitorji, ki v svoji peptidni verigi vsebujejo elemente, ki sestavljajo klinu podobno 3D strukturo. Struktura klina se umesti v režo z aktivnim mestom cisteinskih proteaz in tako prepreči vezavo substrata v aktivno mesto encima. Endogeni proteinski inhibitorji šibkeje inhibirajo katepsin B kot ostale cisteinske katepsine zaradi prisotnosti zaporne zanke. Za vezavo endogenega proteinskega inhibitorja na katepsin B je zatorej odločilen odmik zaporne zanke iz reže z aktivnim mestom encima, kar omogoči močnejšo vezavo inhibitorja (31, 64).

Cistatini iz družine I ali stefini se v glavnem nahajajo v citosolu celic, pri rakavih boleznih pa se v povečanih koncentracijah pojavljajo tudi v telesnih tekočinah bolnikov. Najbolj poznana sta stefin A in B. Cistatini iz družine II ali cistatini se za razliko od stefinov sintetizirajo s signalnim propeptidom, ki poskrbi za prehajanje cistatinov iz celice v zunajcelično okolje. Cistatini so zato zunajcelični inhibitorji, od katerih je najbolj raziskan cistatin C (65, 66). Poleg cistatinov so poznani še drugi endogeni inhibitorji, kot so tirocini, propeptidu podobni inhibitorji, serpini in inhibitorji tipa β -sodčka (14).

Cistatine preučujejo kot prognostične kazalce za nekatere vrste raka. Pri pacientih z gliomskim tumorjem so ugotovili, da zmanjšano izražanje cistatina C korelira s krajšo dobo preživetja bolnikov (66). Pri raku pride do povečane aktivnosti katepsina B, kar ima lahko vzrok v porušenem ravnovesju med katepsinom B in njegovimi endogenimi inhibitorji, ki uravnavajo njegovo aktivnost. Do porušenega ravnovesja lahko pride zaradi

zmanjšane ali premalo povišane koncentracije cistatinov v primerjavi z močno povišanimi koncentracijami katepsina B ali zaradi spremembe v molekularni strukturi cistatinov, kar zmanjša njihovo afiniteto do encima. Možne so tudi spremembe na nivoju strukture katepsina B (npr. spremenjena glikozilacija), ki zmanjša dovzetnost encima za inhibicijo z endogenimi inhibitorji (67). Kot inhibitorji katepsina B cistatini niso primerni za terapijo rakavih obolenj, saj niso specifični (inhibirajo različne proteaze), in njihova vloga pri raku še ni popolnoma razjasnjena. Ker stabilizirajo MMP ter s tem podaljšajo njihovo delovanje (predvsem razgradnjo ZCM), imajo tudi pro-tumorigeno delovanje (66).

1.8.2 EKSOGENI INHIBITORJI KATEPSINA B

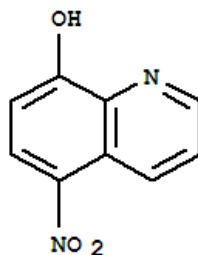
Od devetdesetih let naprej, ko so odkrili vlogo katepsina B v patoloških procesih in določili kristalno strukturo encima, se je povečalo zanimanje za odkritje novih nizkomolekularnih in specifičnih inhibitorjev katepsina B, ki bi zaustavili prekomerno aktivnost encima v škodljivih procesih pri raku. V novejšem času se za iskanje sinteznih inhibitorjev cisteinskih proteaz uporablja visoko zmogljivo virtualno reševanje knjižnic nizkomolekularnih spojin, ki je *in silico* metoda, in je nadgradnja reševanja knjižnic naravnih ter sinteznih spojin v *in vitro* testih (68, 69, 70). Kljub številnim raziskavam na tem področju, pa še vedno nimamo inhibitorja katepsina B, ki bi se uporabljal v klinični praksi za zdravljenje rakavih bolezni.

Eksogene inhibitorje delimo na nekovalentne in kovalentne inhibitorje, slednje pa še na reverzibilne in ireverzibilne. Pri načrtovanju kovalentnih inhibitorjev je pomemben element inhibitorja elektrofilna funkcionalna skupina, ki reagira s tiolno skupino Cys29 v aktivnem mestu. Med ireverzibilne kovalentne inhibitorje prištevamo epoksisukcinilne inhibitorje, aziridine, 1,2,4-tiadiazole, aciloksimetilketone, β -laktamske in organotelurijeve (IV) inhibitorje. Ireverzibilni inhibitorji vsebujejo v svoji strukturi močno elektrofilno skupino, ki pa lahko reagira tudi s številni drugimi proteini v telesu in ne le s katepsinom B, kar ima za posledico neželene učinke (70).

Najbolj raziskani med ireverzibilnimi so epoksisukcinilni inhibitorji, ki imajo v svoji strukturi epoksidni obroč. Ta se odpre ob napadu na tiolno skupino in z njo tvori tioetrsko vez (70). CA-074 je najbolj poznan in raziskan ireverzibilni epoksisukcinilni inhibitor katepsina B, ki je selektiven za katepsin B zaradi prisotnosti karboksilne skupine v strukturi inhibitorja. Slednja namreč vstopa v interakcije z dvema pozitivno nabitima histidinoma (His110 in His111) v zaporni zanki. Le-ta je posebnost katepsina B, zato je

CA-074 selektiven le za katepsin B. Naboj in peptidna struktura sta vzrok za slabo prehajanje CA-074 preko bioloških membran ter posledično slabo biološko uporabnost. Zaradi tega so sintetizirali metilni ester CA-074, CA-074Me, ki se po prehodu preko celične membrane ob prisotnosti esteraz v celici hidrolizira v CA-074. Zaradi toksičnih učinkov in slabe biološke uporabnosti se epoksisukcinilni inhibitorji uporabljajo samo za raziskovalne namene in ne tudi pri zdravljenju (70, 71, 72).

Med reverzibilne kovalentne inhibitorje uvrščamo spojine, ki vsebujejo v svoji strukturi elektrofilno karbonilno (aldehidi, ketoni, ciklopropanoni) ali nitrilno skupino. Po vezavi tiolne skupine v aktivnem mestu encima tvorijo strukturo, ki posnema tetraedrično strukturo prehodnega stanja katepsina B (70). Raziskave so usmerjene v iskanje nizkomolekularnih, reverzibilnih in selektivnih inhibitorjev katepsina B, ki bi inhibirali predvsem endopeptidazno aktivnost encima. Le-ta je odgovorna za patološke procese v telesu, kot je razgradnja proteinov ZCM pri raku. Na eksopeptidazno aktivnost, ki je bolj fiziološkega pomena, pa novi inhibitorji naj ne bi imeli vpliva. Takšne lastnosti imajo naravni biflavoni, ki so nekovalentni, reverzibilni in selektivni inhibitorji za endopeptidazno aktivnost katepsina B (73). Nedavno so z visoko zmogljivim virtualnim reševanjem knjižnic nizkomolekularnih spojin odkrili, da je tudi antibiotik nitroksolin (Slika 6) reverzibilni in selektivni inhibitor katepsina B, ki inhibira predvsem njegovo endopeptidazno aktivnost. Nitroksolin, ki inhibira aktivnost katepsina B v mikromolarnem območju, se že vrsto let uporablja kot zdravilo za zdravljenje urinarnih infekcij. Nitro skupina nitroksolina tvori specifične interakcije s pozitivno nabitima histidinoma v zaporni zanki, aromatski kinolinski obroč pa tvori interakcije s S2' podmestom na encimu. Z *in vitro* modeli so pokazali, da nitroksolin inhibira znotraj- in zunajcelično razgradnjo kolagena tipa IV ter invazijo tumorskih celic (68). Shim s sod. je dokazal, da nitroksolin inhibira angiogenezo in tumorsko rast tudi preko encimov MetAP2 (tip 2 metionin-aminopeptidaze) in sirtuina 1, ki sodelujeta v procesu nastajanja novih žil. Nitroksolin torej preko različnih tarč inhibira tumorsko rast in invazijo (74).



Slika 6. Kemijska struktura nitroksolina (75).

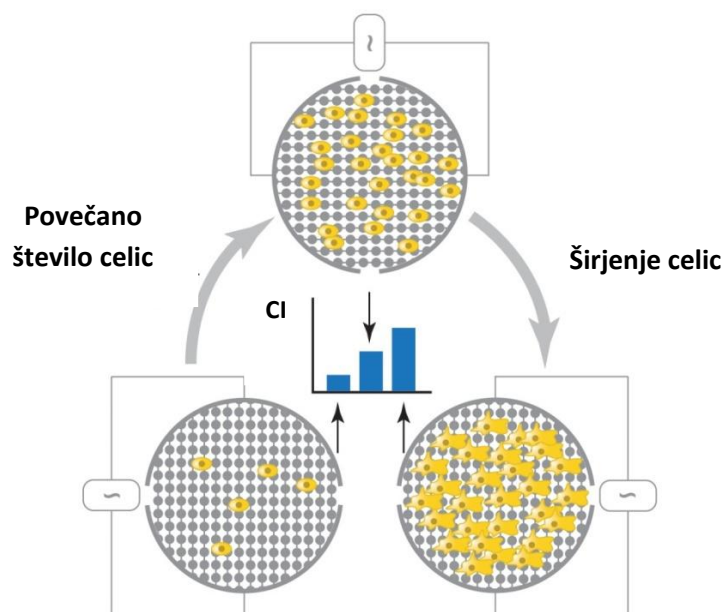
1.9 SINERGISTIČEN UČINEK KATEPSINOV B IN X PRI RAKU

Pred kratkim so ugotovili sinergističen učinek katepsinov B in X na rast tumorjev. Na transgenih mišjih modelih, ki spontano razvijejo rak dojke in imajo izbit gen za katepsin B in/ali katepsin X, so spremljali napredovanje in metastaziranje raka dojke. Izbitje gena za katepsin B je na transgenih miših povzročilo zakasnitev nastanka tumorjev in zmanjšanje mase tumorskega tkiva. Pri miškah z izbitim genom za katepsin X je prišlo le do zakasnitve pojava tumorjev. Sočasno izbitje genov za katepsin B in X pa je imelo za posledico statistično značilni kasnejši razvoj tumorjev, 70 % zmanjšanje števila pljučnih metastaz in 80 % zmanjšanje velikosti teh metastaz (47). Vasiljeva s sod. je pokazala, da izbitje že enega alela za katepsin B statistično značilno zmanjša velikost metastaz v pljučih transgenih miši, medtem ko izguba obeh alelov za katepsin B ne doprinese k nadaljnjemu zmanjšanju pljučnih metastaz. Glede na rezultate teh raziskav lahko sklepamo na kompenzacijski mehanizem v tumorskih celicah, ki izgubo aktivnosti katepsina B nadomesti z ohranjeno aktivnostjo katepsina X, ki je ravno tako karboksipeptidaza. Raziskave kažejo, da je sinergističen učinek obeh katepsinov na tumorsko rast in invazijo potrebno podrobneje preučiti, da bomo lahko govorili o smiselnosti novih terapevtskih prijemov, ki bi vključevali sočasno uporabo selektivnih inhibitorjev obeh cisteinskih proteaz (47, 54).

1.10 *IN VITRO* MODELI ZA TESTIRANJE PROTITUMORSKIH UČINKOVIN

Pred napredovanjem v klinične študije je potrebno učinkovitost novih protitumorskih učinkovin preveriti v celičnih *in vitro* modelih tumorske invazije. Slednje lahko glede na

sistem testiranja razdelimo na 2D in 3D *in vitro* modele tumorske invazije. Med 2D modele uvrščamo t.i. *angl. scratch-wound assay* in teste, ki temeljijo na uporabi Boyden komore (*angl. Boyden chamber assay*). Kot novejša različica slednjega se danes uporablja sistem xCELLigence. 2D *in vitro* model tumorske invazije na aparaturi xCELLigence temelji na merjenju upornosti, ki jo zaznajo mikroelektrode iz zlata na dnu vdolbinic CIM-ploščic, in se uporablja za kvantitativno spremljanje invazije tumorskih celic. V primerjavi s konvencionalnimi *in vitro* testi tumorske invazije, ki ovrednotijo invazijo v končni časovni točki (*angl. endpoint assays*), sistem xCELLigence kontinuirano meri invazijo celic tekom celotnega poskusa, to je v realnem času. Aparatura xCelligence ali RTCA DP instrument (*angl. Real-Time Cell Analyzer Dual Plate*) je sestavljena iz RTCA kontrolne enote z RTCA programsko opremo in RTCA DP analizatorja, kamor vstavimo CIM-ploščice in je nameščen v celičnem inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂). Večje kot je število celic na mikroelektrodah in moč adhezije celic na mikroelektrodah, večja je tudi upornost, ki jo sistem izrazi kot celični indeks (CI) (Slika 7). Sistem xCELLigence izračuna celični indeks na podlagi relativne spremembe v upornosti med začetkom eksperimenta in posamezno časovno točko eksperimenta (76, 77).



Slika 7. Na podlagi upornosti merjena celična viabilnost in gibljivost (77).

Kot 3D model tumorske invazije se uporabljajo sferični celični agregati-sferoidi, ki jih implantiramo v model ZCM (MatrigelTM). MatrigelTM vsebuje laminin, kolagen tipa IV,

heparan sulfat in rastne dejavnike, ki so običajno prisotni v ZCM tumorjev (78). 3D celični model tumorske invazije je primernejši za napovedovanje obnašanja protitumorskih učinkovin *in vivo*, ker sferoidi bolje posnemajo avaskularne stopnje rasti tumorjev kot 2D *in vitro* celični modeli. V 3D celičnem modelu se tumorske celice obnašajo podobno kot v *in vivo* pogojih, saj model posnema interakcije med celicami in interakcije celic z ZCM *in vivo*. Gibanje celic znotraj sferoidov, transport kisika, metabolitov in hranil, morfološke lastnosti, ekspresija genov in delovanje protirakavih zdravil v sferoidih so značilnosti, ki so v sferoidih podobne kot v dejanskih tumorjih *in vivo* (79, 80).

2 NAMEN DELA

Katepsin B bistveno vpliva na tumorsko invazijo celic preko razgradnje ZCM. Zato so številne raziskave usmerjene k iskanju novih, selektivnih nizkomolekularnih inhibitorjev katepsina B, ki bi se uporabljali za zdravljenje rakavih obolenj. V magistrski nalogi bomo postavili modele razgradnje proteinov ZCM ter 2D in 3D *in vitro* modele tumorske invazije s pomočjo glioblastomske celične linije U-87, na kateri bi lahko preizkušali nove inhibitorje katepsina B.

V prvem delu bomo s testom ELISA, spremljanjem encimske aktivnosti in pretočno citometrijo poskušali pokazati, da celična linija U-87 vsebuje aktivni katepsin B. S fluorescenčno mikroskopijo bomo pokazali, da ista celična linija razgrajuje s fluoresceinom označeni kolagen tipa IV tako znotraj kot tudi zunaj celic.

Nato bomo s postavitvijo modelov razgradnje proteinov ZCM s pomočjo pretočne citometrije in fluorescenčne spektrofotometrije kvantitativno ovrednotili znotrajcelično in zunajcelično razgradnjo ZCM. S pomočjo aparature xCELLigence bomo postavili 2D *in vitro* model tumorske invazije, ki bo služil kvantitativnemu ovrednotenju tumorske invazije. Poleg tega bomo postavili tudi 3D *in vitro* model tumorske invazije s sferoidi, implantiranimi v model ZCM (MatrigelTM). Ustreznost modelov bomo nato preverili z uporabo že dokazanih inhibitorjev katepsina B (nitroksolinom, CA-074 in CA-074Me) in z za katepsin B specifično siRNA.

Na koncu bomo s spremljanjem encimske kinetike poskušali dokazati prisotnost aktivnega katepsina X v celični liniji U-87 in, da že dokazani inhibitorji katepsina B (nitroksolin in CA-074) ne inhibirajo aktivnosti katepsina X.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 KEMIKALIJE IN REAGENTI

Preglednica I. Uporabljene kemikalije in reagenti ter njihovi proizvajalci.

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC
Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH	Jiangsu Vcare PharmaTech Co., Ltd.
ADMEM osnovno gojišče	Gibco, Invitrogen
BSA	Sigma
C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	Fluka
CA-074Me	Peptide institute , Inc.
CA-074	Bachem
cistein	Sigma-Aldrich
DMSO	Gibco, Invitrogen
DQ-kolagen IV	Invitrogen
EDTA	Serva
EDTA-Na ₂	Invitrogen
etanol (70%)	Riedel-deHaën
FBS	Hyclone
fibronektin	Calbiochem
formalin	Sigma-Aldrich
H ₂ SO ₄	Sigma
HEPES	Sigma
KCl	Riedel-deHaën
KH ₂ PO ₄	Riedel-deHaën
komplet za določanje vsebnosti proteinov Bio-Rad DC	Bio-Rad, Inc.
kontrolna siRNA-A	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
L-glutamin	Gibco, Invitrogen
Lipofectamine TM RNAiMAX	Invitrogen
Matrigel TM	BD Biosciences
Na ₂ CO ₃	Kemika

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Riedel-deHaën
Na-acetat	Sigma
NaCl	Kemika
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Riedel-deHaën
NaHCO ₃	Riedel-deHaën
NaN ₃	Merck
nigrozin	Sigma
nitroksolin	Sigma-Aldrich
ocetna kislina	Merck
PBS	Sigma
PEG	Sigma-Aldrich
penicilin/streptomycin	Euro clone
propidijev jodid	BD Biosciences
siRNA za katepsin B	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
TMB	Sigma
tripsin	Gibco, Invitrogen
Triton X-100	Serva
Tween 20	Sigma
Z-Arg-Arg-AMC	Calbiochem

3.1.2 STANDARDI IN PROTITELESA

- Človeški rekombinantni katepsin B (Inštitut Jožef Štefan)
- Kunčja monoklonska protitelesa proti katepsinu B in prokatepsinu B (Krka, d.d.)
- Ovčja poliklonska protitelesa proti katepsinu B in prokatepsinu B, konjugirana s HRP (Krka, d.d.)
- Kunčja poliklonska protitelesa proti katepsinu B (Krka, d.d.)
- Kozja protikunčja monoklonska protitelesa konjugirana z Alexa FluorTM 555 (Invitrogen)

3.1.3 LABORATORIJSKA OPREMA

Preglednica II. Uporabljena laboratorijska oprema in proizvajalec.

