

Nika Pahor, Magistrsko delo

Vpliv zaviralcev cisteinskih peptidaz na aktivacijo signalne poti NF-κB v celicah PC-3

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA PAHOR

**VPLIV ZAVIRALCEV CISTEINSKIH PEPTIDAZ NA SIGNALNO POT NF-κB V
CELICAH PC-3**
**EFFECT OF CYSTEINE PEPTIDASE INHIBITORS ON NF-κB SIGNALING
PATHWAY IN PC-3 CELLS**

MAGISTRSKO DELO

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Nika Pahor, Magistrsko delo

Vpliv zaviralcev cisteinskih peptidov na aktivacijo signalne poti NF- κ B v celicah PC-3

Magistrsko naložko sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za Farmacijo, pod mentorstvom doc. dr. Urše Pečar Fonović, univ. dipl. biol.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici doc. dr. Urši Pečar Fonović za strokovno znanje, ki ga je z veseljem delila z mano, in za vse spodbudne besede, neizmerno potrpežljivost ter dragocene nasvete tako pri raziskovalnih izzivih kot pri ustvarjanju pisnega dela.

Najlepša hvala tudi ostalim sodelavcem Katedre za farmacevtsko biologijo, ki so mi večkrat priskočili na pomoč v laboratoriju in me usmerjali z odgovori na moja številna vprašanja.

Nazadnje pa se iz srca zahvaljujem svoji družini in prijateljem za moralno vzpodbudo in brezmejno podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Urše Pečar Fonović, univ. dipl. biol.

Nika Pahor

Kazalo vsebine

Kazalo vsebine.....	i
Kazalo slik	iii
Kazalo preglednic	iii
Kazalo enačb.....	iii
POVZETEK	iv
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV.....	vi
1 UVOD.....	1
1.1 CISTEINSKE PEPTIDAZE	1
1.1.1 Katepsin B	3
1.1.2 Katepsin L	4
1.1.3 Katepsin S.....	4
1.2 ZAVIRALCI CISTEINSKIH PEPTIDOV	5
1.2.1 Endogeni zaviralci	5
1.2.2 Nizkomolekularni zaviralci	8
1.3 SIGNALNA POT NF-κB	9
1.3.1 Struktura in biološka vloga proteinov NF-κB	9
1.3.2 Delovanje signalne poti NF-κB	10
1.3.3 Kontrola signalne poti NF-κB	12
1.3.4 Vloga NF-κB pri raku prostate	12
2 NAMEN DELA	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Celična linija PC-3	15
3.1.2 Gojišča	15

3.1.3	Reagenti in kemikalije	15
3.1.4	Pufrski sistemi	17
3.1.5	Poliakrilamidni geli	20
3.1.6	Proteini	21
3.1.7	Laboratorijska oprema in aparature	22
3.2	METODE.....	24
3.2.1	Postopki za delo s celično linijo PC-3	24
3.2.2	Merjenje celokupne koncentracije proteinov v celičnih lizatih.....	27
3.2.3	Encimska kinetika	28
3.2.4	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE)	31
3.2.5	Imunokemijska detekcija NF-κB ter IκB-α s prenosom western	32
3.2.6	Konfokalna mikroskopija	35
3.2.7	Statistična obdelava podatkov	36
4	REZULTATI	37
4.1	Določanje koncentracije aktivnega cistatina C in kokošjega cistatina	37
4.2	Določanje aktivnosti katepsina B v celičnih lizatih.....	39
4.3	Določanje aktivnosti katepsina L v celičnih lizatih	40
4.4	Določanje aktivnosti katepsina S v celičnih lizatih	41
4.5	Detekcija IκB-α in NF-κB v celičnih lizatih	42
4.5.1	Detekcija fosforilirane oblike IκB-α in celokupne količine IκB-α.....	42
4.5.2	Detekcija NF-κB v celičnih lizatih	44
4.6	Konfokalna mikroskopija.....	47
5	RAZPRAVA.....	48
6	SKLEPI.....	55
7	VIRI.....	56

Kazalo slik

Slika 1: Shematski prikaz vezave proteinskega substrata v aktivno mesto katepsina.....	2
Slika 2: Strukturna formula sinteznega zaviralca Gü 2149	9
Slika 3: Shematski prikaz klasične in alternativne poti aktivacije signalne poti NF-κB....	11
Slika 4: Shematski prikaz prenosa western	32
Slika 5: Graf aktivnosti papaina ob dodatku naraščajočih koncentracij zaviralca E-64	37
Slika 6: Graf aktivnosti papaina ob dodatku naraščajočih koncentracij cistatina C.....	38
Slika 7: Graf aktivnosti papaina ob dodatku naraščajočih koncentracij kokošjega cistatina	38
Slika 8: Graf aktivnosti katepsina B pri času t_0 in po 3 urah.....	39
Slika 9: Graf aktivnosti katepsina L pri času t_0 in po 3 urah.....	40
Slika 10: Graf aktivnosti katepsina S pri času t_0 in po 3 urah	41
Slika 11: Detekcija pIκB-α in IκB-α s specifičnimi protitelesi	42
Slika 12: Razmerje med fosforilirano obliko IκB-α in celokupnim IκB-α v celičnih lizatih	43
Slika 13: Detekcija citosolnega NF-κB s specifičnimi protitelesi.....	44
Slika 14: Detekcija NF-κB v citosolni frakciji celičnih lizatov.....	45
Slika 15: Detekcija jedrnega NF-κB s specifičnimi protitelesi	46
Slika 16: Detekcija NF-κB v jedrni frakciji celičnih lizatov.....	46
Slika 17: Celice PC-3 z označenim NF-κB in jedrom.....	47