OPREMA	PROIZVAJALEC IN TIP
analitska tehtnica	EXACTA 610 EB, Tehtnica
avtoklav	A-63 CV, Kambič Laboratorijska oprema
avtomatska večkanalna pipeta	1200 µL, Biohit
avtomatski spiralec mikrotitrskih plošč	Columbus TECAN M8/2R
celični inkubator	CB 219 BINDER
centrifuge	5415 R, Eppendorf Heraeus Megafuge 16R, Thermo scientific
CIM-ploščice	ploščice s 16 vdolbinicami, Roche
citometer za štetje celic	Tiefe Depth Profunder, THOMA
čitalec mikrotitrskih plošč	TECAN Safire ²
črne mikrotitrške plošče	Plošče s 96 vdolbinicami, NUNC, Thermo scientific Plošče s 96 vdolbinicami, Corning Costar
digitalni fotoaparati	CAMEDIA C-7070, Olympus
E-ploščice	ploščice s 16 vdolbinicami, Roche
gojiščne plastenke	750 cm ² , TPP
gojiščne ploščice	ploščice z 12, 24 in 96 vdolbinicami, Costar
inkubator	WTB Binder
invertni mikroskop	Nikon TMS-F
komora z laminarnim pretokom zraka	PIO SMBC 183 AV, Iskra PIO LFVP 9, Iskra
Lab-Tek TM chambered coverglass ploščice	ploščice z 8 vdolbinicami, NALGENE, NUNC, Thermo scientific
mikrotitrške plošče	plošče z 96 vdolbinicami, TPP
motorizirani invertni mikroskop s Cell® programsko opremo	IX 81, Olympus
petrijevke	100 x 20 mm, TPP
pH meter	HANNA HI9321 microprocessor pH meter
polavtomatska večkanalna pipeta	Costar

polavtomatske pipete	0,2-2,5 μL ; 0,5-10 μL ; 2-20 μL ; 10-100 μL ; 20-200 μL ; 100-1000 μL , Eppendorf
pretočni citometer	FACS Calibur, BD Biosciences
svetlobni mikroskop	CX 21, Olympus
ultrafiltracijski sistem	U-tube 6-10 concentrator, Novagen, Merck
vibracijsko mešalo	Vibromix 10, Tehnica
xCELLigence sistem	Roche

3.1.4 PUFRI

Pufri za ELISA test:

Pufer A:

- 1,6 g Na_2CO_3
- 2,94 g NaHCO_3
- 0,2 g NaN_3

Dopolnimo z dH_2O do 1L in uravnamo pH na 9,6.

Pufer B:

- 8,5 g NaCl
- 1,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 2,94 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,05 % Tween 20

Dopolnimo z dH_2O do 1 L in uravnamo pH na 7,2.

Pufer C:

- 2 g BSA/ 100 mL pufra B

Substratni pufer za redčenje TMB:

- 21 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$
- 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

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

Ostali pufri:

PBS:

- 1,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,24 g KH_2PO_4
- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl

Dopolnimo z dH_2O do 1 L in uravnamo pH na 7,4.

100 mM acetatni pufer za katepsin B in X:

- 3,48 g Na-acetata
- 0,5 g PEG
- 0,45 g očetne kisline

Dopolnimo z dH_2O do 50 mL in uravnamo pH na 5,5.

Aktivacijski pufer za katepsin B in X:

- 30,3 mg cisteina
- 27,9 mg EDTA

S 100 mM acetatnim pufrom za katepsin B dopolnimo do 50 mL in pomešamo.

Lizirni pufer:

- 1,2 g HEPES
- 0,88 g NaCl
- 37,2 mg EDTA
- 1 mL Triton X-100

Dopolnimo z dH_2O do 100 mL in uravnamo pH na 5,5.

Pufre smo uravnali na želeno vrednost pH z bazo (1 ali 10 M NaOH) ali kislino (koncentrirana HCl ali 100 % očetna kislina).

3.1.5 CELIČNA LINIJA U-87

Pri raziskovalnem delu smo uporabili adherentno celično linijo U-87, ki je glioblastomska človeška celična linija (81).

3.1.6 GOJIŠČA

Osnovno gojišče za celice U-87:

- 100 % ADMEM

Kompletno gojišče za celice U-87:

- 88 mL ADMEM
- 10 mL FBS
- 1 mL penicilina/streptomicina
- 1 mL L-glutamina

Brezserumsko gojišče za celice U-87:

- 98 ml ADMEM
- 1 mL penicilina/streptomicina
- 1 mL L-glutamina

Gojišče za zamrzovanje celic U-87:

- 95 % ADMEM
- 5 % DMSO

Gojišče za transfekcijo celic U-87:

- 50 mL ADMEM
- 0,5 mL L-glutamina

3.2 METODE

3.2.1 DELO S CELIČNO LINIJO U-87

Odmrzovanje celične linije

Celice, shranjene v tekočem dušiku (-196 °C), smo na hitro odtalili v vodni kopeli pri 37 °C, s čimer smo preprečili toksične učinke DMSO v gojišču za zamrzovanje. Odmrznjene celice smo prenesli v 10 ml kompletnega gojišča in jih centrifugirali 5 min pri 1200 obr/min. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v svežem gojišču, predhodno segretem na 37 °C, ter jih prenesli v gojiščno platenko.

Gojenje celične linije

Celice U-87 smo gojili v gojiščnih platenkah v celičnem inkubatorju pri temperaturi 37 °C, v atmosferi nasičeni z vlago in s 5 % CO₂. Gojenje celic je vedno potekalo v aseptičnih pogojih. Vsakodnevno smo opazovali rast celic pod invertnim mikroskopom. Ko so pritrjene celice prerastle 70 do 80 % površine gojiščne platenke, smo celice tripsinizirali. Celice smo najprej sprali s 5 mL PBS, nato pa dodali 5 ml 0,05 % tripsina z 0,02 % EDTA v PBS pufru. Ločevanje celic od podlage smo spremljali pod invertnim mikroskopom. Po približno 5 min pri 37 °C, ko so se celice ločile od podlage, smo jim dodali 5 ml svežega kompletnega gojišča, s katerim smo deaktivirali tripsin. Suspenzijo celic smo nato centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min, odlili supernatant in celice resuspendirali v svežem gojišču.

Štetje celic

Celice smo prešteli s pomočjo citometra pod mikroskopom. 100 µL homogene celične suspenzije smo dodali 100 µL 0,2 % nigrozina, ki selektivno obarva samo mrtve celice. Nato smo s pomočjo invertnega mikroskopa prešteli žive celice in izračunali število celic na mL celične suspenzije po *Enačbi 1*.

$$N = N' \cdot 2 \cdot 10^4 / \text{ml} \quad (\text{Enačba 1})$$

N.....število celic na ml celične suspenzije

N'.....povprečno število pod mikroskopom prešteti celic v polju citometra

Zamrzovanje celične linije U-87

Celično suspenzijo z ustreznim številom celic (1×10^6 celic/mL) smo centrifugirali 5 min pri 1000 obr/min, odlili supernatant in celice resuspendirali v gojišču za zamrzovanje. Slednje vsebuje DMSO, ki med zamrzovanjem preprečuje nastanek kristalov vode, ki bi lahko poškodovali celice. Suspenzijo smo potem prenesli v vialo za zamrzovanje celic, ki smo jo čez noč pustili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, nato pa shranili v tekočem dušiku pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 PRIPRAVA CELIČNIH LIZATOV IN KONDICIONIRANEGA GOJIŠČA CELIC U-87

Priprava celičnih lizatov

Ko so pritrjene celice v gojiščni platenki dosegle 70-80 % konfluentnost, smo celice tripsinizirali, jih prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Celice smo nato sprali z 2 mL pufra PBS in jih resuspendirali v 150 μL lizirnega pufra. Po 15 min inkubacije na ledu smo vzorce preko noči zamrznili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako pripravljene odmrznjene vzorce smo nato centrifugirali 20 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri 13200 obr/min. Supernatant smo previdno prenesli v drugo mikrocentrifugirko, sediment pa zavrgli. Tako pripravljene lizate smo shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Priprava kondicioniranega gojišča

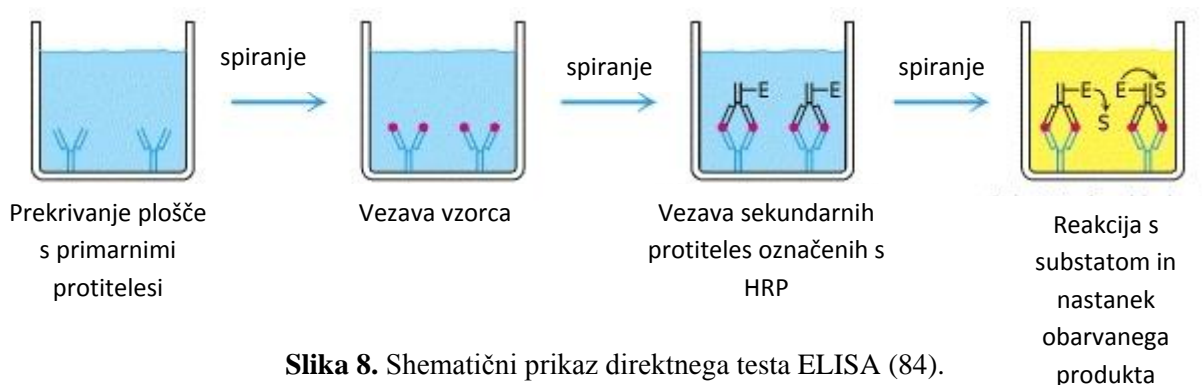
Po 24 h gojenja celic (1×10^6 celic/mL) pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v brezserumskem gojišču smo gojišče prenesli v centrifugirko in ga centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Sediment smo zavrgli, supernatant (približno 5 mL) pa smo nato skoncentrirali s pomočjo filtracijskega sistema Novagen U-tube Concentrator 6-10. Slednji je sestavljen iz centrifugirke in filtra z izključitveno molsko maso 10 kDa, kar pomeni, da smo ob centrifugiranju zaradi centrifugalne sile v raztopini zadržali le proteine večje od 10 kDa (katepsin B ima molekulsko maso ~ 28 kDa). Po 20 min centrifugiranja pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo nato opravili še diafiltracijo napram 100 mM acetatnem pufu (brez dodanega PEG). Diafiltracijo smo izvedli tako, da smo koncentriranemu gojišču ($\sim 50\text{ }\mu\text{L}$) dodali 4 mL acetatnega pufra in gojišče ponovno centrifugirali 20 min pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Diafiltracijo smo še enkrat ponovili in na koncu dobili 50-100 μL skoncentriranega gojišča, ki smo ga prenesli v mikrocentrifugirko in shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV PO LOWRY-JU

Celokupno koncentracijo proteinov v celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču celic U-87 smo določali z modificirano metodo po Lowry-u (komplet za določanje vsebnosti proteinov Bio-Rad DC), ki temelji na biuretski reakciji. Pri sledenji pride zaradi tvorbe kompleksa med bakrovimi ioni in peptidnimi vezmi do redukcije Folin-Ciocalteujevega reagenta in nastanka t.i. metilenskega modrila, ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 750 nm. Ker je metoda relativna, smo najprej pripravili umeritveno krivuljo (82). V ta namen smo pripravili standardne raztopine BSA v lizirnem (za lizate) ali acetatnem pufru (za gojišča) s koncentracijami: 0,0; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0 ter 1,5 mg/mL. V vdolbinice na mikrotitrski plošči smo najprej odpipetirali 5 μ L pripravljenih standardnih raztopin ali 5 μ L ustrezno redčenih vzorcev. V vdolbinice na plošči smo nato dodali še 25 μ L reagenta A' in 200 μ L reagenta B (redčen Folin-Ciocalteujev reagent). Reagent A' smo predhodno pripravili iz reagenta A (alkalna raztopina bakrovega tartrata) in reagenta S (razredčena površinsko aktivna snov) v razmerju 1:20. Po 15 min inkubacije na sobni temperaturi smo na čitalcu mikrotitrskih plošč Tecan Safire² izmerili absorbanco nastalega modro obarvanega produkta pri 750 nm. Na podlagi izmerjenih absorbanc standardnih raztopin smo določili umeritveno krivuljo. Iz umeritvene krivulje pa smo na podlagi absorbanc izračunali koncentracijo celokupnih proteinov v posamičnem vzorcu. Poskus smo izvedli v 2 paralelkah in ga ponovili 3-krat.

3.2.4 TEST ELISA

Encimskoimunski test na trdnem nosilcu ali test ELISA (*angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) je občutljiva imunološka metoda, ki se uporablja za dokazovanje prisotnosti in/ali določevanje koncentracije antigena ali protitelesa v vzorcu (Slika 8) (83).



Slika 8. Shematični prikaz direktnega testa ELISA (84).

Koncentracijo katepsina B, vključno s pro-obliko encima, smo v celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču celic U-87 določili s pomočjo direktnega testa ELISA. V vdolbinice mikrotitrne plošče smo odpipetirali 100 μ l raztopine kunčjih monoklonskih protiteles proti katepsinu B v pufru A (5 μ g/ml) in ploščo inkubirali čez noč pri 4 °C. Po spiranju s pufrom B smo nespecifična vezavna mesta blokirali z 200 μ l pufru C. Po 30 min inkubacije na sobni temperaturi smo odlili pufer C, ploščico otresli in v vdolbinice odpipetirali 100 μ l raztopine rekombinantnega katepsina B ali vzorca v pufru C. Za umeritveno krivuljo smo pripravili redčitveno vrsto rekombinantnega katepsina B v pufru C s koncentracijami: 67,5; 33,8; 16,9; 8,4; 4,2; 2,1 in 1,1 ng/mL. Kot slepo vrednost smo uporabili 100 μ L pufru C. Vzorce smo pripravili tako, da smo jih redčili na enako končno koncentracijo celokupnih proteinov s pufrom C (0,1 mg/mL za celične lizate in 0,5 mg/mL za kondicionirana gojišča). Ploščico smo prekrili s folijo in jo inkubirali 2 h pri 37 °C. Po spiranju s pufrom B smo ploščico otresli in ji dodali 100 μ l ovčjih poliklonskih protiteles proti katepsinu B označenih s HRP, ki smo jih redčili v razmerju 1:2500 v pufru C. Po 2 h inkubiranja pri 37 °C smo plošče sprali s pufrom B, v vdolbinice pa smo dodali 200 μ l substrata TMB, ki smo ga redčili s substratnim pufrom za TMB v razmerju 1:1. Po 15 min inkubiranja smo v vdolbinice dodali 50 μ l 2 M H₂SO₄ in pomerili absorbance na čitalcu mikrotitrskih plošč pri valovni dolžini 450 nm. Iz izmerjenih absorbanc standardov smo določili umeritveno krivuljo. Na podlagi umeritvene krivulje in izmerjenih absorbanc posameznih vzorcev pa smo izračunali koncentracijo katepsina B v posameznem vzorcu. Poskus smo ponovili 3-krat.

3.2.5 DOLOČANJE AKTIVNOSTI KATEPSINOV

Aktivnosti katepsinov B in X v celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču celične linije U-87 smo določili s spremljanjem encimske aktivnosti. V ta namen smo uporabili za katepsin B specifični fluorogeni substrat Z-Arg-Arg-AMC in za katepsin X specifični fluorogeni substrat Abz-Phe-Glu- Lys (Dnp)-OH.

V vdolbinice na črni mikrotitrski plošči smo odpipetirali po 5 μ L fluorogenega substrata ustrezne koncentracije: 16,13 μ M za določanje aktivnosti katepsina X, 10 μ M za določanje aktivnosti katepsina B v celičnih lizatih in 20 μ M za določanje aktivnosti katepsina B v gojišču. Nato smo v vdolbinice dodali še 5 μ L nitroksolina (100 μ M), CA-074 (100 μ M) ali DMSO kot ustrezno negativno kontrolo ter nazadnje 90 μ L vzorca. Vzorce smo pred

meritvijo redčili z aktivacijskim pufrom, da so imeli vsi vzorci enako končno celokupno koncentracijo proteinov (0,2 mg/mL za celične lizate in 0,5 mg/mL za gojišča), in jih inkubirali 5 min pri 37 °C. V vdolbinice, ki so služile kot ozadje za meritev, smo namesto vzorcev dodali samo aktivacijski pufer. Po dodatku vzorcev smo aktivnost katepsinov spremljali s kontinuiranim merjenjem fluorescence pri 37 °C na čitalcu mikrotitrskih plošč Tecan Safire². Fluorescenco smo pri katepsinu B merili pri valovni dolžini 460 nm (ekscitacija pri 380 nm), pri katepsinu X pa pri 420 nm (ekscitacija pri 320 nm). Poskus smo izvedli v 2 paralelkah in ga ponovili 3-krat. Inhibicijo aktivnosti encima smo izračunali po *Enačbi 2*.

Inhibicija encima (%) = $100 \cdot (1 - v_i/v_o)$ (*Enačba 2*)

$v = \delta\text{RFU}/\delta t$

v_i = hitrost reakcije ob prisotnosti inhibitorja

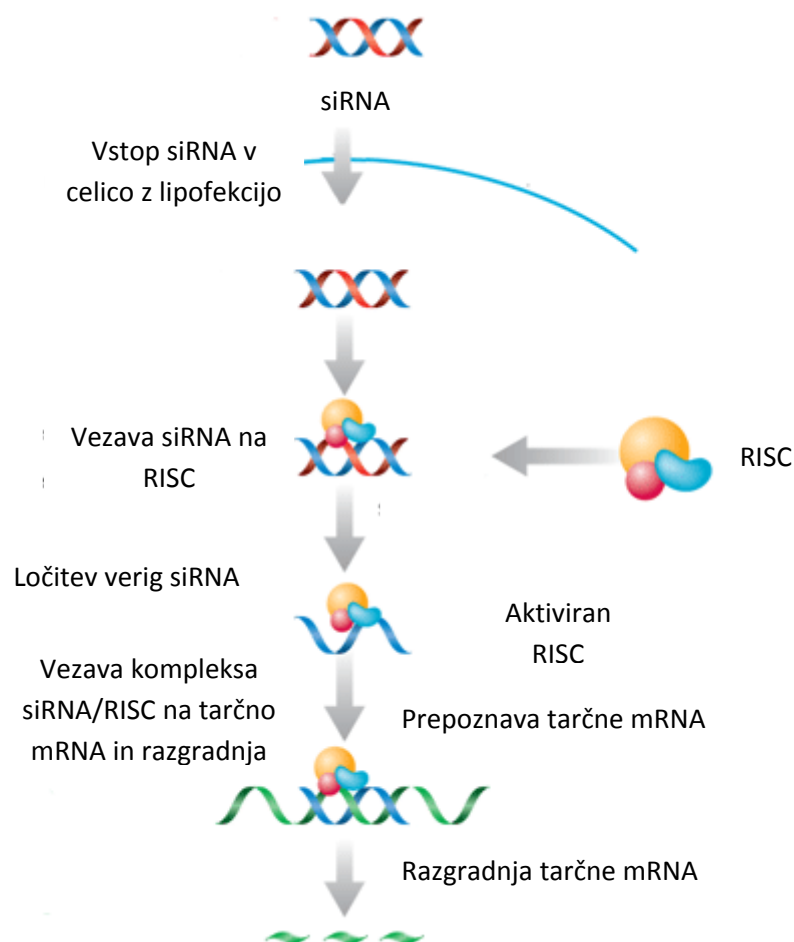
v_o = hitrost reakcije ob prisotnosti negativne kontrole (DMSO)

3.2.6 UTIŠANJE IZRAŽANJA KATEPSINA B V CELIČNI LINIJI U-87

Utišanje izražanja katepsina B v celicah U-87 smo izvedli s siRNA, ki je specifična za katepsin B. Mehanizem utišanja genov s siRNA je prikazan na Sliki 9. Ustrezno število celic (8×10^4 /vdolbinico) smo nasadili na gojiščno ploščo z 12 vdolbinicami in jih pustili, da se pritrdijo čez noč v inkubatorju pri 37 °C. Naslednji dan smo celicam gojišče zamenjali z 1 mL gojišča za transfekcijo in jim dodali 200 µL raztopine lipofektamina in siRNA, ki smo je predhodno pripravili po navodilih proizvajalca – raztopino lipofektamina in siRNA (lipofektamin smo dodali raztopini siRNA v razmerju 1:50) smo inkubirali 20 min pri sobni temperaturi, da so molekule lipofektamina ustrezno zajele molekule siRNA in z njimi tvorile komplekse za lipofekcijo. Za transfekcijo celic smo uporabili dve koncentraciji siRNA: 33 in 50 nM. Kot negativno kontrolo smo pri poskusu uporabili kontrolno siRNA, ki ne utiša izražanja katepsina B. Po 6 h inkubiranja pri 37 °C smo celicam zamenjali gojišče s kompletnim gojiščem brez antibiotikov. 24, 48 in 72 h po transfekciji smo pripravili celične lizate po zgoraj opisanem postopku in utišanje katepsina B preverili z direktnim testom ELISA in spremljanjem encimske aktivnosti. Poskus smo 2-krat ponovili. Inhibicijo izražanja katepsina B smo določili po *Enačbi 3*.