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Uporabljeni reagenti in kemikalije ter njihov izvor	15
Preglednica 2: Uporabljeni proteini in njihov izvor	21
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema in aparature ter njihovi proizvajalci	22
Preglednica 4: Postavitev reagentov na črni mikrotitrski plošči pri določevanju ustreznih koncentracij papaina in substrata Z-FR-AMC.....	29
Preglednica 5: Uporabljena blokirna sredstva in protitelesa pri detekciji NF-κB, β-aktina in PCNA	35

Kazalo enačb

Enačba 1	25
----------------	----

POVZETEK

Transkripcijski faktor NF-κB in cisteinske peptidaze predstavljajo potencialne terapevtske tarče pri zdravljenju raka. Objavljeno je veliko število dokazov o ugodnem vplivu zaviralcev cisteinskih peptidaz na zmanjšanje rasti in invazije tumorskih celičnih linij. Prav tako številne študije potrjujejo, da zaviranje signalne poti NF-κB spodbudi apoptozo tumorskih celic, zelo malo pa je raziskav, ki bi preučevale morebitno povezanost med cisteinskimi katepsini in NF-κB.

Poglavitni namen magistrske naloge je bil preučiti vpliv endogenih zaviralcev cisteinskih peptidaz cistatina C in kokošjega cistatina ter sinteznega zaviralca Gü 2149 na signalno pot NF-κB v celicah adenokarcinoma prostate (PC-3).

V sklopu laboratorijskega dela smo v celicah PC-3 s TNF-α inducirali signalno pot NF-κB v prisotnosti zaviralcev cisteinskih peptidaz in pripravili tri različne sete celičnih lizatov. V prvem setu smo z merjenjem encimske kinetike ovrednotili inhibitorni učinek zaviralcev na katepsine B, L in S, v drugem setu smo detektirali NF-κB (protein p65) v jedrni in citosolni frakciji, v tretjem pa njegov endogeni zaviralec IκB-α (nefosforilirano in fosforilirano obliko).

Po 2-urni inkubaciji celic z zavirci smo inhibicijo katepsina L zaznali le pri cistatinu C. Po dodatnih 3 urah tretiranja v prisotnosti TNF-α je Gü 2149 inhibiral katepsina L in S, cistatin C je zavrl aktivnost katepsina S, kokošji cistatin pa je povzročil delno inhibicijo vseh treh katepsinov.

Glede na rezultate imunodetekcije NF-κB sklepamo, da Gü 2149 nima vpliva na aktivacijo signalne poti NF-κB. Cistatin C in kokošji cistatin pa najverjetneje predstavlja dražljaj za fosforilacijo IκB-α, saj sta že po 2-urnem inkubiranju v odsotnosti TNF-α povzročila translokacijo NF-κB v jedro. Pri vzorcih s kokošjim cistatinom, kjer smo dobili večji odziv, smo rezultat preverili še s konfokalno mikroskopijo, pri kateri v odsotnosti TNF-α nismo zaznali sprememb v jedru, po inkubaciji z zavircem in TNF-α pa smo zaznali precej višji prenos NF-κB v jedro v primerjavi s kontrolo. Ker je človeški cistatin C analog kokošjega cistatina, menimo, da proteina posredujeta svoje učinke na podoben način. Molekularni mehanizem, ki bi pojasnil to delovanje, še ni znan, glede na rezultate encimske kinetike po 2-urnem inkubiranju pa sklepamo, da za translokacijo NF-κB ni odgovorna inhibicija katepsinov.

Ključne besede: NF-κB, cisteinske peptidaze, cistatin C, kokošji cistatin, Gü 2149.

ABSTRACT

Transcription factor NF-κB and cysteine peptidases represent potential therapeutic targets for cancer treatment. A large number of evidence has been published about beneficial effects of cysteine peptidase inhibitors on reduction of growth and invasion of tumor cell lines. Likewise, numerous studies confirm that the inhibition of NF-κB signaling pathway stimulates tumor cell apoptosis. On the other hand, there are very few publications about the possible relationship between cysteine cathepsins and NF-κB.

The main purpose of this Master's Thesis was to study the effect of two endogenous cysteine peptidases inhibitors cystatin C and chicken cystatin and synthetic inhibitor Gü 2149 on NF-κB signaling pathway in prostate adenocarcinoma cells (PC-3).

Laboratory work involved the induction of NF-κB signaling pathway in PC-3 cells with TNF- α in the presence of cysteine peptidase inhibitors followed by the preparation of three different sets of cell lysates. In the first set, we evaluated the effects of selected inhibitors on cathepsins B, L and S by measuring enzyme kinetics. In the second set, NF-κB (protein p65) was detected in the nuclear and cytosolic fractions. In the third set, an endogenous NF-κB inhibitor, IκB- α (non-phosphorylated and phosphorylated form), was detected.

After 2 h cell incubation, inhibition of cathepsin L was observed only in cystatin C samples. After an additional 3 h cell treatment in the presence of TNF- α , Gü 2149 inhibited cathepsin L and S, cystatin C decreased the activity of cathepsin S, and chicken cystatin partly inhibited all three cathepsins.

According to the results of NF-κB immunodetection, we think that Gü 2149 has no effect on NF-κB signaling pathway activation. On the other hand, cystatin C and chicken cystatin most likely represent a stimulus for IκB- α phosphorylation, as they induced NF-κB translocation to the nucleus after 2 h cell incubation, in the absence of TNF- α . Since we obtained a higher response for chicken cystatin samples, the result was also verified by confocal microscopy, where no changes in the nucleus were observed in the absence of TNF- α . After treating the cells with the combination of inhibitor and TNF- α , a significantly higher transfer of NF-κB to the nucleus was detected in chicken cystatin samples compared to control. As human cystatin C is an analogue of chicken cystatin, we believe that they mediate their effects in a similar way. A molecular mechanism that would explain this activity is not known yet. According to the enzyme kinetics measurements after a 2-hour treatment, we concluded that the inhibition of cathepsins is not responsible for NF-κB translocation.

Keywords: NF-κB, cysteine peptidases, cystatin C, chicken cystatin, Gü 2149.

SEZNAM OKRAJŠAV

Cys	cistein (angl. <i>cystein</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
E-64	L-trans-eposukcinil-levcilamido(4-gvanidino)butan
IFN- γ	interferon gama (angl. <i>interferon gamma</i>)
IKK	kinaza zaviralca kapa B (angl. <i>inhibitor of kappa B kinase</i>)
I κ B	zaviralec kapa B (angl. <i>inhibitor of kappa B</i>)
K _i	konstanta inhibicije
NF- κ B	jedrni faktor kapa B (angl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
PMSF	fenilmelan sulfonil fluorid
RHD	Rel homologna domena (angl. <i>Rel homology domain</i>)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
TNF- α	tumorje nekrotizirajoči faktor alfa (angl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TNFR1	receptor za tumorje nekrotizirajoči faktor 1 (angl. <i>tumor necrosis factor receptor I</i>)
UV	ultravijoličen

1 UVOD

1.1 CISTEINSKE PEPTIDAZE

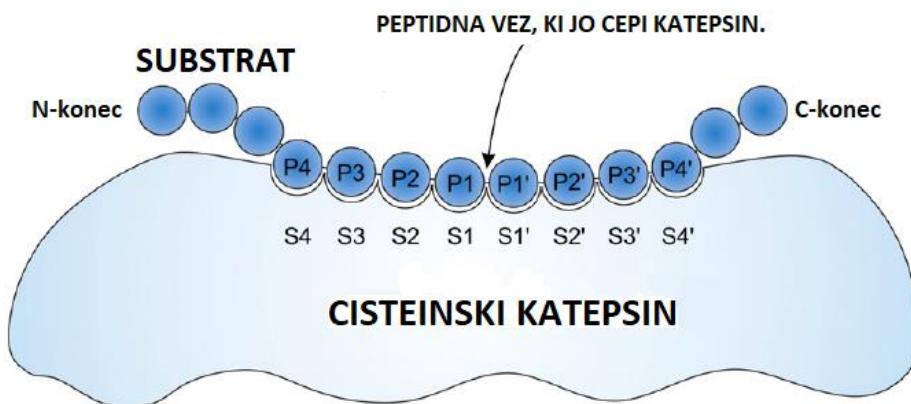
Peptidaze oziroma proteaze so encimi, ki irreverzibilno hidrolizirajo peptidno vez v aminokislinskem zaporedju z nukleofilnim napadom na karbonilni ogljikov atom, ki mu sledi hidroliza tetraedričnega intermediata. V človeškem telesu je skoraj 600 različnih proteaz, ki imajo ključno vlogo pri uravnavanju številnih fizioloških procesov. Ti encimi predstavljajo potencialne terapevtske tarče, saj je uravnavanje njihovega delovanja pri mnogih boleznih moteno. Peptidaze delimo v različne razrede glede na ključno katalitično komponento v aktivnem mestu encima. Tako imamo serinske, treoninske, cisteinske, aspartatne in glutamatne proteaze ter metaloproteaze (v aktivnem mestu imajo cink). Če encim cepi peptidno vez znotraj polipeptidne verige, ga uvrščamo med endopeptidaze, če pa se tarčna peptidna vez nahaja na N- ali C- koncu polipeptidne verige, govorimo o eksopeptidazah. Papainu podobne cisteinske proteaze, ki jih uvrščamo v klan CA, imajo značilno katalitično triado, sestavljeno iz cisteina, histidina in aspartata [1, 2].

Med proteaze spadajo tudi encimi, imenovani katepsini, ki so po večini cisteinske proteaze (catepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, W), razen catepsinov A in G, ki sta serinski proteazi, ter catepsinov D in E, ki sta aspartatni proteazi. Ti encimi se običajno nahajajo znotraj lizosomov, kjer poteka obsežna znotrajcelična proteoliza. Za njihovo optimalno aktivnost je potreben šibko kisel pH in reducirajoče okolje, ki sta značilna za lizosome. Katepsine so včasih obravnavali izključno kot encime, vpletene v končno razgradnjo proteinov; študije, v katerih so uporabili miši z izbitimi geni (angl. knockout mice), pa so pokazale, da imajo pomembno vlogo tudi pri proliferaciji, adheziji in apoptozi celic, kostni remodelaciji, aktivaciji prohormonov, presnovi lipidov in imunskemu odzivu [3–5].