Inhibicija izražanja (%) = $100 \cdot (1 - A(\text{siRNA katepsin B})/A(\text{siRNA kontrola}))$ (Enačba 3)

A = pri spremljanju encimske aktivnosti je A aktivnost katepsina B v celičnih lizatih (RFU/s), pri testu ELISA pa je A koncentracija katepsina B (ng/mg)



Slika 9. Mehanizem utišanja gena s siRNA (85). Z lipofekcijo vnešena siRNA, ki je dolga 21-23 bp, se v celici veže na RISC (*angl. RNA-induced silencing complex*). Pri tem se RISC aktivira in loči dvovertično RNA na enoverižno. RISC s pomočjo vezane enoverižne siRNA prepozna in veže homologno tarčno mRNA. Po vezavi jo razcepi, razcepljeno mRNA pa potem razgradijo druge citoplazemske ribonukleaze, kar prepreči izražanje proteina (86, 87).

3.2.7 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

S fluorescenčno mikroskopijo smo spremljali razgradnjo DQ-kolagena IV v celicah U-87. DQ-kolagen IV je kolagen tipa IV, ki je v raziskovalne namene označen s fluoresceinom. Po proteolitični razgradnji DQ-kolagena IV se sprostijo molekule fluoresceina, kar lahko zaznamo s fluorescenčnim mikroskopom.

V vdolbinice hladne Lab-Tek™ Chambered Coverglass ploščice smo napipetirali 40 μL 100 % Matrigela™, kateremu smo primešali DQ-kolagen IV (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in jih postavili na 37 °C, da Matrigel™ gelira. Nato smo na geliran Matrigel™ nanесли 400 μL celične suspenzije ($6 \times 10^4/\text{mL}$) v kompletnem gojišču, kateremu smo dodali 2 % Matrigel™. Po 24 h inkubacije pri 37 °C smo na motoriziranem invertnem mikroskopu Olympus IX posneli slike razgradnje DQ-kolagena IV v prisotnosti celic U-87.

3.2.8 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočno citometrijo smo uporabili za določanje katepsina B na površini celic U-87 in za kvantitativno določanje znotrajcelične razgradnje proteinov ZCM.

Določanje katepsina B na površini celic

2×10^5 celic U-87 smo prenesli v epruvete za pretočno citometrijo, jim dodali 2 mL pufru PBS in centrifugirali 5 min pri 3000 obr/min. Po centrifugiranju smo celice fiksirali s 500 μL 10 % formalina. Po 20 min inkubaciji na ledu smo celice sprali z 2 mL pufru PBS in jim dodali 100 μL raztopine kunčjih poliklonskih protiteles proti katepsinu B (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in jih inkubirali 1h na sobni temperaturi. Po ponovnem spiranju z 2 mL pufru PBS smo celicam dodali 100 μL kozjih protikunčjih monoklonskih, ki so bila označena s fluorescenčnim označevalcem Alexa Fluor™ 555 in smo jih predhodno redčili v razmerju 2:1000. Po enourni inkubaciji na sobni temperaturi smo celice še enkrat sprali s puffrom PBS in jih po centrifugiranju resuspendirali v 90 μL pufru PBS. Kot negativno kontrolo smo pri poskusu uporabili celice označene samo s sekundarnimi protitelesi. Vzorce smo do merjenja postavili na led, spremembe v fluorescenci med označenimi in kontrolnimi celicami pa smo spremljali s pretočnim citometrom FACS Calibur. Poskus smo izvedli v 2 paralelkah.

Kvantitativno določevanje znotrajcelične razgradnje proteinov ZCM

2×10^5 celic U-87 smo nasadili v vdolbinice gojiščne plošče s 24 vdolbinicami in jih pustili čez noč, da se pritrldijo. Naslednji dan smo celicam gojišče zamenjali s 500 μL brezserumskega gojišča z dodatkom 50 μM nitroksolina, CA-074 ali CA-074Me. Kot negativno kontrolo smo pri poskusu uporabili DMSO. Po 2 h inkubacije pri 37 °C smo v vdolbinice dodali DQ-kolagen IV, tako da je bila končna koncentracija 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Po 2 h inkubiranja pri 37 °C smo celice tripsinizirali in jih prenesli v epruvetke za pretočno citometrijo ter jih centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Po centrifugiranju smo supernatant

zavrgli, celice pa resuspendirali v 100 μ L pufra PBS, kateremu smo dodali propidijev jodid (100 μ g/mL), s katerim smo označili mrtve celice. Po 10 min inkubiranja na ledu smo fluorescenco pomerili s pretočnim citometrom le v živih celicah, saj smo označene mrtve celice izločili iz meritve fluorescence. Poskus smo izvedli v 2 paralelkah in ga ponovili 4-krat. Inhibicijo znotrajcelične razgradnje DQ-kolagena IV smo izračunali po *Enačbi 4*.

$$\text{Inhibicija (\%)} = 100 \cdot (1 - F(\text{inhibitor})/F(\text{kontrola})) \quad (\text{Enačba 4})$$

F(inhibitor) = povečanje fluorescence ob prisotnosti inhibitorja in DQ-kolagena IV glede na celice, ki jim predhodno nismo dodali DQ-kolagena IV

F(kontrola) = povečanje fluorescence ob prisotnosti negativne kontrole (DMSO) in DQ-kolagena IV glede na celice, ki jim predhodno nismo dodali DQ-kolagen IV

3.2.9 DOLOČANJE INHIBICIJE ZUNAJCELIČNE RAZGRADNJE PROTEINOV ZCM

Zunajcelično razgradnjo proteinov ZCM smo spremljali s fluorescenčno spektrofotometrijo. 5×10^4 celic U-87 smo nasadili v vdolbinice mikrotitrne plošče in jih pustili čez noč pri 37 °C, da so se pritrdile na podlago. Naslednji dan smo celicam odstranili gojišče in jim dodali 100 μ L pufra PBS z nitroksolinom (5 μ M) ali CA-074 (5 μ M) ter DQ-kolagenom IV (10 μ g/mL). Kot negativno kontrolo smo uporabili DMSO. Po 6 h inkubiranja pri 37 °C smo 80 μ L raztopine prenesli v vdolbinice nove črne mikrotitrne plošče. Zunajcelično razgradnjo DQ-kolagena smo nato kontinuirano merili pri 37 °C na čitalcu mikrotitrskih plošč Tecan Safire² pri valovni dolžini 515 nm (ekscitacija pri 495 nm). Poskus smo izvedli v 6 paralelkah in ga ponovili 4-krat. Inhibicijo zunajcelične razgradnje smo določili po *Enačbi 2*.

3.2.10 DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI INHIBITORJEV

Citotoksičnost inhibitorjev smo določili s sistemom xCELLigence.

Optimizacija števila celic za test citotoksičnosti inhibitorjev

Pred izvedbo testa citotoksičnosti inhibitorjev smo optimizirali število celic in čas inkubacije, tako da so celice dosegle logaritemsko fazo rasti. V vdolbinice E-ploščice, ki ima elektrode iz zlata pritrjene na dnu vdolbinic, smo odpipetirali 100 μ L kompletnega gojišča in ploščico inkubirali na sobni temperaturi 30 min. Po inkubaciji smo ploščico

postavili v RTCA napravo in posneli ozadje meritve. Nato smo v vdolbinice dodali 100 μL celic U-87 (10000, 7500, 5000 ali 2500 celic/vdolbinico). V vmesne prostore med vdolbinicami na ploščici smo dodali PBS ali destilirano vodo, da smo zmanjšali izhlapevanje medija iz testnih vdolbinic tekom poskusa. Pokrito ploščico smo po 30 min inkubaciji na sobni temperaturi namestili v RTCA napravo, ki je vsakih 15 min 72 h merila upornost. Poskus smo ponovili 4-krat.

Test citotoksičnosti inhibitorjev

V vdolbinice E-ploščice smo dodali 50 μL kompletnega gojišča, nato pa smo ploščico pokrili in jo inkubirali na sobni temperaturi 30 min. Zatem smo ploščico namestili v RTCA napravo in izmerili ozadje meritve. Nato smo v vdolbinice ploščice dodali 100 μL celic U-87 (7500 celic/vdolbinico) v kompletnem gojišču in v vmesne prostore na ploščici dodali PBS ali destilirano vodo, da smo zmanjšali izhlapevanje. Po postavitvi ploščice v RTCA napravo smo pričeli z merjenjem upornosti. Po 14 h smo celicam dodali 50 μL nitroksolina (10, 5, 2,5 in 1,25 μM) ali CA-074 (10, 5 in 2,5 μM) v kompletnem gojišču. Kot negativno kontrolo smo uporabili DMSO. Po dodatku inhibitorjev smo upornost v obliki celičnega indeksa spremljali 72 h. Poskus smo ponovili 4-krat. Celično viabilnost smo izračunali po *Enačbi 5*.

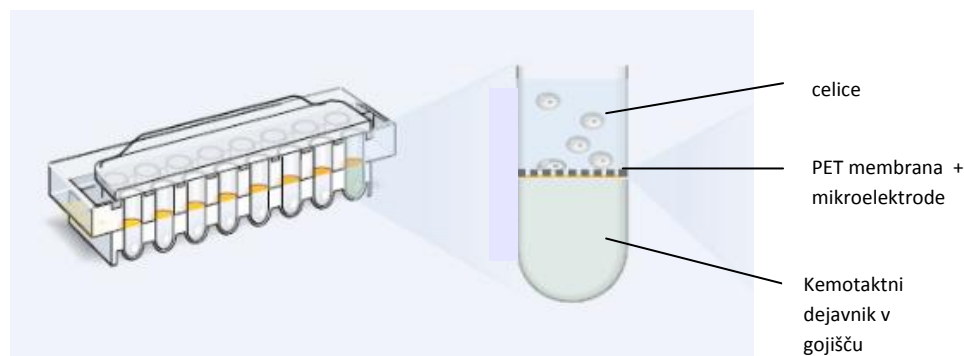
Viabilnost (%) = $100 \cdot (\text{CI}(\text{inhibitor})/\text{CI}(\text{kontrola}))$ (*Enačba 5*)

CI(inhibitor) = celični indeks ob prisotnosti inhibitorja

CI(kontrola) = celični indeks ob prisotnosti negativne kontrole (DMSO)

3.2.11 POSTAVITEV 2D CELIČNEGA MODELA TUMORSKE INVAZIJE

2D *in vitro* model tumorske invazije smo postavili s pomočjo sistema xCELLigence. Za teste invazije smo uporabili CIM-ploščice (Slika 10).



Slika 10. Shematični prikaz CIM-ploščice. Slednje so sestavljene iz zgornje in spodnje plošče, ki sta sestavljeni iz posameznih vdolbinic. Na dnu vdolbinic zgornje plošče se nahaja mikroporozna PET membrana z 8 μm porami, na spodnjo stran katere so pritrjene mikroelektrode iz zlata. Vdolbinice spodnje plošče služijo kot rezervoar gojišča in kemotaktnega dejavnika. Po invaziji skozi model ZCM (MatrigelTM) se celice pritrdijo na spodnjo stran membrane, kar poveča električno upornost na vgrajenih mikroelektrodah (76, 77).

Optimizacija števila celic za test invazije

24 h pred pričetkom poskusa smo celice za potrebe poskusa gojili v brezserumskem gojišču, da smo celice stradali. Na spodnji del vdolbinic zgornje ploščice smo nanесли 30 μL fibronektina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) v pufru PBS. Po 30 min inkubacije na sobni temperaturi smo v vdolbinice zgornje plošče odpipetirali po 20 μL MatrigelaTM (5 mg/mL), ki smo ga predhodno razredčili z brezserumskim gojiščem in ga nato inkubirali 30 min pri 37 °C, da je geliral. V vdolbinice spodnje ploščice smo odpipetirali 180 μL osnovnega gojišča ter spodnjo in zgornjo ploščico združili skupaj. Nato smo v vdolbinice zgornje ploščice dodali 60 μL brezserumskega gojišča in po 15 min pri 37 °C posneli na aparaturi ozadje meritve. Potem smo v vdolbinice zgornje ploščice nasadili 80 μL celic U-87 (60000, 30000 ali 10000 celic/vdolbinico) v brezserumskem gojišču, katere smo predhodno 24 h gojili v brezserumskem gojišču. V vmesne prostore vdolbinic na plošči smo dodali PBS ali destilirano vodo ter ploščice položili v sistem xCELLigence, ki je nato meril upornost vsakih 15 min 72 ur. Poskus smo ponovili 3-krat.

a) Test invazije z utišanimi celicami

Test invazije z utišanimi celicami smo izvedli po zgornjem postopku z manjšimi spremembami. 6 h pred testom invazije smo celice transfecirali s pomočjo lipofektamina s katepsin B specifično siRNA (33 nM) po postopku opisanem v poglavju 3.2.6. Nato pa smo v vdolbinice zgornje CIM-ploščice dodali 80 μL utišanih celic U-87 (30000

celic/vdolbinico) v brezserumskem gojišču. Ploščice smo pokrili s pokrovčki ter jih položili v sistem xCELLigence in spremljali invazijo 72 h. Poskus smo ponovili 3-krat. Delež invazije smo izračunali iz naklonov linearnega dela krivulj celičnega indeksa v odvisnosti od časa po *Enačbi 6*. Naklone krivulj je določila programska oprema sistema xCELLigence.

$$\text{Invazija (\%)} = 100 \cdot (\text{naklon}(\text{siRNA katepsin B})/\text{naklon}(\text{siRNA-kontrola})) \quad (\text{Enačba 6})$$

b) Test invazije ob prisotnosti inhibitorjev

Test invazije ob prisotnosti inhibitorjev smo izvedli podobno kot optimizacijo števila celic le, da smo gojišču v spodnjih in zgornjih vdolbinicah dodali nitroksolin (5 μM) ali CA-074 (5 μM), kot negativno kontrolo pa smo uporabili DMSO. Na koncu smo v zgornji razdelek nasadili celice v brezserumskem gojišču z gostoto 30000 celic/vdolbinico, ki smo jo določili pri optimizaciji števila celic za test invazije. Poskus smo izvedli 2-krat. Delež invazije smo izračunali po *Enačbi 7*.

$$\text{Invazija (\%)} = 100 \cdot (\text{naklon}(\text{inhibitor})/\text{naklon}(\text{kontrola})) \quad (\text{Enačba 7})$$

3.2.12 3D IN VITRO MODEL TUMORSKE INVAZIJE

Sferoide celic U-87 smo pripravili z metodo viseče kapljice (*angl. hanging drop method*), ki omogoča pripravo homogenih sferičnih celičnih agregatov različnih celičnih linij (79).

Optimizacija priprave sferoidov z metodo viseče kapljice

20 μL celične suspenzije (150, 250, 500, 750 in 1000 celic U-87/20 μL) smo odpipetirali v obliki kapljice na notranjo površino pokrova petrijevke. Nato smo pokrov petrijevke obrnili in z njim pokrili spodnji del petrijevke, v katerega smo predhodno odmerili 10 mL destilirane vode ali PBS, da smo preprečili izsušitev kapljic v času rasti sferoidov. Petrijevke smo inkubirali na 37 °C in vsakodnevno (en teden) spremljali rast sferoidov s svetlobnim mikroskopom, ki smo ga opremili z okularjem z mikromerilom. Vsak dan smo sferoide tudi fotografirali. Na podlagi rezultatov smo določili, katera je primerna začetna koncentracija celic, in ugotovili čas inkubacije, ki je potreben za pripravo sferoidov ponovljivih dimenzij in oblik.

Implantacija sferoidov v model ZCM (Matrigel™)

Za potrebe poskusa smo uporabili sferoide, ki smo jih pripravili tako, da smo uporabili začetno koncentracijo 150 celic/20 μL in jih inkubirali 5 dni. V vdolbinice ohlajene Lab-Tek™ Chambered Coverglass ploščice z 8 vdolbinicami smo nanesti 70 μL Matrigela™ (5 mg/mL) v brezserumskem gojišču z nitroksolinom (10 μM) ali CA-074Me (10 μM). Kot negativno kontrolo smo uporabili DMSO. Ploščico smo inkubirali 5 min pri 37 °C, da je Matrigel™ geliral. Nato smo s pipeto v vsako vdolbinico vstavili 3 sferoide, ki smo jih zatem pokrili s 70 μL Matrigela™ (5 mg/mL) v brezserumskem gojišču z nitroksolinom (10 μM) ali CA-074Me (10 μM) oz. DMSO kot negativno kontrolo. Po 20 min inkubacije pri 37 °C smo v vdolbinice odpipetirali 400 μL osnovnega gojišča, ki je vsebovalo ustrezne inhibitorje (10 μM) ali DMSO kot kontrolo. Rast sferoidov smo spremljali 72 h s svetlobnim mikroskopom, opremljenim z okularjem z mikromerilom. Reprezentativne slike sferoidov smo posneli z motoriziranim invertnim mikroskopom Olympus IX in Cell™ programsko opremo 2. dan po implantaciji sferoidov. Volumen sferoidov smo izračunali po *Enačbi 8*.

$$V = d_{\max} \cdot d_{\min}^2 \cdot \pi/6 \quad (\text{Enačba 8})$$

d_{\max} = maksimalni premer sferoida

d_{\min} = minimalni premer sferoida

3.2.13 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate smo statistično analizirali s programom Microsoft Office Excel 2007, in sicer s Studentovim obojestranskim t-testom. Kot statistično različni smo smatrali dve skupini podatkov (med negativno kontrolo in inhibitorjem ali med celicami U-87 in MCF-10A neoT), kadar je bila vrednost $p < 0,05$. $P < 0,05$ je označena na grafih z *, $p < 0,01$ z ** in $p < 0,001$ z ***.

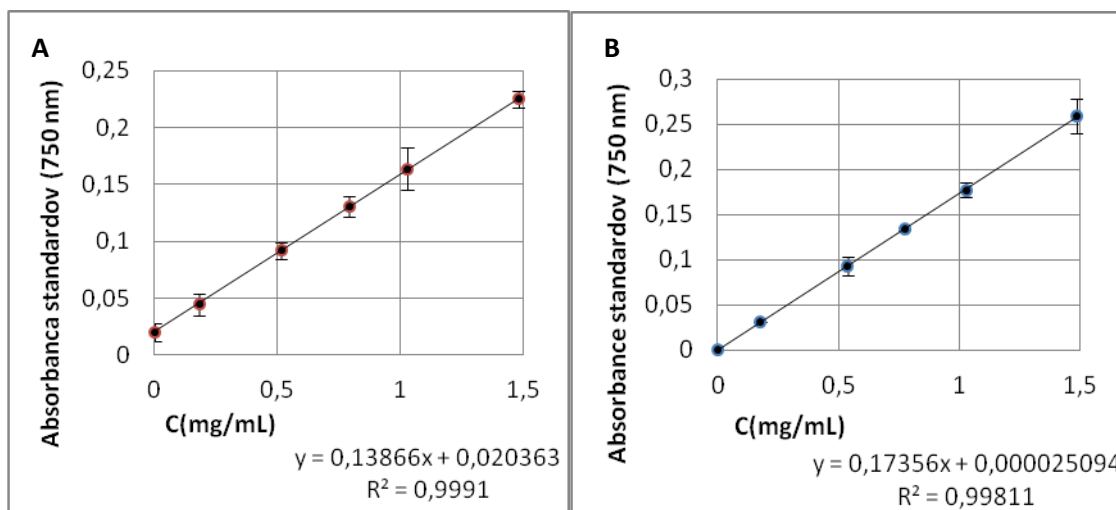
4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN AKTIVNOSTI

KATEPSINA B V CELICAH U-87

a) Določanje celokupne koncentracije proteinov v celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču celične linije U-87

Z modificirano metodo po Lowryju smo določili celokupno koncentracijo proteinov v celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču celic U-87. S pomočjo standardnih raztopin BSA v lizirnem ali acetatnem pufru smo naredili umeritveno krivuljo (Slika 11). Iz te smo preko izmerjene absorbance vzorcev določili koncentracijo celokupnih proteinov v posameznem vzorcu (Preglednica III).



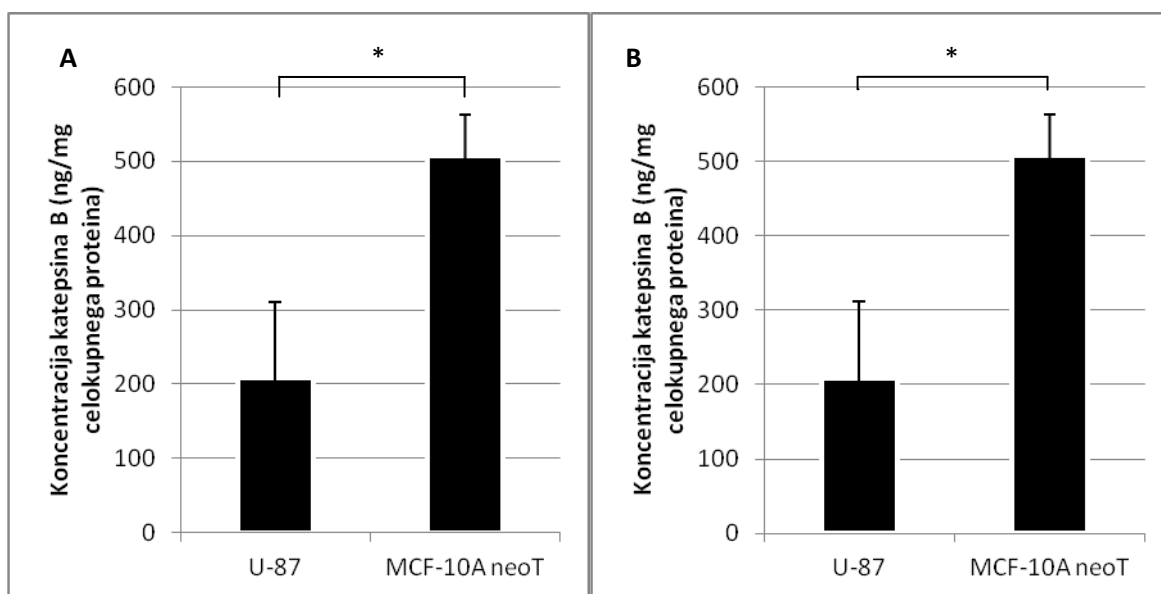
Slika 11. Umeritveni krivulji za določevanje celokupne koncentracije proteinov v celičnih lizatih (A) in kondicioniranem gojišču (B) celic U-87.

	C (mg/mL)	
	celični lizati	gojišče
Vzorec 1	5,8 ± 0,2	12,6 ± 0,5
Vzorec 2	10,4 ± 1,0	10,9 ± 0,3
Vzorec 3	5,6 ± 0,1	17,9 ± 0,4

Preglednica III. Koncentracija celokupnih proteinov v celičnih lizatih in gojišču celic U-87. Vrednosti predstavljajo povprečje ± SD (n = 2).

b) Določanje celokupne koncentracije katepsina B v celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču celične linije U-87

Z direktnim testom ELISA smo določili celokupno koncentracijo katepsina B v celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču celic U-87. Iz standardnih raztopin rekombinantnega katepsina B smo naredili umeritveno krivuljo, iz katere smo določili koncentracijo katepsina B v posameznem vzorcu. Celokupna koncentracija katepsina B v lizatih celične linije U-87 je znašala 208 ± 103 ng/mg, kar je značilno manjše od koncentracije katepsina B, ki so jo določili v celični liniji raka dojke MCF-10A neo T (508 ± 55 ng/mg) v predhodni študiji (Mirković in sod., neobjavljeni rezultati) (Slika 12A). V kondicioniranem gojišču celic U-87 je celokupna koncentracija katepsina B znašala $1,5 \pm 0,6$ ng/mg, kar je značilno manjše od koncentracije katepsina B v gojišču celične linije MCF-10A neoT ($3,4 \pm 0,3$ ng/mg) (Slika 12B).

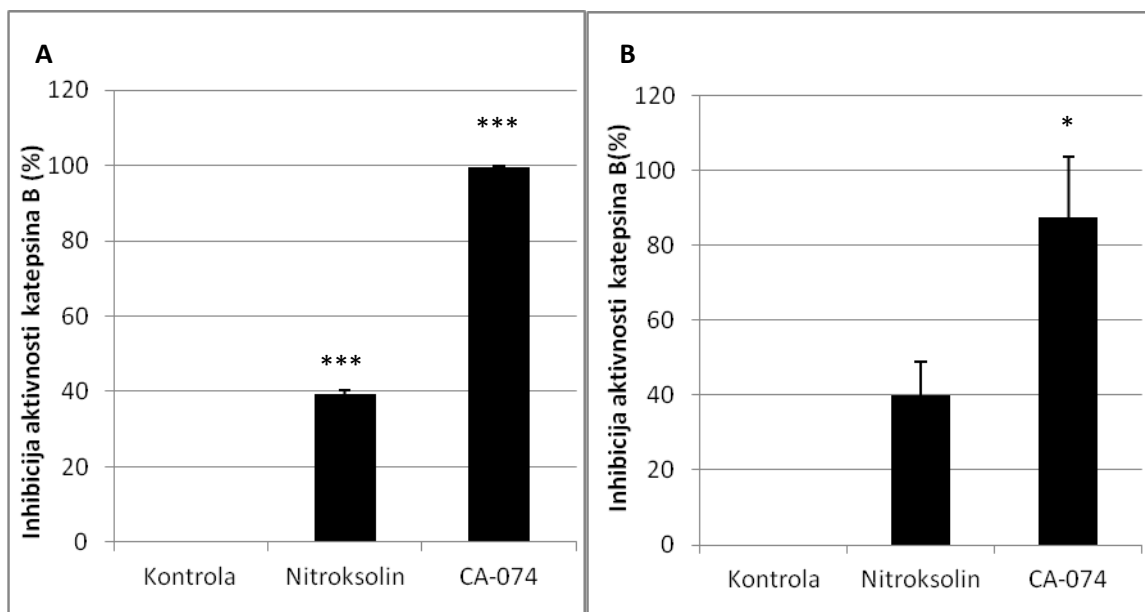


Slika 12. Primerjava celokupnih koncentracij katepsina B v celičnih lizatih (A) in kondicioniranem gojišču (B) celičnih linij U-87 in MCF-10A neoT. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD ($n = 3$). * $p < 0,05$

c) Določanje aktivnosti katepsina B v celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču celic U-87

Aktivnost katepsina B v celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču smo določili s pomočjo katepsin B-specifičnega substrata Z-RR-AMC. Proteolitično aktivni katepsin B smo zaznali tako v lizatih celic U-87 ($276,2 \pm 3,3$ RFU/s \cdot mg $^{-1}$) kot tudi v kondicioniranem gojišču ($0,30 \pm 0,03$ RFU/s \cdot mg $^{-1}$). Ob uporabi katepsin B specifičnega inhibitorja CA-074

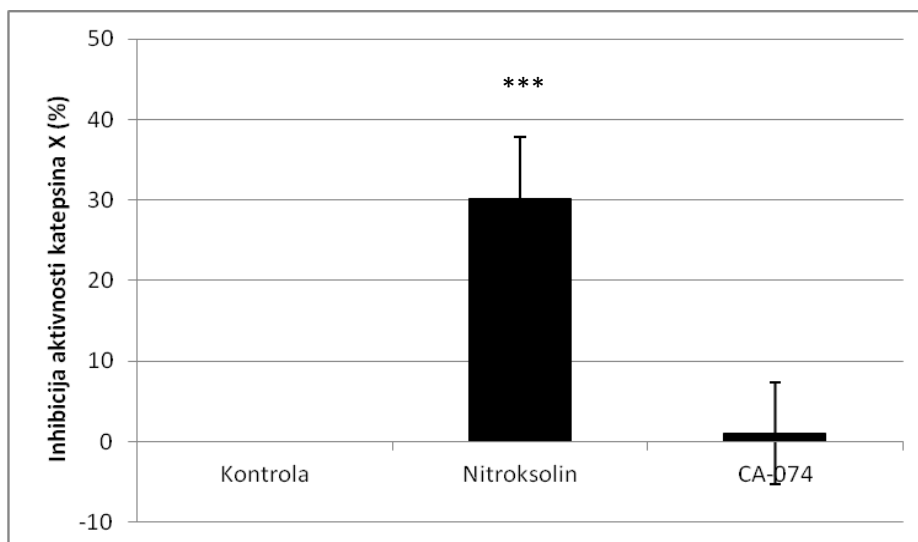
smo opazili skoraj popolno inhibicijo endopeptidazne aktivnosti Katepsina B ($99,7 \pm 0,1$ % v celičnih lizatih in $87,6 \pm 16$ % v kondicioniranem gojišču), kar dokazuje, da je aktivnost, ki smo jo zaznali z za Katepsin B specifičnim substratom Z-RR-AMC, na račun Katepsina B. Nitroksolin je inhibiral endopeptidazno aktivnost Katepsina B za $39,4 \pm 0,9$ % v celičnih lizatih in za $39,9 \pm 9,0$ % v kondicioniranem gojišču celic U-87 (Slika 13).



Slika 13. Inhibitorni učinek inhibitorjev nitroksolina in CA-074 na aktivnost Katepsina B v celičnih lizatih (A) in kondicioniranem gojišču (B) celic U-87 glede na negativno kontrolo. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD ($n = 3$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

4.2 DOLOČANJE AKTIVNOSTI KATEPSINA X V CELICAH U-87

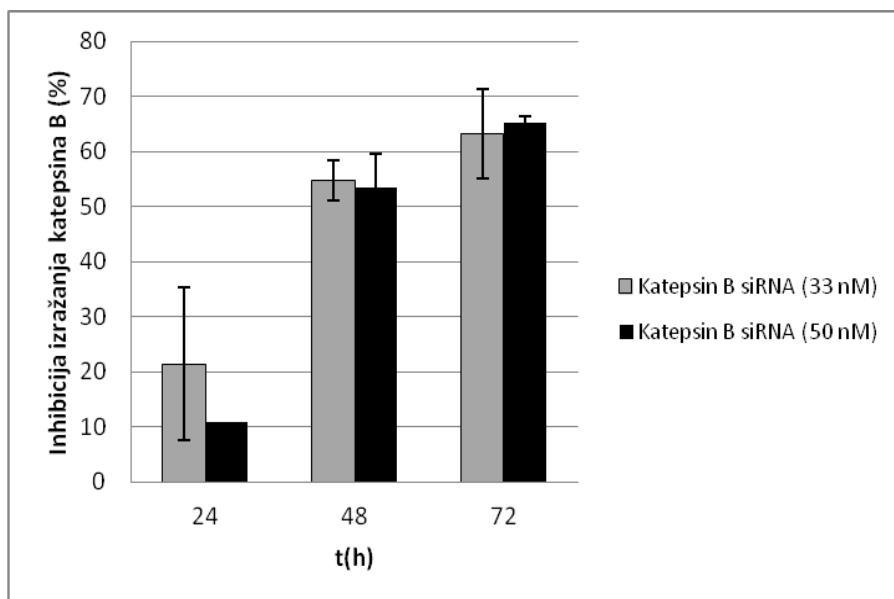
Aktivnost Katepsina X in inhibicijo njegove aktivnosti z nitroksolinom in CA-074 smo določili s pomočjo spremljanja encimske aktivnosti in z uporabo substrata, specifičnega za Katepsin X. Z uporabo omenjenega substrata smo v celičnih lizatih celic U-87 zaznali proteolitično aktivni Katepsin X ($93,5 \pm 7,1$ RFU/s \cdot mg $^{-1}$). Vrednosti aktivnosti Katepsina X celičnih lizatih celic U-87 so v primerjavi z vrednostmi aktivnosti Katepsina B ($276,2 \pm 3,3$ RFU/s \cdot mg $^{-1}$), mnogo manjše. Medtem ko CA-074 po pričakovanjih ni izkazoval inhibicije Katepsina X ($1,1 \pm 6,3$ %), je nitroksolin značilno inhibiral aktivnost Katepsina X v celičnih lizatih U-87, in sicer za $30,2 \pm 7,6$ % ($p < 0,001$) (Slika 14).



Slika 14. Inhibitorni učinek inhibitorjev nitroksolina in CA-074 na aktivnost katepsina X v celičnih lizatih U-87 glede na negativno kontrolo. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD ($n = 3$). *** $p < 0,001$.

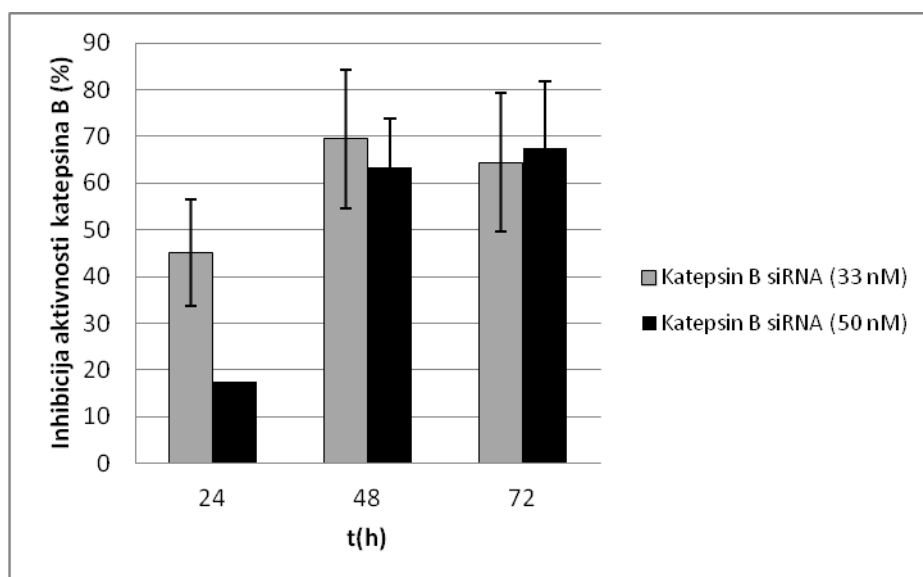
4.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN AKTIVNOSTI KATEPSINA B V UTIŠANIH CELICAH U-87

Po transfekciji celic s siRNA za katepsin B ali kontrolno siRNA z dvema različnima koncentracijama (33 in 50 nM) smo pripravili celične lizate ter jim določili koncentracijo in aktivnost katepsina B. Celične lizate smo pripravili 24, 48 in 72 h po transfekciji. Z direktnim testom ELISA smo celičnim lizatom določili celokupno koncentracijo katepsina B in potrdili, da interferenčna RNA, specifična za katepsin B, zmanjša izražanje katepsina B v celicah U-87 po 24, 48 in 72 h pri uporabljenih koncentracijah siRNA (Slika 15).



Slika 15. Inhibicija izražanja katepsina B v odvisnosti od časa utišanja gena za katepsin B in koncentracije siRNA. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD ($n = 2$).

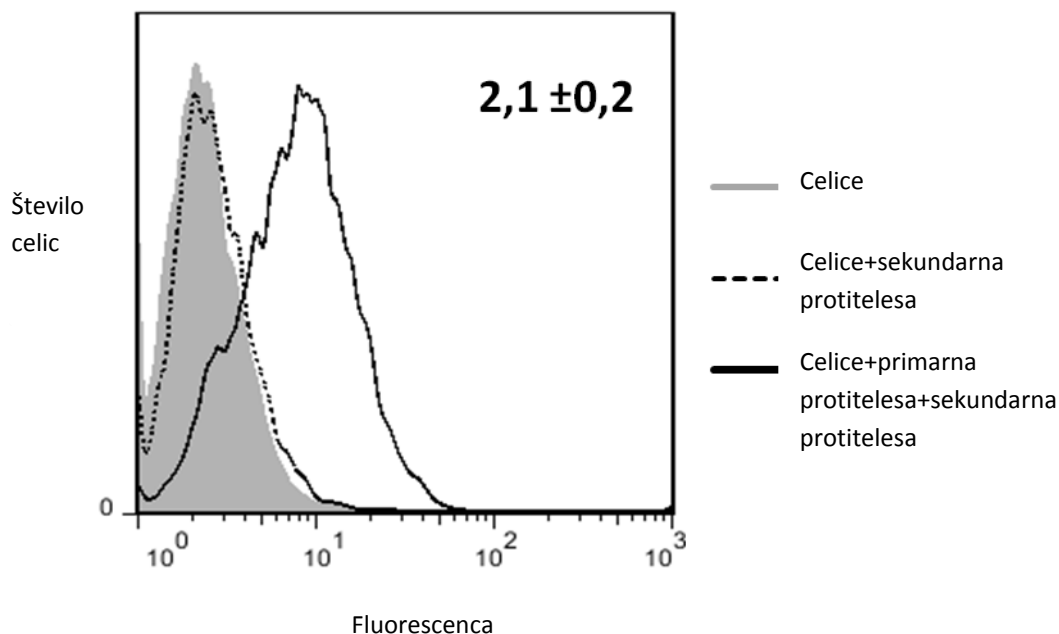
Inhibicijo aktivnosti katepsina B po utišanju celic s siRNA smo določili z encimsko kinetiko ob uporabi specifičnega substrata za katepsin B. Utišanje celic U-87 s siRNA za katepsin B je značilno zmanjšalo aktivnost katepsina B po 24, 48 in 72 h pri uporabljenih koncentracijah siRNA (Slika 16).