Povečano prisotnost catepsinov zunaj lizosomov ponavadi povezujemo z različnimi patološkimi stanji, kot so rakava in srčno-žilna obolenja, okužbe ter avtoimunske, kostne in nevrodegenerativne bolezni. Vsem naštetim patologijam je skupno kronično vnetje in tudi povečano izražanje ter višja aktivnost catepsinov (še posebej v imunskeih celicah), ki sta posledici motenega uravnavanja genskega prepisovanja, aktivacije cimogenov in delovanja endogenih zaviralcev [1, 3–5].

Cisteinski katepsini so sestavljeni iz leve (L) in desne (R) domene, med katerima je reža z aktivnim mestom. Vezavna mesta za substrat, ki se nahajajo na obeh domenah, označujemo

s črko S, aminokislinski ostanki substrata, ki tvorijo interakcije z aktivnim mestom encima, pa so označeni s črko P (vezava proteinskega substrata na cisteinski katepsin je prikazana na sliki 1). Ta mesta so oštevilčena glede na položaj peptidne vezi, ki jo cepi katepsin. Hidroliza peptidne vezi poteče med aminokislinama, ki sta označeni s P1 in P1'. Ugotovili so, da sta vezavni mesti S2 in S1' glavni determinanti substratne specifičnosti. Za razliko od ostalih cisteinskih peptidov (npr. kaspaz, legumain) izkazujejo cisteinski katepsi širšo substratno specifičnost. Tako se lahko tudi na mesto S2, katerega struktura je zelo strogo definirana, vežejo številni hidrofobni ali aromatski aminokislinski ostanki [5–9].



Slika 1: Shematski prikaz vezave proteinskega substrata v aktivno mesto katepsina.

Aminokislinski ostanki substrata so označeni s črko P, vezavna mesta na encimu pa s črko S. Hidroliza peptidne vezi poteče med aminokislinama, ki sta označeni s P1 in P1' [10].

Vsi lisosomski katepsi so sintetizirani na ribosomih kot neaktivni preproencimi. Po vstopu v lumen endoplazmatskega retikuluma se odstrani signalni peptid na N-koncu, v Golgijskem aparatu pa poteče glikozilacija, fosforilacija manoze in tvorba disulfidnih vezi na proencimu, ki ga imenujemo tudi cimogen. Propeptid poskrbi za ustrezno zvijanje prokatepsina in transport v lisosome ter preprečuje neželeno aktivacijo proencima. Cimogen se prenese v lisosom preko vezave na manzo-6-fosfatni receptor, lahko pa tudi pri procesu zlivanja membran. Pri šibko kislih pogojih v endolizosому pride do proteolitične odstranitve propeptida in nastanka zrelega encima. Ta proces lahko poteka avtokatalitično ali s sodelovanjem drugih proteaz [11, 12].

Povečana proteolitična aktivnost katepsinov je zelo škodljiva, zato obstajajo številni mehanizmi, ki strogo nadzorujejo delovanje teh encimov. Njihova aktivnost je *in vivo* kontrolirana z lokacijo zrelih encimov, uravnavanjem izražanja njihovih genov,

potranslacijskimi modifikacijami, aktivacijo cimogenov, vrednostjo pH, endogenimi in eksogenimi zaviralci ali s kombinacijo vseh naštetih mehanizmov [3, 5, 13].

1.1.1 Katepsin B

Katepsin B (EC 3.4.22.1) je encim, ki spada v papainsko družino cisteinskih proteaz (C1) klana CA. Od drugih lizosomskih cisteinskih proteaz se loči po tem, da ima v svoji strukturi disulfidni mostiček med Cys108 in Cys119, ki z 18 drugimi aminokislinsami tvori t. i. zaporno zanko (angl. *occluding loop*). Ta v zaprtem stanju z ene strani ovira dostop substrata do reže z aktivnim mestom. Posledično lahko katepsin B odvisno od pH deluje kot eksopeptidaza (dipeptidil karboksipeptidaza) ali endopeptidaza – pri nevtralem pH je zanka odprta, kar ugodno vpliva na endopeptidazno aktivnost, v kislem okolju (optimalni pH okrog 5, ki je tipičen za lizosome) pa je povišana eksopeptidazna aktivnost [3, 14].

Katepsin B (tako kot večina drugih cisteinskih katepsinov) prednostno cepi peptidne vezi v substratih, ki imajo na poziciji S2 velike hidrofobne aminokislinske ostanke, od drugih katepsinov pa se razlikuje po tem, da na položaju S2 sprejme tudi arginin, ki tvori interakcije z glutamatom na mestu 245. Izoelektrična točka zrelega encima se nahaja v območju od 4,5 do 5,5 [15, 16].

Čeprav se gen za katepsin B konstitutivno izraža v vseh evkariontskih celicah, je nivo prepisovanja odvisen od celičnega tipa in stopnje diferenciacije. V večini sistemov pride do izločanja variabilnega deleža proencima iz celic, študije pa so pokazale, da je aktiven katepsin B lahko prisoten tudi v jedru, citoplazmi in plazemski membrani [12, 17, 18].