Slika 16. Inhibicija aktivnosti katepsina B v odvisnosti od časa utišanja gena za katepsin B in koncentracije siRNA. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD ($n = 2$).

4.4 DOLOČANJE KATEPSINA B NA POVRŠINI CELIC U-87

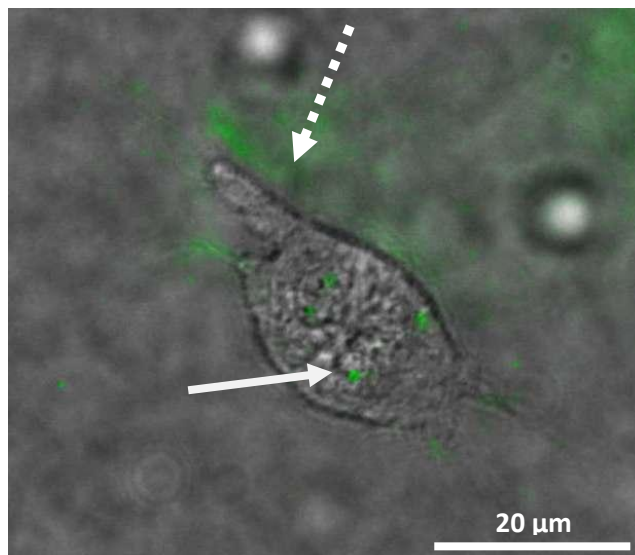
Katepsin B na površini celic smo določili s pretočno citometrijo. Iz statistično značilnega porasta fluorescence celic, ki smo jih označili s primarnimi protitelesi proti katepsinu B in sekundarnimi fluorescenčno označenimi protitelesi, v primerjavi s celicami, ki smo jih označili samo s sekundarnimi protitelesi, lahko sklepamo na prisotnost katepsina B na površini celic U-87 (Slika 17).



Slika 17. Prisotnost katepsina B na površini celic U-87. Številka v desnem zgornjem kotu pomeni 2,1-kraten porast fluorescence dvojno označenih celic v primerjavi s celicami, ki so bile označene samo s sekundarnimi protitelesi. Sivi histogram predstavlja neoznačene celice, črna črta predstavlja dvojno označene celice, medtem ko prekinjena črta predstavlja celice označene s sekundarnimi protitelesi. Vrednost predstavlja povprečje \pm SD ($n = 2$).

4.5 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

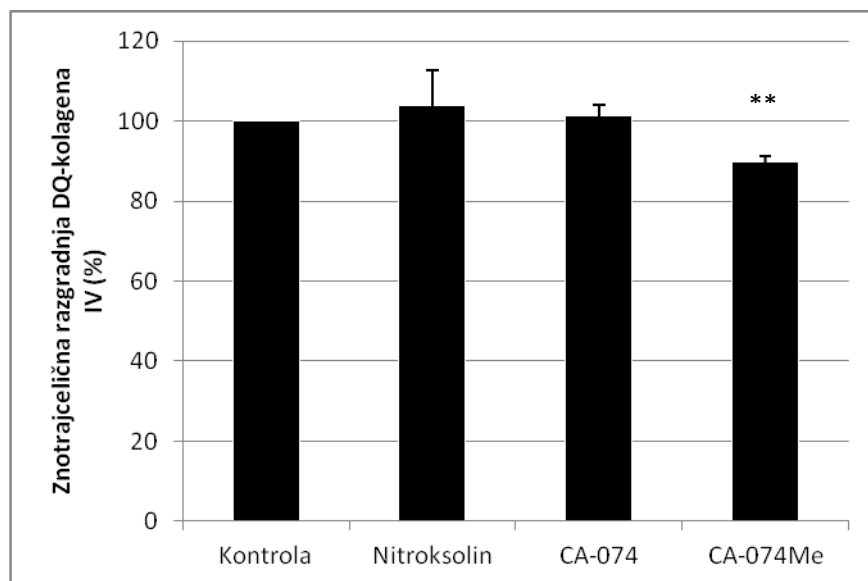
Z invertnim motoriziranim mikroskopom in s CellTM programsko opremo smo posneli razgradnjo fluorescenčnega DQ-kolagena tipa IV v celicah U-87, ki smo jih nasadili na model ZCM (MatrigelTM). Razgradne produkte DQ-kolagena IV smo detektirali v strukturah znotraj celic U-87, veliko kolagena pa je bilo prisotnega tudi v neposredni okolici celic, kar nakazuje na obsežno znotraj- in zunajcelično razgradnjo ZCM v prisotnosti celic U-87. Poleg tega so celice U-87 tvorile t.i. psevdopodije, ob katerih smo lahko opazili veliko razgradnih produktov DQ-kolagena IV (Slika 18).



Slika 18. Razgradnja DQ-kolagena IV v celicah U-87. Razgrajeni DQ-kolagen IV se nahaja v veziklih, podobnih lizosomom/endosomom, na površini in v okolici celic U-87, predvsem ob psevdopodijih. S črtkano puščico je označena zunajcelična razgradnja, s polno puščico pa znotrajcelična razgradnja.

4.6 DOLOČANJE INHIBICIJE ZNOTRAJCELIČNE RAZGRADNJE PROTEINOV ZCM

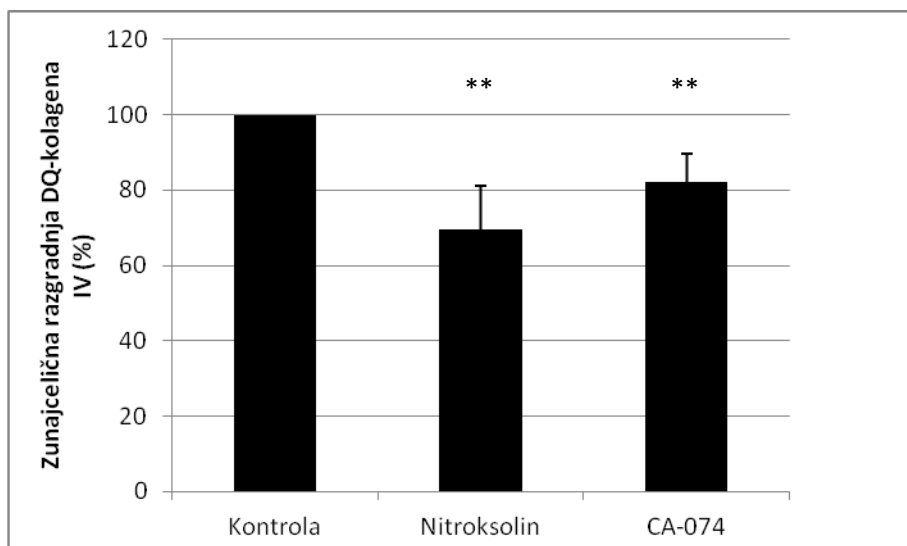
S pretočno citometrijo smo kvantitativno določili znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena tipa IV. Da bi določili vlogo katepsina B pri znotrajcelični razgradnji proteinov ZCM, smo pri poskusu uporabili inhibitorje katepsina B. CA-074 po pričakovanjih ni izkazoval inhibicije, saj ne prehaja celične membrane ($-1,4 \pm 2,5 \%$), medtem ko je njegov metilni ester, CA-074Me, značilno inhibiral razgradnjo DQ-kolagena IV ($10,3 \pm 1,4 \%$, $p < 0,01$). Nitroksolin ni izkazoval inhibicije znotrajcelične razgradnje proteinov ZCM ($-3,9 \pm 8,7 \%$) (Slika 19).



Slika 19. Znotrajcelična razgradnja DQ-kolagena IV ob prisotnosti inhibitorjev ali negativne kontrole v celicah U-87. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD (n = 4). ** p < 0,01.

4.7 DOLOČANJE INHIBICIJE ZUNAJCELIČNE RAZGRADNJE PROTEINOV ZCM

Zunajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV smo določili s fluorescenčno spektrofotometrijo, kjer smo spremljali porast fluorescence ob proteolitični razgradnji DQ-kolagena IV. Oba preizkušena inhibitorja katepsina B sta značilno zmanjšala zunajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV: nitroksolin je značilno inhibiral razgradnjo DQ-kolagena IV za $30,6 \pm 11,8$ % (p < 0,01), medtem ko je CA-074 značilno zmanjšal razgradnjo za $18,0 \pm 7,8$ % (p < 0,01) (Slika 20).

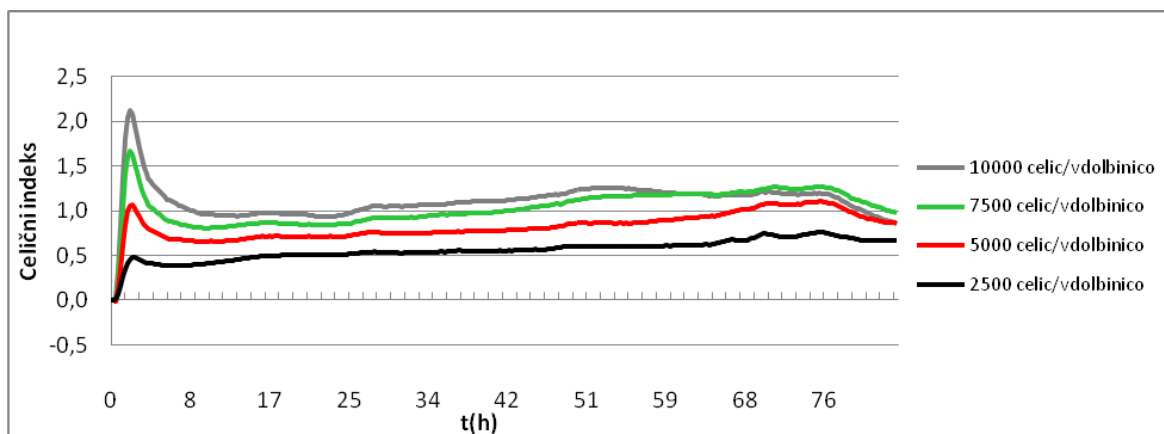


Slika 20. Zunajcelična razgradnja DQ-kolagena IV ob prisotnosti inhibitorjev ali negativne kontrole celic U-87. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD (n = 4). ** p < 0,01.

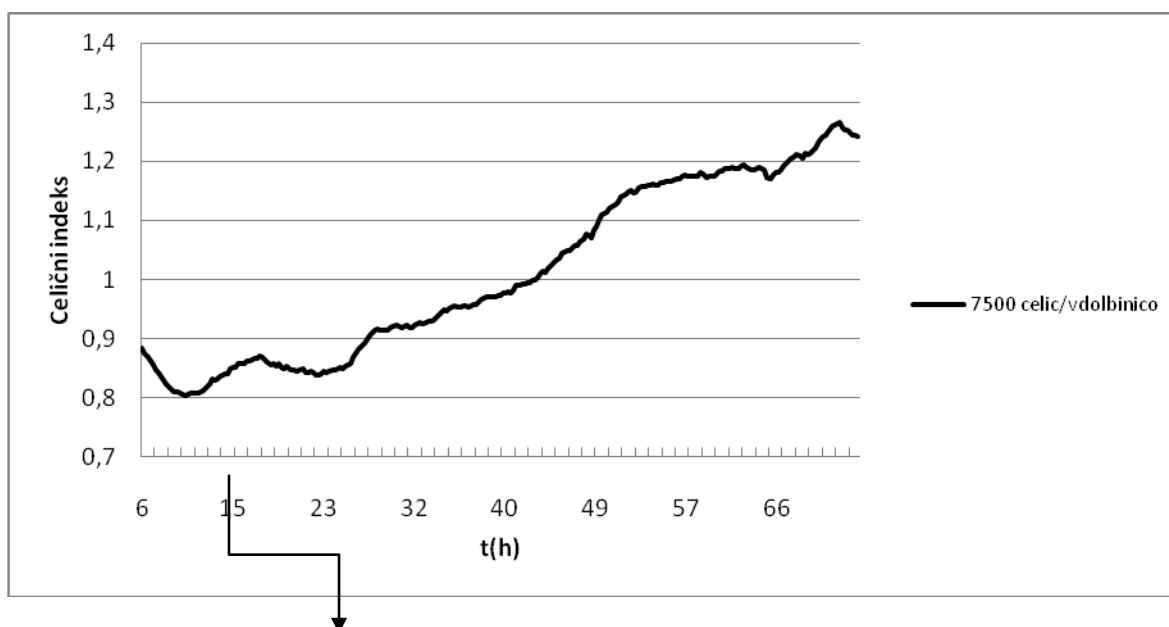
4.8 DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI INHIBITORJEV

S pomočjo sistema xCELLigence smo postavili 2D celični model tumorske invazije. Da bi izključili možnost inhibicije invazije na račun citotoksičnosti spojin, smo pred testom invazije določili še citotoksičnost inhibitorjev.

Najprej smo optimizirali število celic, ki jih potrebujemo za poskus določanja citotoksičnosti inhibitorjev (Slika 21). Na podlagi krivulj rasti celic smo za nadaljnje delo izbrali 7500 celic/vdolbinico, saj je takšna koncentracija celic imela najprimernejšo krivuljo rasti. Ravno tako smo določili časovno točko 14 h po nasaditvi celic, kot primerno za dodatek inhibitorjev, ker so takrat celice prešle v logaritemsko fazo rasti (Slika 22).



Slika 21. Optimizacija števila celic za test citotoksičnosti inhibitorjev. Graf prikazuje celični indeks (vrednost celičnega indeksa je povprečje 4 ponovitev) v odvisnosti od časa inkubacije. Preizkusili smo 4 koncentracije celic: 10000, 7500, 5000 in 2500 celic/vdolbinico.

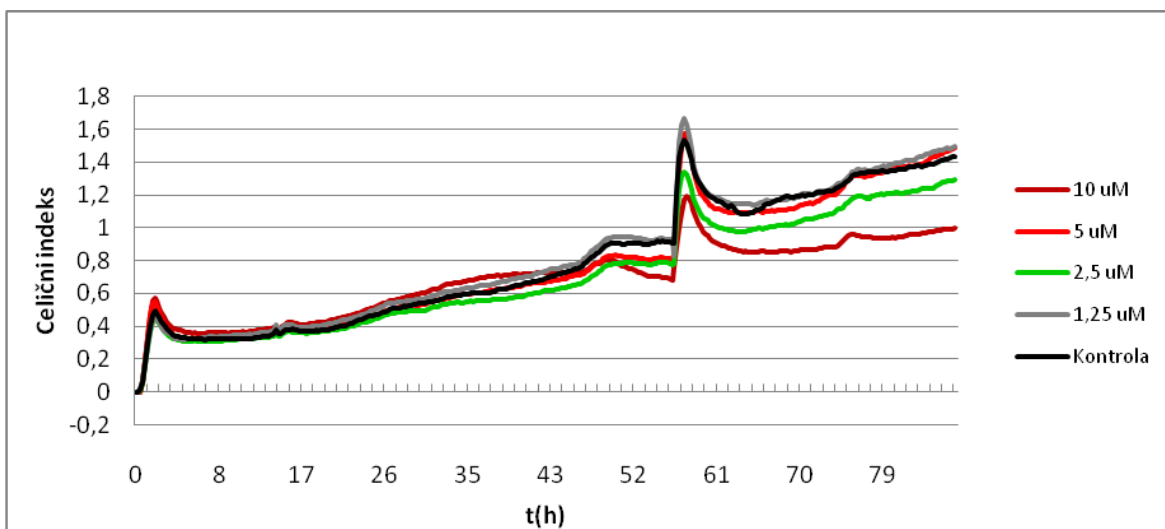


Po 14 urah- inkubacija/tretiranje z inhibitorji

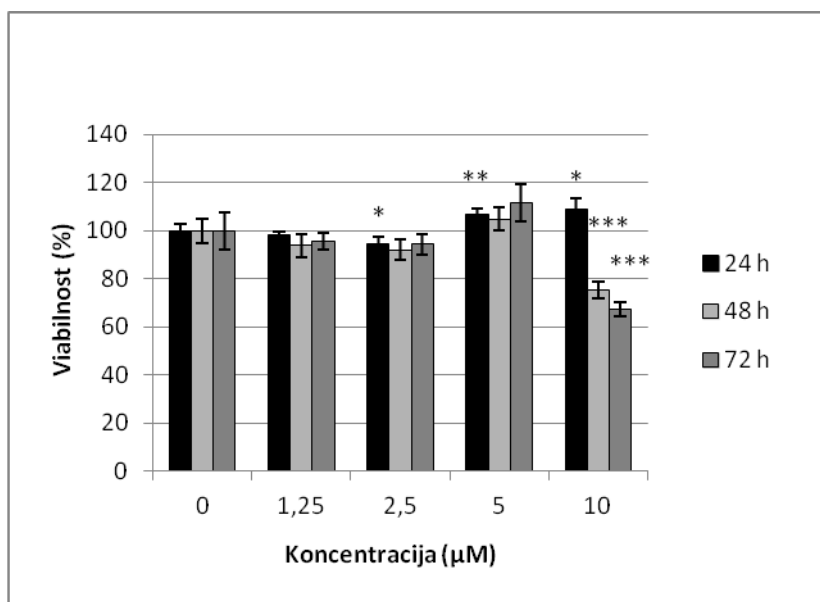
Slika 22. Odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 4 ponovitev) od časa inkubacije prikazuje rast celic pri optimalnem številu celic (7500 celic/vdolbinico). Po 14 h inkubacije smo celice dodali inhibitorje.

Po določitvi optimalnega števila celic (7500 celic/vdolbinico) in časovne točke (14 h) smo nato opravili test citotoksičnosti inhibitorjev, v katerem smo spremljali viabilnost celic po izpostavitvi različnim koncentracijam inhibitorjev (Slika 23 in 25). Nitroksolin je značilno inhibiral viabilnost celic U-87 pri koncentraciji 10 μM po 48 ($24,6 \pm 3,6 \%$, $p < 0,001$) in

72 h ($32,6 \pm 2,9 \%$, $p < 0,001$) (Slika 24), medtem ko pri nižjih koncentracijah ni izkazoval učinka. Po 24 h je nitroksolin v koncentraciji 5 ($107,0 \pm 2,2 \%$, $p < 0,01$) in 10 μM ($109,1 \pm 4,5 \%$, $p < 0,05$) povzročil prehodno značilno povečanje viabilnosti celic. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo pri poskusu invazije kot delovno koncentracijo nitroksolina izbrali 5 μM .

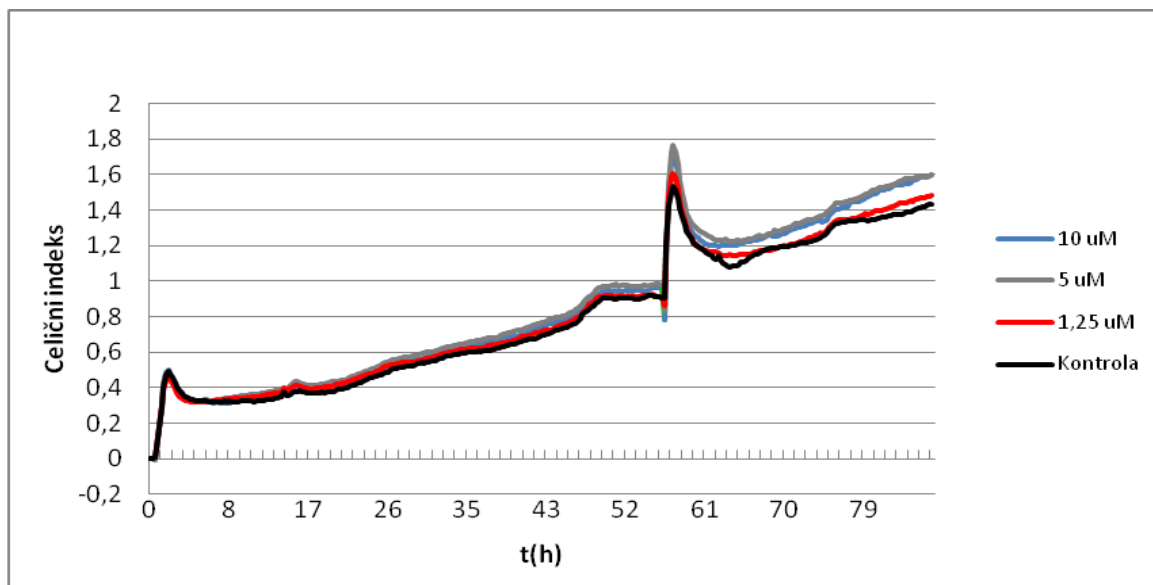


Slika 23. Odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 4 ponovitev) od časa inkubacije prikazuje vpliv različnih koncentracij nitroksolina na viabilnost celic U-87.

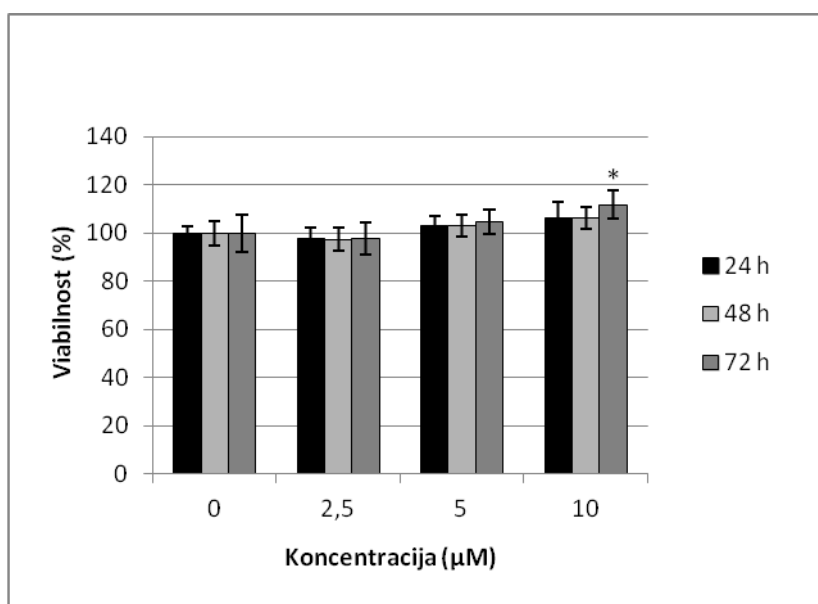


Slika 24. Viabilnost celic po dodatku različnih koncentracij nitroksolina. Viabilnost smo spremljali 72 h. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD ($n = 4$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Spojina CA-074 je značilno povečala viabilnost celic U-87 pri koncentraciji 10 μM po 72 h (Slika 26). Ker pri ostalih koncentracijah (2,5 in 5 μM) ni izkazovala učinka na viabilnost celic, smo kot delovno koncentracijo spojine pri nadaljnjih poskus izbrali 5 μM . Takšno koncentracijo spojine CA-074 pa smo izbrali tudi zaradi lažje izvedbe eksperimenta, saj je bila izbrana delovna koncentracija nitroksolina tudi 5 μM .



Slika 25. Odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 4 ponovitev) od časa inkubacije prikazuje vpliv različnih koncentracij CA-074 na viabilnost celic U-87.

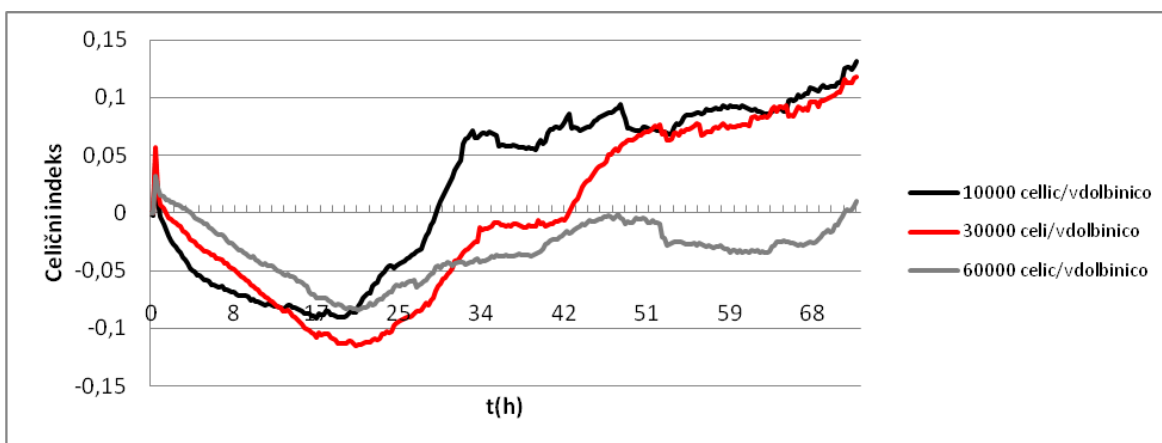


Slika 26. Viabilnost celic po dodatku različnih koncentracij CA-074. Viabilnost smo spremljali 72 ur. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD ($n = 4$). * $p < 0,05$

4.9 POSTAVITEV 2D CELIČNEGA MODELA TUMORSKE INVAZIJE

Optimizacija števila celic za test invazije

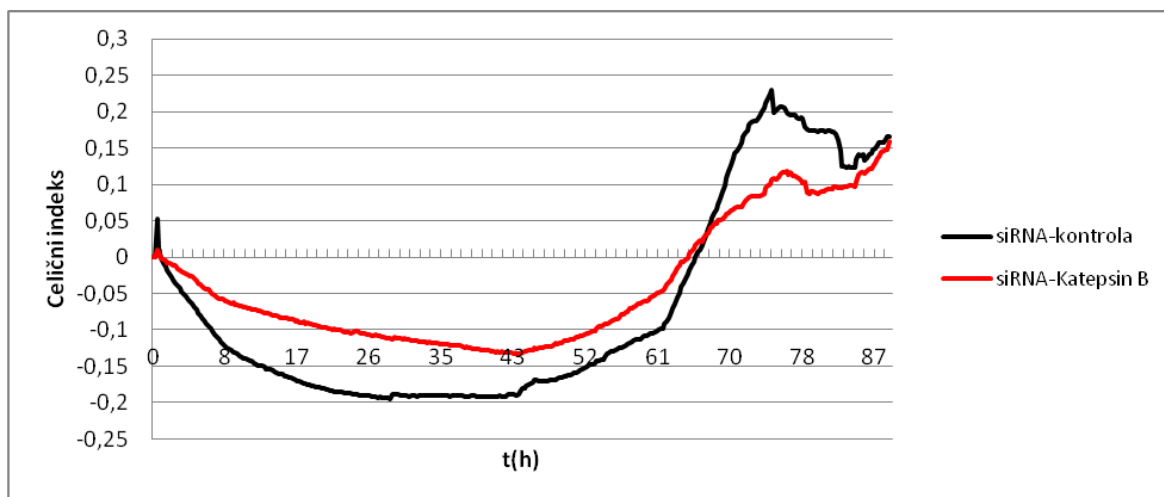
Pred postavitvijo 2D modela *in vitro* tumorske invazije smo najprej določili optimalno število celic za izvedbo poskusa. V ta namen smo v vdolbinice CIM-plošče nasadili tri koncentracije celic U-87 (10000, 30000 in 60000 celic/vdolbinico), od katerih je imela koncentracija 3000 celic/vdolbinico najprimernejši profil invazije za nadaljnje delo (Slika 27).



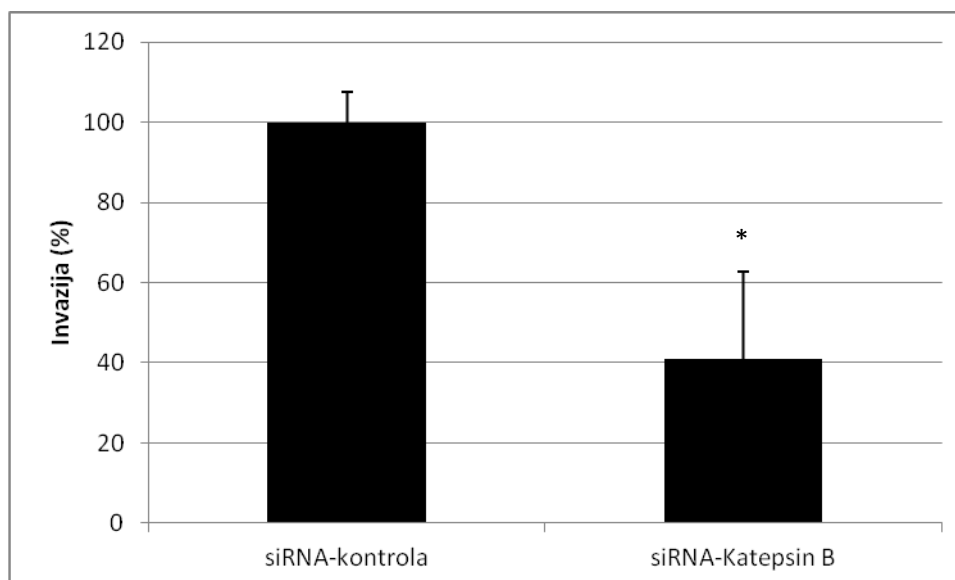
Slika 27. Optimizacija števila celic za test invazije. Graf prikazuje odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 3 ponovitev) v odvisnosti od časa inkubacije. Preizkusili smo 3 koncentracije: 10000, 30000 in 60000 celic/vdolbinico.

a) Test invazije z utišanimi celicami

Da bi potrdili vlogo katepsina B pri invaziji celic U-87, smo v le-teh prehodno utišali izražanje katepsina B s tehnologijo siRNA. Test invazije smo izvedli 6 h po transfekciji celic U-87 s katepsin B specifično siRNA. Invazijo celic U-87 smo izračunali na podlagi naklonov krivulj celičnega indeksa v odvisnosti od časa invazije (Slika 28) znotraj časovnega intervala: 61,7 – 74,3 ur po *Enačbi 6*. Utišanje izražanja katepsina B v celicah U-87 je povzročilo statistično značilno inhibicijo invazije celic, in sicer $41,0 \pm 21,8 \%$ ($p < 0,05$) glede na kontrolno siRNA (Slika 29).



Slika 28. Odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 3 ponovitev) utišanih in kontrolnih celic od časa inkubacije.

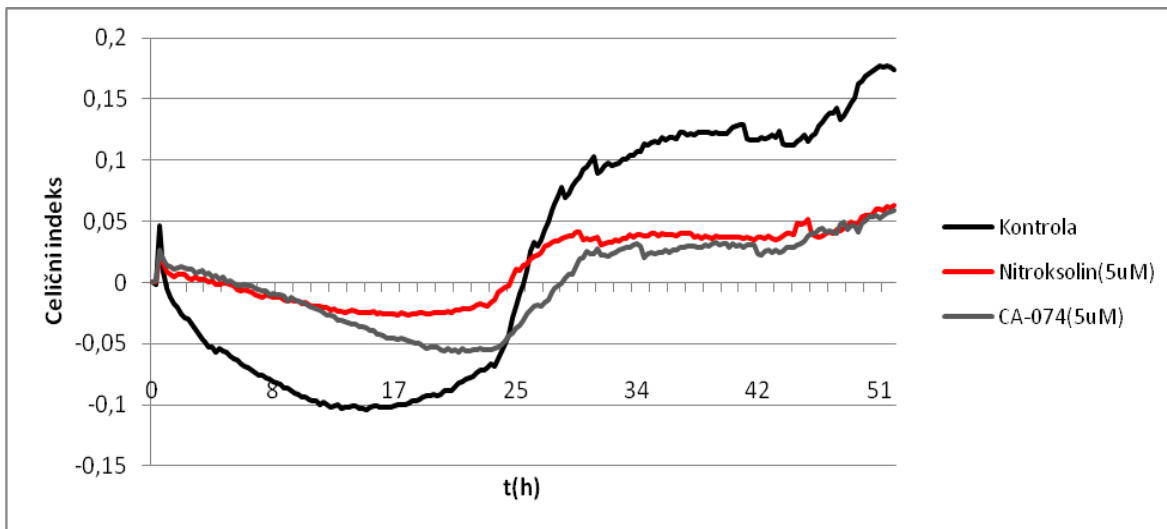


Slika 29. Utišanje izražanja katepsin B s siRNA inhibira invazijo U-87 celic. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD (n = 3). * p < 0,05.

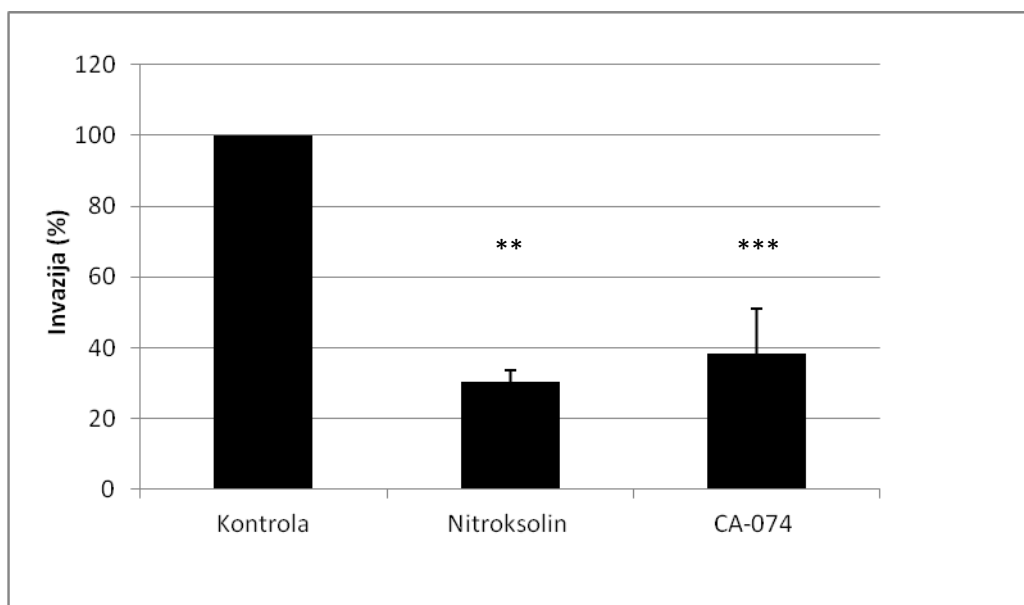
b) Test invazije z inhibitorji

Test invazije na aparaturi xCELLigence smo izvedli še z inhibitorjema katepsina B, CA-074 in nitroksolinom, katerih koncentracije smo izbrali na podlagi testa citotoksičnosti. Naklone krivulj celičnega indeksa v odvisnosti od časa invazije (Slika 30) smo izračunali v časovnem intervalu: 19,0 – 51,8 h, nato pa smo iz naklonov izračunali inhibicijo invazije celic po *Enačbi 7*. Inhibitorja katepsina B nitroksolin in CA-074 sta značilno inhibirala

invazijo celic U-87. CA-074 je inhibiral invazijo celic U-87 za $61,7 \pm 9,5$ % ($p < 0,001$), nitroksolin pa za $69,6 \pm 3,3$ %, ($p < 0,01$) (Slika 31).



Slika 30. Odvisnost celičnega indeksa (vrednost celičnega indeksa je povprečje 3 ponovitev) od časa inkubacije in prisotnosti inhibitorjev CA-074 in nitroksolina.



Slika 31. Učinek inhibitorjev nitroksolina in CA-074 na invazijo celic U-87 glede na negativno kontrolo. Vrednosti predstavljajo povprečje \pm SD ($n = 2$). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.10 POSTAVITEV 3D CELIČNEGA MODELA TUMORSKE INVAZIJE

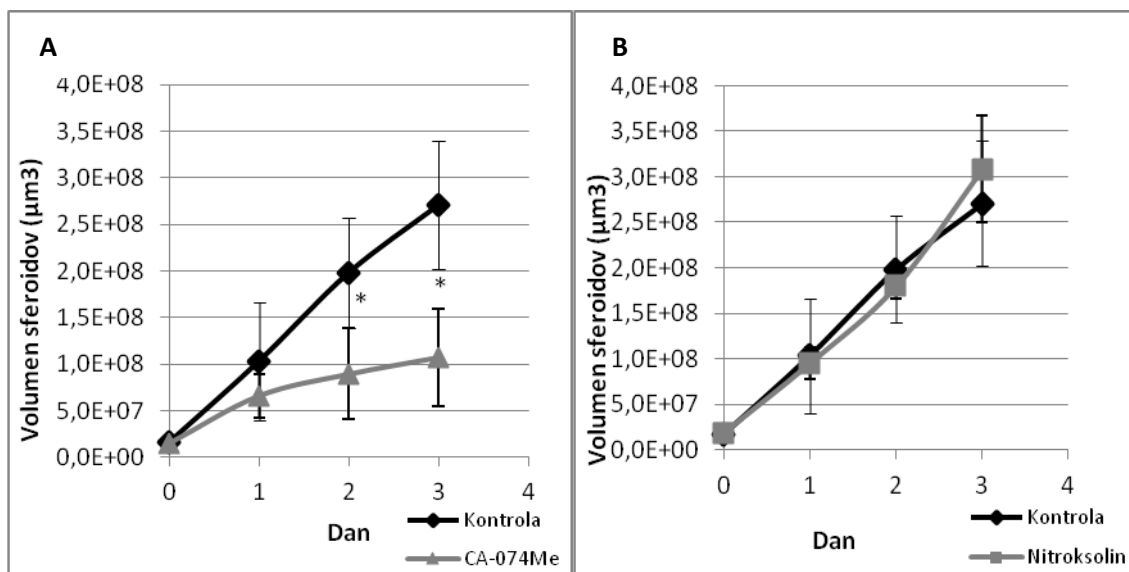
Z metodo viseče kapljice smo pripravili sferične celične agregate - sferoide, ki smo jih implantirali v model ZCM (Matrigel™) ter opazovali inhibicijo njihove rasti ob uporabi inhibitorjev katepsina B.