Tako kot ostali katepsini sodeluje pri končni razgradnji proteinov v lizosому, ima pa tudi številne bolj specifične funkcije. Skupaj s katepsinoma L in K sodeluje pri sproščanju ščitničnih hormonov s tiroglobulinom, v zunajceličnem matriksu tako pri nevtralnem kot kislem pH cevi številne proteine (npr. kolagen tipa IV, laminin, elastin, fibronektin) in sodeluje pri migraciji keratinocitov v procesu celjenja ran. Ugotovili so tudi, da ima zelo pomembno vlogo pri apoptozi jetrnih celic, saj se je pri miših z izbitim genom za katepsin B zmanjšala s TNF- α posredovana apoptoza hepatocitov. Stimulacija TNFR1 namreč povzroči sproščanje katepsinov iz lizosoma v citoplazmo, kjer pride do razgradnje številnih proteinov [19–22].

Zunajcelični katepsin B je vpletен v razvoj vnetnih bolezni dihalnih poti in sklepov. Obsežne študije so pokazale, da je njegova koncentracija v živalskih in človeških tumorjih povišana, zlasti pri napredovanih oblikah bolezni (npr. pri kolorektalnem raku, raku želodca, prostate,

dojk, jeter, ščitnice ...). Ima tudi vidno vlogo pri tumorski invaziji, metastaziranju in neovaskularizaciji [23–25].

1.1.2 Katepsin L

Katepsin L (EC 3.4.22.15) v glavnem poseduje endopeptidazno aktivnost in prednostno cepi peptidne vezi z aromatskimi ostanki na položaju P2 in hidrofobnimi ostanki na položaju P3. Aktiven je pri pH 3,0–6,5, njegova izoelektrična točka pa se nahaja v območju od 5,0 do 6,3 [12, 26, 27].

Prisoten je v vseh evkariontskih celicah. Izražanje gena za človeški katepsin L je pod nadzorom transkripcijskih faktorjev (SP1, SP3, NFY), aktivirajo pa ga tudi številni drugi efektorji, npr. rastni dejavniki, tumorski promotorji in supresorji ter aktivirani onkogeni. Številne izoforme katepsina L so prisotne tudi v jedru, kjer ima encim pomembno vlogo v regulaciji celičnega cikla [12, 28, 29].

Sposoben je razgraditi skoraj vse proteine, vključno z encimi, receptorji in transkripcijskimi faktorji. Udeležen je tudi v procesu omejene proteolize, pri kateri nastajajo aktivni encimi, receptorji in biološko aktivni peptidi. Ugotovili so, da je delovanje katepsina L nepogrešljivo v kardiomiocitih, antigen predstavitvenih celicah priželjca, keratinocitih, pri procesu spermatogeneze in uravnavanju celičnega cikla. Sodeluje pa tudi v številnih patoloških procesih, kot so virusne infekcije, ateroskleroza, invazija tumorskih celic in metastaziranje. Katepsin L po eni strani pospešuje apoptozo, po drugi strani pa deluje tudi protiapoptotično in je vpletен v razvoj rezistence tumorskih celic na učinke protitumornih zdravilnih učinkovin [12].

1.1.3 Katepsin S

Katepsin S (EC 3.4.22.27) je endopeptidaza, ki cepi strukturno podobne substrate kot katepsina B in L, vendar pa med njimi obstajajo razlike na mestu S2. Na položaju P2 katepsin S preferira razvezane hidrofobne aminokislinske ostanke, medtem ko imajo substrati, specifični za katepsin L, na tem mestu aromatske skupine, substrati katepsina B pa imajo lahko v stranski verigi bazično skupino. Katepsin S lahko za razliko od drugih lizosomskih peptidov razgrajuje proteine in peptide tudi v nevtralnem okolju. Optimalni pH za delovanje katepsina S je 6,5, po 1 uri inkubiranja pri pH 7,5 pa encim obdrži 60–70 % aktivnosti. Pod temi pogoji je aktivnost katepsinov B in L popolnoma zavrta [30, 31].

V primerjavi z večino lizosomskih cisteinskih peptidov je katepsin S prisoten le v določenih tkivih. Najvišje koncentracije encima so našli v bezgavkah, vranici in makrofagih, v

manjšem obsegu pa je prisoten tudi v ileumu, možganih, ščitnici in pigmentnih epitelijskih celicah mrežnice [12].

Gen za človeški katepsin S vsebuje vezavna mesta za AP1 (aktivatorski protein 1) in mikrosatelite CA (citozin-adenin), kar kaže na to, da je promotor katepsina S strogo reguliran. IFN- γ povzroči povečano izražanje gena v različnih celičnih tipih [32, 33].

Poleg proteolize v lizosomih ima katepsin S specifične znotraj- in zunajcelične funkcije v številnih fizioloških in patoloških procesih. Udeležen je v procesu izražanja molekul glavnega histokompatibilnega kompleksa II (MHC II) in antigenov na površini celic, razgrajevanju zunajceličnega matriksa pri aterosklerozi, razvoju pljučnih obolenj, luskavice, nevropske bolečine, Alzheimerjeve bolezni, revmatoidnega artritisa in multiple skleroze. Zelo pomembno vlogo pa ima tudi pri napredovanju rakavih bolezni. V številnih tumorskih celicah je povišana raven izražanja gena za katepsin S. Ker encim razgrajuje sestavine zunajceličnega matriksa, olajša tumorsko invazijo, generira rastne dejavnike in proizvaja dejavnike, ki uravnavajo razvoj žil [12, 34].

1.2 ZAVIRALCI CISTEINSKIH PEPTIDOV

1.2.1 Endogeni zaviralci

Cisteinske peptidaze so udeležene v številnih pomembnih znotraj- in zunajceličnih fizioloških procesih, zato mora biti njihova aktivnost strogo nadzorovana na različnih nivojih, da ne pride do nepotrebne proteolize, ki je za celice lahko škodljiva ali celo smrtonosna. Endogeni proteinski zaviralci teh encimov igrajo zelo pomembno vlogo pri uravnavanju delovanja telesu lastnih ali eksogenih cisteinskih peptidov [36].

Večina omenjenih proteinov je kompetitivnih, reverzibilnih in tesnovezočih (angl. *tight binding*) zaviralcev, ki substratu preprečujejo vezavo v aktivno mesto encima. Glede na fiziološko vlogo jih delimo na urgentne in regulatorne zaviralce. Najvidnejši predstavniki urgentnih zaviralcev so cistatini, ki so od svojih tarčnih encimov prostorsko ločeni in primarno zavirajo le proteaze, ki zapustijo lizosome, in proteaze mikroorganizmov. Navadno je njihova fiziološka koncentracija nekajkrat višja od koncentracije tarčne proteaze, kar omogoča učinkovito delovanje zaviralca. Regulatorni zaviralci se od urgentnih ločijo po tem, da delovanje peptidov ne le zavirajo, temveč tudi modulirajo. Navadno se nahajajo v istih organelih kot tarčne peptidaze [3, 36].

1.2.1.1 Cistatini

Cistatini so proteini, ki jih najdemo v različnih organizmih (živalih, rastlinah in mikroorganizmih). Ime cistatin je bilo prvič uporabljeno pri izolaciji proteinskega zaviralca proteaz iz beljaka kokošjega jajca, ta izraz pa se še danes uporablja za vse proteine, ki so strukturno zelo podobni kokošjemu cistatini. Cistatini so najbolj raziskani endogeni zaviralci cisteinskih peptidov, objavljenih pa je veliko študij, ki dokazujejo, da ti proteini niso le zaviralci encimov, temveč imajo številne druge vloge in so vključeni tako v fiziološke kot patološke procese. Dodatne znane funkcije cistatinov, neodvisne od inhibicije cisteinskih peptidov, so: povezovanje proteinov citoskeleta, uravnavanje transkripcije genov preko vezave na histone, antioksidativno delovanje, vezava na različne proteine in spremiščanje njihove strukture (npr. vezava cistatina C na amiloid β), indukcija avtofagije, preprečevanje vezave transformirajočega rastnega dejavnika β na svoj receptor, degranulacija citotoksičnih limfocitov T ... [35–40].

Ker je naddružina cistatinov zelo obsežna, jo delimo na 4 družine: stefine, cistatine, kininogene in druge homologe cistatinov, ki so med evolucijo izgubili zaviralno delovanje [36].

Stefini (cistatini tipa 1) so enoverižni proteini, sestavljeni iz približno 100 aminokislinskih ostankov. Sintetizirani so brez signalnega peptida, niso glikolizirani in ne vsebujejo disulfidnih mostičkov. Primarno se nahajajo znotraj celic, v majhnih količinah pa tudi v telesnih tekočinah. Najbolj raziskana sta stefina A in B [3].

Cistatini (cistatini tipa 2) so bolj razširjeni od stefinov. Vsebujejo signalni peptid, ki je odgovoren za izločanje cistatinov v zunajcelični prostor. Sestavlja jih okrog 115 aminokislinskih ostankov. Iz človeških tkiv je bilo izoliranih 7 različnih zaviralcev tega tipa: cistatin C, cistatin D, cistatin F, cistatin S, cistatin SA, cistatin SN in cistatin E/M. Vsi cistatini so kompetitivni, reverzibilni in tesnovezoči zaviralci cisteinskih peptidov [3].

Določitev kristalne strukture kokošjega cistatina, ki je analogen človeškemu cistatini C, je bila pomemben korak pri razumevanju mehanizma interakcije med cistatini in papainu podobnimi encimi. Molekula kokošjega cistatina je sestavljena iz petih antiparalelnih β -ploskev, ki so ovite okrog osrednjega α -heliksa. Ugotovili so, da so za zaviralno delovanje proteina ključne tri enote: N-konec polipeptidne verige in 2 lasnični zanki, ki povezujeta β -ploskve. Interakcije med cistatini in cisteinskimi proteazami so razmeroma nespecifične, aktivno mesto encimov pa ni neposredno udeleženo pri vezavi, zato se lahko cistatini vežejo tudi na inaktivirane cisteinske proteaze, vendar z manjšo afiniteto. Kljub strukturni

homologiji in podobnemu načinu inhibicije se cistatini razlikujejo v afiniteti do cisteinskih peptidov [36, 37].

Čeprav so cistatini razmeroma nespecifični zaviralci, lahko razlikujejo med endo- in eksopeptidazami. Na endopeptidaze se cistatini vežejo hitro in zelo tesno, zaviralni učinek pa dosežejo že v pM ali celo v fM koncentracijskem območju. Za zaviranje eksopeptidaz so potrebne nM ali μ M koncentracije cistatinov. Najmočnejša med njimi sta kokošji cistatin in cistatin C, ki papain, katepsin L in katepsin S zavirata v pM- ali celo v fM- območju, katepsin B pa v nM območju [36–38].