Optimizacija priprave sferoidov

Za potrebe 3D celičnega modela invazije smo najprej optimizirali število celic in čas inkubacije, ki sta bila potrebna za pripravo sferoidov ponovljivih dimenzij in oblik. V ta namen smo pripravili sferoide z metodo viseče kapljice z različnimi koncentracijami celic (150, 250, 500, 750 in 1000 celic/20 μ L) in jih en teden dnevno spremljali s svetlobnim mikroskopom, opremljenim z okularjem z mikrometrom. Zaželeno je, da so sferoidi pred implantacijo v Matrigel™ čim bolj sferične oblike. Glede na posnete fotografije smo določili 150 celic/20 μ L kot najbolj optimalno koncentracijo celic ter 5 dni kot optimalni čas inkubacije za pripravo sferoidov (Preglednica IV v Prilogi). Sferoidi so dosegali ponovljive dimenzije. Povprečna velikost sferoida pred implantacijo je tako znašala $0,012 \pm 0,0041 \text{ mm}^3$.

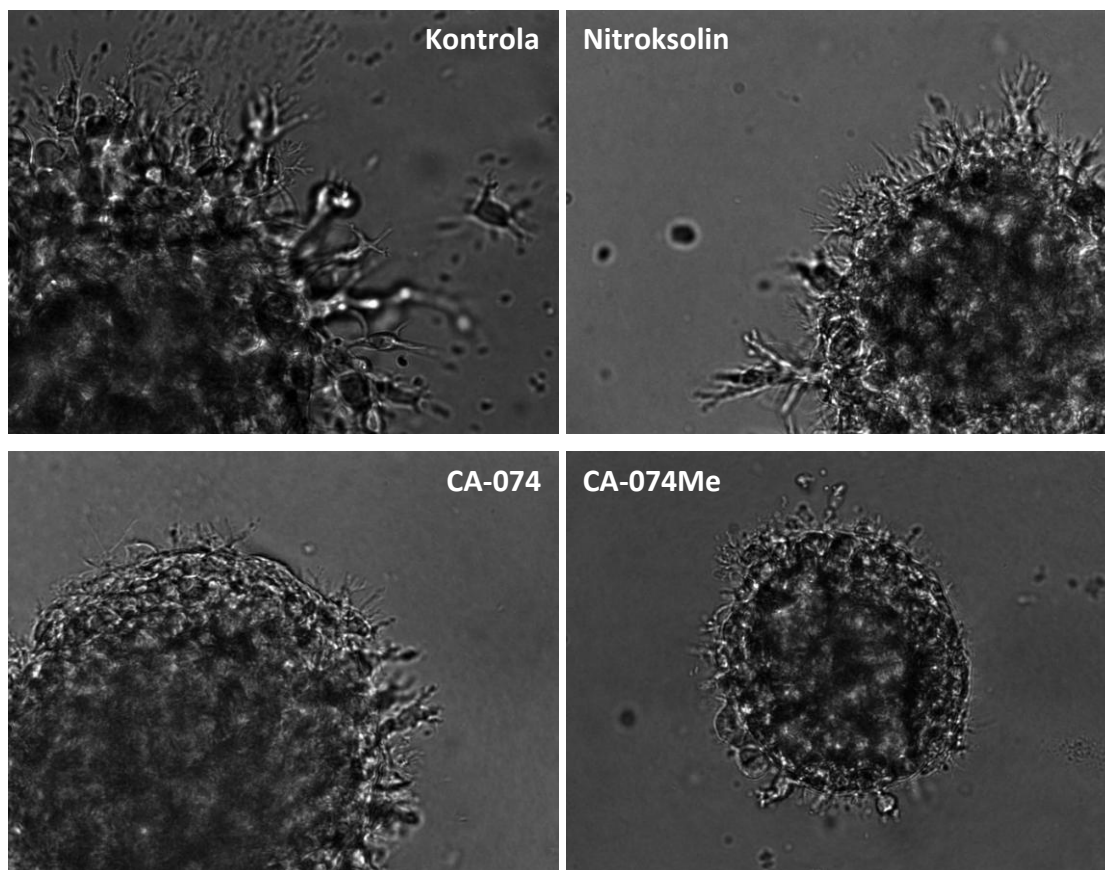
Implantacija sferoidov in spremljanje invazije

S pomočjo svetlobnega mikroskopa z okularjem z mikromerilom smo po implantaciji sferoidov v model ZCM (Matrigel™) dnevno 3 dni spremljali rast in invazijo sferoidov, katerih volumen smo izračunali po *Enačbi 8*. Na inhibicijo tumorske invazije v 3D celičnem modelu smo sklepali iz primerjave velikosti sferoidov, izpostavljenih negativni kontroli (DMSO) oziroma inhibitorjem. CA-074Me je značilno inhibiral invazijo celic U-87 2. in 3. dan po implantaciji sferoidov v Matrigel™ (Slika 32A). Nitroksolin ni izkazoval statistično značilne inhibicije rasti sferoidov (Slika 32B).



Slika 32. Učinek inhibitorjev CA-074Me (A) in nitroksolina (B) na rast sferoidov implantiranih v Matrigel™ glede na negativno kontrolo. Vrednosti predstavljajo povprečni volumen sferoidov ± SD (n = 4). * p < 0,05.

Sferoide smo posneli z motoriziranim invertnim mikroskopom Olympus IX in Cell™ programsko opremo (Slika 33) 2. dan po implantaciji sferoidov v Matrigel™. Na ta način smo vizualizirali proces tumorske rasti, saj sferoidi zelo dobro posnemajo rast in invazijo avaskularnih stopenj rasti tumorjev *in vivo*. V prisotnosti DMSO kot negativne kontrole so celice na površini sferoida tvorile mnogoštevilne izrastke - pseudopodije, s katerimi tumorske celice invadirajo v model ZCM. Dodatek inhibitorjev k sferoidom je zmanjšal število in velikost izrastkov na površini sferoidov in s tem tudi tumorsko invazijo celic v 3D *in vitro* modelu celične invazije. Medtem ko je dodatek nitroksolina zmanjšal velikost izrastkov glede na negativno kontrolo, sta dodatka CA-074 in CA-074Me povzročila njihovo skorajšnje izginotje na površini sferoidov.



Slika 33. Učinek inhibitorjev (nitroksolina, CA-074 in CA-074Me) na tumorsko invazijo v 3D *in vitro* modelu tumorske invazije, ki temelji na implantiranju sferoidov v ZCM.

5 RAZPRAVA

Katepsin B je ena od najbolj raziskanih lizosomskih cisteinskih proteaz. Dobro raziskana je predvsem njegova vloga pri nastanku in napredovanju raka. Katepsin B z razgradnjo komponent ZCM in aktivacijo drugih proteaz (MMP, plazmina, uPA) bistveno vpliva na invazijo, angiogenezo ter metastaziranje tumorskih celic (25, 26). Zadnje od naštetega pa je ključno za smrt bolnikov z rakom, saj je dokazano, da rakavi bolniki v 90 % umrejo zaradi razvitja metastaz (52). Številne raziskave so pokazale spremenjeno izražanje, aktivnost in lokalizacijo katepsina B v transformiranih in tumorskih celicah. Za škodljive procese pri napredovanju raka je odgovorna endopeptidazna aktivnost katepsina B, katera pride do izraza po odmiku zaporne zanke od reže z aktivnim mestom (25, 53, 68). Zaradi številnih raziskav, ki potrjujejo katepsin B kot potencialno tarčo za zdravljenje rakavih bolezni, se raziskave usmerjajo k iskanju nizkomolekularnih selektivnih inhibitorjev katepsina B, ki bi inhibirali predvsem patološko endopeptidazno aktivnost katepsina B. Novo odkrite inhibitorje katepsina B je potrebno testirati na *in vitro* celičnih modelih, da dokažemo njihova učinkovitost in netoksičnost pred napredovanjem v nadaljnje klinične študije. Eden od novejših reverzibilnih selektivnih inhibitorjev katepsina B je nitroksolin, za katerega so že dokazali učinkovitost na celični liniji raka dojke MCF-10A neo T (68, 88).

V okviru magistrske naloge smo želeli postaviti modele razgradnje ZCM ter 2D in 3D *in vitro* modele tumorske invazije z glioblastomsko celično linijo U-87, na katerih bi lahko testirali inhibitorje katepsina B. Glioblastom nastane iz astrocitov in je najpogostejši ter najinvazivnejši rak centralnega živčnega sistema, pri katerem so že dokazali pomembno vlogo katepsina B pri tumorski invaziji, rasti in angiogenezi (56, 57, 61, 89).

Ker smo s pomočjo celične linije U-87 želeli postaviti sistem za testiranje inhibitorjev katepsina B, smo v prvem delu magistrske naloge dokazali prisotnost aktivnega encima v celicah U-87. Z metodo direktne ELISA, v kateri smo uporabili specifična protitelesa proti katepsinu B in njegovi pro-obliki, smo dokazali, da glioblastomska celična linija vsebuje aktivni katepsin B, izloča pa ga tudi v gojišče. Nato smo s pretočno citometrijo in z uporabo specifičnih protiteles proti katepsinu B, potrdili prisotnost katepsina B tudi na površini celic U-87. Z merjenjem razgradnje za katepsin B specifičnega endopeptidaznega substrata in uporabo inhibitorjev katepsina B (nitroksolina in CA-074) smo ugotovili, da celična linija vsebuje proteolitično aktiven katepsin B, ki je prisoten tudi v gojišču. Ti

rezultati so v skladu s predhodno objavljenimi raziskavami, ki so dokazale prisotnost aktivnega katepsina B v tumorskih celicah, na njihovi površini in izločenega v njihovi okolici (56, 90, 91). Nitroksolin in CA-074 sta inhibirala patološko endopeptidazno aktivnost znotrajceličnega in zunajceličnega katepsina B (Slika 13). CA-074, kot že dolgo poznan in uveljavljen, ireverzibilni, specifični inhibitor katepsina B, je v koncentraciji 100 μM po pričakovanjih inhibiral aktivnost katepsina B za $99,7 \pm 0,1 \%$ v celičnih lizatih in za $87,6 \pm 16,0 \%$ v kondicioniranem gojišču celic U-87, kar je v skladu z literaturo (70, 72). Ti rezultati dokazujejo, da je zaznana aktivnost v celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču zagotovo na račun katepsina B. Inhibitorno delovanje nitroksolina napram endopeptidazni aktivnosti katepsina B smo z našimi izsledki potrdili tudi na celični liniji U-87 (68). Nitroksolin je v koncentraciji 100 μM inhibiral endopeptidazno aktivnost katepsina B v celičnih lizatih za $39,4 \pm 0,9 \%$, aktivnost katepsina B, izločenega v gojišče celic, pa za $39,9 \pm 9,0 \%$.

S fluorescenčno mikroskopijo smo spremljali razgradnjo kolagena tipa IV (Slika 18), poglobitnega proteina ZCM. Predhodne raziskave so namreč pokazale, da katepsin B cepi kolagen tipa IV. V skladu s pričakovanji in literaturo smo pokazali tako znotraj- kot tudi zunajcelično razgradnjo kolagena IV v celicah U-87 (57, 68, 92). Razgradni produkti kolagena IV so se nahajali v veziklih znotraj celice (v lizosomih in endosomih), na površini in v okolici celic U-87. Zaradi prisotnosti razgradnje proteinov ZCM tako zunaj kot znotraj celic U-87 smo postavili kvantitativna celična *in vitro* modela razgradnje kolagena tipa IV – zunaj- in znotrajceličnega.

Znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena tipa IV smo testirali s pomočjo pretočne citometrije, medtem ko smo zunajcelično razgradnjo kolagena spremljali s fluorescenčno spektrofotometrijo. Pri obeh modelih smo opazovali porast fluorescence v oziroma zunaj celic zaradi razgradnje s fluoresceinom označenega kolagena tipa IV. Znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena tipa IV je inhibiral le metilni ester CA-074 (CA-074Me), ki prehaja membrane celic, kjer se po cepitvi z esterazami sprosti CA-074. Kljub statistično značilni inhibiciji je slednja znašala le 10,3 %, kar pomeni, da je vloga katepsin B pri znotrajcelični razgradnji proteinov ZCM v celicah U-87 manjša kot smo pričakovali glede na ugotovitve drugih raziskav (92, 93). Slednje nakazuje na potencialno vlogo ostalih lizosomskih proteaz pri znotrajcelični razgradnji proteinov ZCM. CA-074 po pričakovanjih ni inhibiral znotrajcelične razgradnje kolagena, saj zaradi svoje peptidne strukture, ne

prehaja celičnih membran. Znotrajcelično razgradnjo kolagena ni inhibiral niti nitroksolin. Slednje je v nasprotju s predhodno objavljeno raziskavo, kjer so pokazali, da nitroksolin inhibira znotrajcelično razgradnjo proteinov ZCM v celicah MCF-10A neoT (68). To lahko obrazložimo s primerjavo celokupnih koncentracij katepsina B v celičnih linijah U-87 in MCF-10A neo T (Slika 12). V celičnih lizatih in kondicioniranem gojišču celic U-87 smo določili značilno manjšo celokupno koncentracijo katepsina B kot v celični liniji MCF-10A neoT, kar pomeni, da so celice MCF-10A neoT zaradi večje vsebnosti katepsina B bolj občutljive na inhibitorje katepsina B. Zunajcelično razgradnjo kolagena so inhibirali vsi preizkušeni inhibitorji. Nitroksolin je v koncentraciji 5 μM zmanjšal zunajcelično razgradnjo proteinov ZCM za $30,6 \pm 11,8 \%$, kar je več od CA-074 ($18,0 \pm 7,8 \%$ inhibicija). Rezultati potrjujejo pomembno vlogo katepsina B pri zunajcelični razgradnji ZCM, v katero je vpleten direktno ali indirektno preko proteolitične kaskade na površini tumorskih celic (25, 59, 92).

2D *in vitro* model tumorske invazije smo postavili z aparaturo xCELLigence, ki kvantitativno spremlja invazijo tumorskih celic. Za postavitev 2D celičnega modela tumorske invazije smo najprej optimizirali število celic (3×10^4 celic/vdolbinico) in čas inkubacije do tretiranja z inhibitorji (14 h) ter določili citotoksičnost inhibitorjev katepsina B, ki smo jih preizkusili v nadaljevanju. Na podlagi testiranja inhibitorjev citotoksičnosti inhibitorjev smo izbrali koncentracijo 5 μM kot delovno koncentracijo inhibitorjev za teste invazije. 5 μM koncentracija inhibitorjev namreč ni bila citotoksična za celice U-87. Utišanje gena za katepsin B v celicah U-87 je služila kot validacijska metoda primernosti celične linije U-87 za preizkušanje inhibitorjev katepsina B.

Z utišanjem gena za katepsin B z metodo interferenčne RNA smo v celicah U-87 zmanjšali izražanje ter aktivnost katepsina B, kar smo dokazali s testom ELISA in encimsko kinetiko. Po 72 h je siRNA, specifična za katepsina B, zmanjšala izražanje katepsina B za $63,2 \pm 8,2 \%$ pri koncentraciji 33 nM in $65,1 \pm 1,3 \%$ pri koncentraciji 50 nM. Po istem času je siRNA povzročila zmanjšano endopeptidazno aktivnost katepsina B za $64,4 \pm 14,8 \%$ (33 nM) in za $67,4 \pm 14,4 \%$ (50 nM). Pri testu invazije utišanih celic na 2D *in vitro* modelu tumorske invazije je bila invazija utišanih celic za $59,0 \pm 21,8 \%$ manjša od invazije celic, tretiranih s kontrolno siRNA, kar nakazuje na pomembno vlogo katepsina B pri tumorski invaziji celic U-87. Isto povezavo, med aktivnostjo katepsina B in invazijo

tumorskih celic, so ugotovili že z različnimi raziskavami, tudi na glioblastomski celični liniji (47, 54, 56, 63, 90).

Uporaba dokazanih inhibitorjev katepsina B (nitroksolina in CA-074) v koncentraciji 5 μM je ravno tako značilno zmanjšala invazijo celic U-87 v 2D modelu tumorske invazije za $69,6 \pm 3,3 \%$ in $61,7 \pm 9,5 \%$. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklenemo, da katepsin B bistveno pripomore k invaziji tumorskih celic U-87, ko le-te invadirajo skozi ZCM kot individualne celice. Postavljen 2D *in vitro* model tumorske invazije je tako primeren za testiranje novih potencialnih učinkovin kot inhibitorjev katepsina B.

3D *in vitro* model tumorske invazije je temeljil na implantaciji sferoidov v model ZCM (MatrigelTM). Sferoidi oponašajo avaskularne faze rasti tumorjev *in vivo*. V 3D modelu rastejo tumorske celice v skupkih, kjer nanje vplivajo medcelične interakcije ter interakcije z ZCM. Pri postavitvi 3D celičnega modela tumorske invazije smo sprva določili optimalno koncentracijo celic za pripravo sferoidov (150 celic/20 μL) in čas inkubacije (5 dni), ki sta bila potrebna za pripravo sferoidov ponovljivih dimenzij in sferične oblike. Tudi pri 3D celičnem modelu tumorske invazije smo potrdili vlogo katepsina B pri invaziji celic U-87, saj je CA-074Me v koncentraciji 10 μM značilno zmanjšal invazijo za $54,8 \pm 24,6 \%$ 2. dan in za $60,3 \pm 19,3 \%$ 3. dan po implantaciji sferoidov v model ZCM (MatrigelTM). Naši rezultati so v skladu z izsledki predhodno objavljene raziskave, kjer so pokazali, da CA-074Me zmanjša invazijo glioblastomskih celic v 3D *in vitro* modelu tumorske invazije (90). Ko smo na istem modelu preizkusili nitroksolin, slednji ni inhibiral rasti sferoidov, kar nakazuje, da je nitroksolin šibkejši inhibitor katepsina B v 3D celičnem modelu tumorske invazije v primerjavi s CA-074Me. Dobljene rezultate pri spremljanju velikosti sferoidov smo nadgradili s snemanjem sferoidov z motoriziranim invertnim mikroskopom in tako vizualizirali proces tumorske invazije (Slika 33). Iz fotografij sferoidov je razvidno, da vsi testirani inhibitorji katepsina B (nitroksolin, CA-074 in CA-074Me) zmanjšajo tumorsko invazijo celic na robu sferoidov v model ZCM, saj so izrastki iz sferoidov manjši in redkejši kot pri negativni kontroli. Inhibicija je izrazitejša pri CA-074 in njegovemu metilnemu estru, kjer jasno vidimo oster rob sferoida, ki ne invadira v okolico. Na podlagi rezultatov lahko potrdimo, da je postavljen 3D *in vitro* model tumorske invazije primeren za preizkušanje novih inhibitorjev katepsina B.