Glavni vir informacij o cistatinih in njihovih bioloških funkcijah so študije kokošjega cistatina, ki je bil izoliran prvi in še vedno ostaja najbolje okarakteriziran cistatin tipa 2. Kokošji cistatin kaže približno 44-odstotno homologijo zaporedja s človeškim cistatinom C. Proteina sta si zelo podobna po fizikalno-kemijskih lastnostih. Kokošji cistatin je sestavljen iz 115 aminokislinskih ostankov in vsebuje 2 disulfidna mostička. Obstaja v nefosforilirani obliki z izoelektrično točko 6,5 in v fosforilirani obliki z izoelektrično točko 5,6. Človeški cistatin C je sestavljen iz 120 aminokislin, ki tvorijo eno polipeptidno verigo. Za razliko od kokošjega cistatina ni fosforiliran. V fizioloških razmerah se lahko nahaja v obliki monomera, dimera ali oligomera. Cistatin C ni le zaviralec cisteinskih peptidov, temveč je tudi sam tarča proteolize. Njegovo inaktivacijo vršita serinska proteaza elastaza in katepsin D, ki je aspartatna proteaza. Fiziološke funkcije cistatina C so tesno povezane s funkcijami njegovih tarčnih encimov. Izredno pomemben je pri uravnavanju proliferacije, rasti in apoteze celic, diferenciaciji astrocitov, resorpciji kosti, predstavitev antigenov, uravnavanju delovanja fagocitov in drugih imunskih celic, pomembno vlogo pa ima tudi pri nastajanju metastaz, staranju, razvoju nevrodegenerativnih bolezni ter mnogih vnetnih bolezni. Prisoten je v večini telesnih tekočin, njegova koncentracija v krvi pa korelira s hitrostjo glomerulne filtracije, zato je pomemben kazalec ledvičnega delovanja pri kronični ledvični bolezni in diabetesu. Spremembe v zunajcelični koncentraciji cistatina C povezujejo s številnimi boleznimi, npr. revmatoidnim artritisom, srčno-žilnimi boleznimi, multiplo sklerozo, Alzheimerjevo boleznijo, rakom na dojki ... [37–40].

Kininogeni (cistatini tipa 3) so večji multifunkcionalni glikoproteini, ki se nahajajo v krvni plazmi. Zrele enoverižne kininogene cepijo encimi, imenovani kalikreini. Po cepitvi in sproščanju kinina so kininogeni sestavljeni iz dveh verig (lahke in težke). Težke verige vsebujejo tri domene, vendar le druga in tretja domena zavirata delovanje papainu podobnih

proteaz. Kininogeni se lahko sočasno vežejo na dve molekuli tarčnih encimov, vendar z različno afiniteto [36].

Četrta družina cistatinov so **homologi cistatinov brez zavirnega delovanja**, v katero spadajo fetuini in glikoproteini, bogati s histidinom, ki so zaradi mutacij v strukturno pomembnih regijah izgubili sposobnost zaviranja proteaz, vendar še vedno vsebujejo 2 cistatinski domeni [3].

1.2.1.2 Drugi proteinski zaviralci

Poleg cistatinov poznamo še druge družine proteinov, ki zavirajo delovanje proteaz, vendar so te nekoliko manj preučevane. Med njimi so najbolj znani tiropini in serpini. Tiropini so proteini, ki ne izkazujejo nobene homologije s cistatini, temveč so strukturno podobni prohormonu tiroglobulinu. Njihov najvidnejši predstavnik je ekvistatin. Serpini so tipični zaviralci serinskih proteaz, vendar lahko nekateri izmed njih zavirajo tudi cisteinske peptidaze. Antigen karcinoma skvamoznih celic 1 (SCCA1) je močan zaviralec katepsinov K, L in S, hurpin in endopin 2C pa specifično zavirata le katepsin L [3].

1.2.2 Nizkomolekularni zaviralci

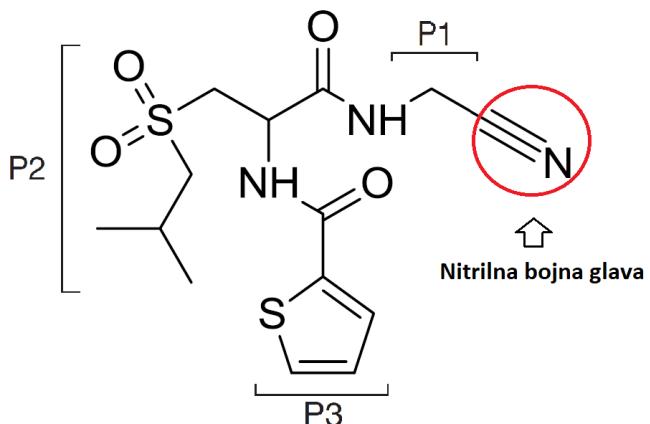
Cisteinski katepsi so zelo pomembne terapevtske tarče, saj so vpleteni v nastanek in razvoj osteoporoze, nevropatske bolečine, nevrodegenerativnih, srčno-žilnih, rakavih, avtoimunskih in drugih bolezni. Aktivno mesto cisteinskih proteaz z nukleofilno sulfhidrilno skupino omogoča načrtovanje visokospecifičnih zaviralcev, ki ne vplivajo na delovanje serinskih in aspartatnih proteaz. Problematično pa je doseči selektivnost med pripadniki iste družine cisteinskih proteaz in njihovimi izoencimi [1, 41].