Ker inhibicija invazije utišanih celic U-87 v 2D *in vitro* modelu tumorske invazije ni bila popolna in ker inhibicija zunaj- in znotrajcelicne razgradnje kolagena ob prisotnosti

inhibitorjev katepsina B v postavljenih celičnih modelih ni bila velika, lahko sklepamo na soudeležnost drugih proteaz v procesih tumorske invazije celic U-87 (47, 54, 89, 92). Zaradi dokazov na mišjih modelih o sinergističnem učinku katepsina B in X na tumorsko invazijo in metastaziranje (47, 54), smo na celični liniji U-87 preverili še aktivnost katepsina X. S spremljanjem encimske aktivnosti in uporabo specifičnega substrata za katepsina X smo ugotovili, da celična linija U-87 poleg katepsina B vsebuje še aktivni katepsin X. Poleg tega smo s spremljanjem encimske aktivnosti preverili še vpliv inhibitorjev katepsina B (nitroksolina in CA-074) na aktivnost katepsina X. Medtem ko CA-074 po pričakovanjih ni inhibiral aktivnosti katepsina X, saj je visoko specifičen za katepsin B, so rezultati pokazali, da nitroksolin v koncentraciji 100 μM zmanjša aktivnost katepsina X za $30,2 \pm 7,6 \%$. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da nitroksolin inhibira tumorsko invazijo preko sočasnega delovanja na različne tarče. Poleg tega so predhodne raziskave dokazale, da nitroksolin inhibira poleg katepsina B tudi encima MetAP2 (tip 2 metionin-aminopeptidaza) in sirtuin-1, ki sodelujeta pri angiogenezi tumorjev (68, 74). Za potrditev inhibicije aktivnosti katepsina X z nitroksolinom bi bilo potrebno opraviti dodatne raziskave s spremljanjem encimske aktivnosti. Sočasno delovanje na več tarč je lahko tudi zaželen pojav, saj so predhodne študije pokazale medsebojno sinergistično in kompenzatorno delovanje katepsina B in X. Sočasno izbitje genov za oba katepsina v mišjih modelih je namreč povzročilo značilno zakasnitev razvoja tumorjev ter zmanjšanje števila in velikosti metastaz. Prav tako pa izguba obeh alelov katepsina B ni povzročilo nadaljnjega zmanjšanja pljučnih metastaz pri miškah (47, 54). Da bi potrdili, da ob uporabi nitroksolina pride do inhibicije invazije na račun sinergističnega delovanja na katepsin B in X, bi bilo potrebno preučiti še vpliv katepsina X na tumorsko invazijo z utišanjem gena za katepsin X in uporabo specifičnih inhibitorjev katepsina X v *in vitro* modelih razgradnje proteinov ZCM in tumorske invazije.

Iz rezultatov, dobljenih v okviru magistrske naloge, kjer je razvidna inhibicija tumorske invazije po utišanju celic s siRNA, specifično za katepsin B, in inhibicija razgradnje kolagena ter tumorske invazije ob prisotnosti inhibitorjev katepsina B, lahko zaključimo, da je celična linija U-87 primerna za postavitev *in vitro* modelov tumorske invazije, na katerih lahko preizkušamo inhibitorje katepsina B ter, da so postavljeni *in vitro* modeli razgradnje ZCM in tumorske invazije primerni za testiranje novih protitumorskih učinkovin kot inhibitorjev katepsina B.

6 SKLEP

V magistrski nalogi smo uspešno postavili modele razgradnje proteinov ZCM ter 2D in 3D *in vitro* modele tumorske invazije s celično linijo U-87, ki so primerni za testiranje novih inhibitorjev katepsina B.

V začetku smo s testom ELISA, spremljanjem encimske aktivnosti in pretočno citometrijo potrdili, da celična linija U-87 vsebuje aktivni katepsin B, ki ga izloča tudi v zunajcelično okolje. Poleg tega je katepsin B prisoten tudi na površini celic U-87. Ker celična linija U-87 vsebuje aktivni katepsin B, je primerna za postavitev *in vitro* modelov tumorske invazije za testiranje novih inhibitorjev katepsina B.

Po postavitvi *in vitro* modelov tumorske invazije s celično linijo U-87 smo njihovo primernost potrdili z metodo interferenčne RNA in z uporabo že dokazanih inhibitorjev katepsina B (nitroksolina in CA-074/CA-074Me). Z utišanjem celic s siRNA, ki je specifična za utišanje katepsina B, smo ugotovili, da katepsin B bistveno pripomore k tumorski invaziji celic U-87 na postavljenem 2D celičnem modelu tumorske invazije. Inhibitorji katepsina B so statistično značilno inhibirali zunaj- in znotrajcelično razgradnjo kolagena tipa IV ter tumorsko invazijo na 2D in 3D *in vitro* modelu tumorske invazije. Ti rezultati dokazujejo, da so postavljeni celični modeli primerni za testiranje novih inhibitorjev katepsina B.

Nitroksolin kot novi reverzibilni selektivni inhibitor katepsina B inhibira 2D *in vitro* tumorsko invazijo in zunajcelično razgradnjo kolagena celične linije U-87.

Celična linija U-87 vsebuje aktivni katepsin X, ki ga inhibira nitroksolin. To nakazuje, da lahko nitroksolin preko različnih tarč inhibira invazijo tumorskih celic.

7 LITERATURA

1. Turk B: Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(9):785-99.
2. Drag M, Salvesen GS: Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(9):690-701.
3. Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C: Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(7):544-58.
4. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP: Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:63-88.
5. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: D343-350.
6. Lah TT, Durán Alonso MB, Van Noorden CJ: Antiprotease therapy in cancer: hot or not? *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6(3):257-79.
7. Turk V, Turk B, Turk D: Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* 2001; 20(17):4629-33.
8. Reinheckel T, Peters C, Krüger A, Turk B, Vasiljeva O: Differential Impact of Cysteine Cathepsins on Genetic Mouse Models of De novo Carcinogenesis: Cathepsin B as Emerging Therapeutic Target. *Front Pharmacol* 2012; 3:133.
9. Kos J, Lah TT: Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep* 1998; 5(6):1349-61.
10. Berdowska I: Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta* 2004; 342(1-2):41-69.
11. Vasiljeva O, Turk B: Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie* 2008; 90(2):380-6
12. Bühling F, Kouadio M, Chwieralski CE, Kern U, Hohlfeld JM, Klemm N, Friedrichs N, Roth W, Deussing JM, Peters C, Reinheckel T: Gene targeting of the cysteine peptidase cathepsin H impairs lung surfactant in mice. *PLoS One* 2011;6(10):e26247
13. Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B: Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1824(1):22-33.
14. Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk V, Turk B: Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des* 2007;13(4):387-403.

15. Conus S, Simon HU: Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss Med Wkly* 2010; 140:w13042.
16. Méndez-Lucio O, Romo-Mancillas A, Medina-Franco JL, Castillo R: Computational study on the inhibition mechanism of cruzain by nitrile-containing molecules. *J Mol Graph Model* 2012; 35:28-35.
17. Turk D, Guncar G: Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; 59(Pt 2):203-13.
18. Joyce JA, Hanahan D: Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle* 2004; 3(12):1516-619.
19. Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N: Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Int J Biol Markers* 2000; 15(1):84-9.
20. Vizin T, Christensen IJ, Nielsen HJ, Kos J: Cathepsin X in serum from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Radiol Oncol* 2012; 46(3):207-12.
21. Fong D, Chan MM, Hsieh WT, Menninger JC, Ward DC: Confirmation of the human cathepsin B gene (CTSB) assignment to chromosome 8. *Hum Genet* 1992; 89(1):10-2.
22. Berquin IM, Cao L, Fong D, Sloane BF: Identification of two new exons and multiple transcription start points in the 5'-untranslated region of the human cathepsin-B-encoding gene. *Gene* 1995; 159(2):143-9.
23. Mort JS, Buttle DJ: Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(5):715-20.
24. Mach L, Stüwe K, Hagen A, Ballaun C, Glössl J: Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem J* 1992; 282 (Pt 2):577-82.
25. Roshy S, Sloane BF, Moin K: Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22(2-3):271-86.
26. Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF: Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 2000; 291(2):113-35.
27. Rowan AD, Mason P, Mach L, Mort JS: Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form *in vitro*. *J Biol Chem* 1992; 267(22):15993-9.
28. Pungercar JR, Caglic D, Sajid M, Dolinar M, Vasiljeva O, Pozgan U, Turk D, Bogyo M, Turk V, Turk B: Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity. *FEBS J* 2009; 276(3):660-8.

29. Kuhelj R, Dolinar M, Pungercar J, Turk V: The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies *Eur J Biochem* 1995; 229(2):533-9.
30. Watanabe D, Yamamoto A, Tomoo K, Matsumoto K, Murata M, Kitamura K, Ishida T: Quantitative evaluation of each catalytic subsite of cathepsin B for inhibitory activity based on inhibitory activity-binding mode relationship of epoxysuccinyl inhibitors by X-ray crystal structure analyses of complexes. *J Mol Biol* 2006; 362(5):979-93.
31. Musil D, Zucic D, Turk D, Engh RA, Mayr I, Huber R, Popovic T, Turk V, Towatari T, Katunuma N, Bode W: The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J* 1991; 10(9):2321-30.
32. Nägler DK, Tam W, Storer AC, Krupa JC, Mort JS, Ménard R: Interdependency of sequence and positional specificities for cysteine proteases of the papain family. *Biochemistry* 1999; 38(15):4868-74.
33. Krupa JC, Hasnain S, Nägler DK, Ménard R, Mort JS: S2' substrate specificity and the role of His110 and His111 in the exopeptidase activity of human cathepsin B. *Biochem J* 2002; 361(Pt 3):613-9.
34. Nägler DK, Storer AC, Portaro FC, Carmona E, Juliano L, Ménard R: Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry* 1997; 36(41):12608-15.
35. Mirković B: Regulacija endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti kathepsina B. Doktorska dizertacija. Ljubljana, 2011; 25.
36. Müntener K, Zwicky R, Csucs G, Baici A: The alternative use of exons 2 and 3 in cathepsin B mRNA controls enzyme trafficking and triggers nuclear fragmentation in human cells. *Histochem Cell Biol* 2003; 119(2):93-101.
37. Mehtani S, Gong Q, Panella J, Subbiah S, Peffley DM, Frankfater A: In vivo expression of an alternatively spliced human tumor message that encodes a truncated form of cathepsin B. Subcellular distribution of the truncated enzyme in COS cells. *J Biol Chem* 1998; 273(21):13236-44.
38. Droga-Mazovec G, Bojic L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, Salvesen GS, Stoka V, Turk V, Turk B: Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem* 2008; 283(27):19140-50.

39. Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario A, Carmona E, Juliano L, Nader HB, Tersariol IL: Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem* 2001; 276(2):944-51.
40. Jordans S, Jenko-Kokalj S, Kühl NM, Tedelind S, Sendt W, Brömme D, Turk D, Brix K: Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions. *BMC Biochem* 2009; 10:23.
41. Santamaría I, Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, López-Otín C: Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* 1998; 273(27):16816-23.
42. Klemencic I, Carmona AK, Cezari MH, Juliano MA, Juliano L, Guncar G, Turk D, Krizaj I, Turk V, Turk B: Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *Eur J Biochem* 2000; 267(17):5404-12.
43. Sivaraman J, Nägler DK, Zhang R, Ménard R, Cygler M: Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol* 2000; 295(4):939-51.
44. Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N: The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adh Migr* 2009; 3(2):164-6.
45. Obermajer N, Premzl A, Zavasnik Bergant T, Turk B, Kos J: Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Exp Cell Res* 2006; 312(13):2515-27.
46. Obermajer N, Doljak B, Kos J: Cysteine cathepsins: regulators of antitumour immune response. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6(12):1295-309.
47. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(6):2497-502.
48. Büth H, Luigi Buttigieg P, Ostafe R, Rehders M, Dannenmann SR, Schaschke N, Stark HJ, Boukamp P, Brix K: Cathepsin B is essential for regeneration of scratch-wounded normal human epidermal keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 2007; 86(11-12):747-61.

49. Hook VY, Kindy M, Reinheckel T, Peters C, Hook G: Genetic cathepsin B deficiency reduces beta-amyloid in transgenic mice expressing human wild-type amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386(2):284-8.
50. Berquin IM, Sloane BF: Cathepsin B expression in human tumors. *Adv Exp Med Biol* 1996; 389:281-94.
51. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49(6):1374-403.
52. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-74.
53. Mohamed MM, Sloane BF: Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(10):764-75.
54. Vasiljeva O, Papazoglou A, Krüger A, Brodoefel H, Korovin M, Deussing J, Augustin N, Nielsen BS, Almholt K, Bogyo M, Peters C, Reinheckel T: Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* 2006; 66(10):5242-50.
55. Lah TT, Cercek M, Blejec A, Kos J, Gorodetsky E, Somers R, Daskal I: Cathepsin B, a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: comparison with cathepsin D, cathepsin L, and other clinical indicators. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2):578-84.
56. Demchik LL, Sameni M, Nelson K, Mikkelsen T, Sloane BF: Cathepsin B and glioma invasion. *Int J Dev Neurosci* 1999; 17(5-6):483-94.
57. Sameni M, Dosesescu J, Sloane BF: Imaging proteolysis by living human glioma cells. *Biol Chem* 2001; 382(5):785-8.
58. Koblinski JE, Dosesescu J, Sameni M, Moin K, Clark K, Sloane BF: Interaction of human breast fibroblasts with collagen I increases secretion of procathepsin B. *J Biol Chem* 2002; 277(35):32220-7.
59. Cavallo-Medved D, Rudy D, Blum G, Bogyo M, Caglic D, Sloane BF: Live-cell imaging demonstrates extracellular matrix degradation in association with active cathepsin B in caveolae of endothelial cells during tube formation. *Exp Cell Res* 2009; 315(7):1234-46.

60. Premzl A, Turk V, Kos J: Intracellular proteolytic activity of cathepsin B is associated with capillary-like tube formation by endothelial cells in vitro. *J Cell Biochem* 2006; 97(6):1230-40.
61. Malla RR, Gopinath S, Gondi CS, Alapati K, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS: Cathepsin B and uPAR knockdown inhibits tumor-induced angiogenesis by modulating VEGF expression in glioma. *Cancer Gene Ther* 2011; 18(6):419-34.
62. Im E, Venkatakrisnan A, Kazlauskas A: Cathepsin B Regulates the Intrinsic Angiogenic Threshold of Endothelial Cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 3488-500.
63. Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS: Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 2004; 23(27):4681-9.
64. Pavlova A, Krupa JC, Mort JS, Abrahamson M, Björk I: Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration By release of loop anchoring through mutation of his110. *FEBS Lett* 2000; 487(2):156-60.
65. Dubin G: Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(6):653-69.
66. Ochieng J, Chaudhuri G: Cystatin superfamily. *J Health Care Poor Underserved* 2010; 21(1 Suppl):51-70.
67. Strojjan P, Budihna M, Smid L, Svetic B, Vrhovec I, Kos J, Skrk J: Prognostic significance of cysteine proteinases cathepsins B and L and their endogenous inhibitors stefins A and B in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3):1052-62.
68. Mirković B, Renko M, Turk S, Sosič I, Jevnikar Z, Obermajer N, Turk D, Gobec S, Kos J: Novel mechanism of cathepsin B inhibition by antibiotic nitroxoline and related compounds. *ChemMedChem* 2011; 6(8):1351-6.
69. Perdih A, Kotnik M, Oblak M, Šolmajer T: Uporaba orodij računalniške kemije pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic. *Farmaceutski vestnik* 2010; 4: 195–201.
70. Frlan R, Gobec S: Inhibitors of cathepsin B. *Curr Med Chem* 2006;13(19):2309-27.
71. Murata M, Miyashita S, Yokoo C, Tamai M, Hanada K, Hatayama K, Towatari T, Nikawa T, Katunuma N: Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro. *FEBS Lett* 1991; 280(2):307-10.

72. Bogyo M, Verhelst S, Bellingard-Dubouchaud V, Toba S, Greenbaum D: Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs. *Chem Biol* 2000; 7(1):27-38.
73. Zeng GZ, Pan XL, Tan NH, Xiong J, Zhang YM: Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K. *Eur J Med Chem* 2006; 41(11):1247-52.
74. Shim JS, Matsui Y, Bhat S, Nacev BA, Xu J, Bhang HE, Dhara S, Han KC, Chong CR, Pomper MG, So A, Liu JO: Effect of nitroxoline on angiogenesis and growth of human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(24):1855-73.
75. <http://www.lookchem.com/Nitroxoline>. povzeto aprila 2013.
76. http://www.roche-applied-science.com/publications/print_mat/RTCA_DP_Instrument_Operators_Manual_Ver2.0.pdf. povzeto aprila 2013.
77. Limame R, Wouters A, Pauwels B, Fransen E, Peeters M, Lardon F, De Wever O, Pauwels P: Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One* 2012; 7(10):e46536.
78. http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/doc/manuals/live/web_enabled/356237_Guidelines.pdf. povzeto aprila 2013.
79. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK: Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 2003; 83(2):173-80.
80. Sgouros G, Yang WH, Enmon R: Spheroids of prostate tumor cell lines. *Methods Mol Med* 2003; 81:79-88.
81. <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx>. povzeto aprila 2013.
82. http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9005.pdf. povzeto aprila 2013
83. Vozelj M: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000: 112-113.
84. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA: *Kuby Immunology*, W. H. Freeman and Company, New York, 2000; 162.
85. http://www.scbt.com/gene_silencers.html. povzeto aprila 2013.
86. Kos J, Štrukelj B : *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 616-617.

87. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscherr A, Ploegh H, Matsudaira P: Molecular cell biology, W. H. Freeman and Company, New York, 2008; 347-351, 380-386, 394-395.
88. Gondi CS, Rao JS: Cathepsin B as a cancer target. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17(3):281-91.
89. Gole B, Huszthy PC, Popović M, Jeruc J, Ardebili YS, Bjerkvig R, Lah TT: The regulation of cysteine cathepsins and cystatins in human gliomas. *Int J Cancer* 2012; 131(8):1779-89.
90. Gole B, Durán Alonso MB, Dolenc V, Lah T: Post-translational regulation of cathepsin B, but not of other cysteine cathepsins, contributes to increased glioblastoma cell invasiveness in vitro. *Pathol Oncol Res* 2009; 15(4):711-23.
91. Levicar N, Strojnik T, Kos J, Dewey RA, Pilkington GJ, Lah TT: Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion. *J Neurooncol* 2002; 58(1):21-32.
92. Sameni M, Moin K, Sloane BF: Imaging proteolysis by living human breast cancer cells. *Neoplasia* 2000; 2(6):496-504.
93. Premzl A, Zavasnik-Bergant V, Turk V, Kos J: Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp Cell Res* 2003; 283(2):206-14.

PRILOGA

Preglednica IV. Fotografije sferoidov 1.-7. dan po nasaditvi sferoidov pri 10-kratni povečavi. Uporabili smo koncentracije celic: 150, 250, 500, 750 in 1000 celic/20 μ L.

Št. Celic v 20 μ L/ Dan	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
150							
250							
500							
750							
1000							