Nizkomolekularni zaviralci lahko s katepsini tvorijo irreverzibilne kovalentne vezi, reverzibilne kovalentne vezi ali reverzibilne nekovalentne vezi. Večina zaviralcev vsebuje elektrofilne skupine, imenovane tudi elektrofilne bojne glave. Irreverzibilni zaviralci irreverzibilno alkilirajo, acilirajo ali sulfonirajo cistein v aktivnem mestu encima. Med njimi so najpomembnejši epoksisukcinati, saj je bilo odkritje epoksidnega širokospektralnega zaviralca E-64 (*L-trans*-eposukcinil-levcilamido(4-gvanidino)butan) v plesni *Aspergillus japonicus* izredno pomembno za nadaljnje raziskovanje lastnosti in funkcij cisteinskih katepsinov. E-64 namreč skoraj izključno reagira le s cisteinom v aktivnem mestu papainu podobnih proteaz. Primeri elektrofilnih bojnih glav v selektivnih in močnih zaviralcih cisteinskih proteaz so tudi vinilsulfoni, alil sulfoni, vinil sulfonati, diazometil ketoni in fluoro- ali klorometil ketoni. Reverzibilne zaviralce cisteinskih peptidov razdelimo na

kompetitivne, nekompetitivne in akompetitivne zaviralce. Najpomembnejši reverzibilni zaviralci so derivati aldehidov, ketonov, nitrilov in α -keto derivati [41–43].

1.2.2.1 Gü 2149

Spojina Gü 2149 je reverzibilni zaviralec katepsina S z nitrilno bojno glavo (struktura formula Gü 2149 je prikazana na sliki 2) in konstanto inhibicije $K_i = 45$ nM. Učinkovito zaviralno delovanje so na Fakulteti za farmacijo dokazali tudi na rekombinantnem katepsinu S, ki je bil pripravljen v kvasovki *Pichia pastoris*. Molekula zavira katepsine L, K in B le v koncentracijah, ki so večje od 10 μ M [44].



Slika 2: Struktura formula sinteznega zaviralca Gü 2149.

Z oznakami P1, P2 in P3 so označeni deli molekule, ki posnemajo aminokislinske ostanke substrata katepsina S [44].

1.3 SIGNALNA POT NF- κ B

1.3.1 Struktura in biološka vloga proteinov NF- κ B

Izraz "NF- κ B" (angl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) je v literaturi uporabljen za tri različne pojme: naddružino jedrnih dejavnikov, poddružino, ki vključuje proteina p100 in p105, ter specifični heterodimer p50-RelA, ki je najpogosteji dimer transkripcijskih faktorjev NF- κ B v različnih celicah.

Obsežna naddružina NF- κ B se deli na dve poddružini, imenovani proteini NF- κ B in proteini Rel. Vsi imajo v svoji strukturi proti N-koncu polipeptidne verige ohranjeno t. i. domeno RHD (angl. *Rel homology domain*), ki je odgovorna za vezavo na DNA, dimerizacijo in

translokacijo v jedro. Pri sesalcih poddružino Rel sestavlajo transkripcijski faktorji c-Rel, RelB in RelA (p65), družino NF-κB pa proteina p105 in p100. Slednja podležeta procesu omejene proteolize, pri čemer nastane iz p105 krajši aktiven protein p50, iz p100 pa p52, ki na C-koncu polipeptidne verige vsebujejo ponovitve ankirinskih motivov, odgovorne za vezavo zavirnih proteinov IκB. Proteina p50 in p52 ne moreta sprožiti prepisovanja genov, razen ko tvorita dimere s člani poddružine Rel. Vsi proteini iz naddružine NF-κB lahko *in vivo* tvorijo homodimere ali heterodimere, izjema je RelB, ki se *in vivo* povezuje le v homodimere. Dimeri proteinov NF-κB se vežejo na zaporedja DNA, sestavljena iz 9–10 baznih parov, ki jih imenujemo "mesta κB". Slednja so zelo variabilna in jih najdemo na regulatornih regijah številnih celičnih in virusnih promotorjev. Afiniteta med različnimi podenotami NF-κB zelo variira, prav tako pa se dimeri razlikujejo po afiniteti do tarčnih genov. Transkripcijski faktorji NF-κB neposredno uravnava prepisovanje več kot 300 genov, ki kodirajo adhezijske molekule, vnetne citokine, kemokine, rastne dejavnike, antiapoptotične proteine itd. Transkripcijski faktorji NF-κB so torej ene izmed ključnih molekul pri angiogenezi, apoptozi, celični adheziji in rasti, odgovoru na oksidativni stres, prirojeni imunosti, vnetju ... Nepravilno uravnavanje aktivnosti NF-κB je povezano s številnimi bolezenskimi stanji, kot so rakava obolenja, astma, artritis, sladkorna bolezen, vnetna črevesna bolezen, sepsa ... [45, 46].

1.3.2 Delovanje signalne poti NF-κB

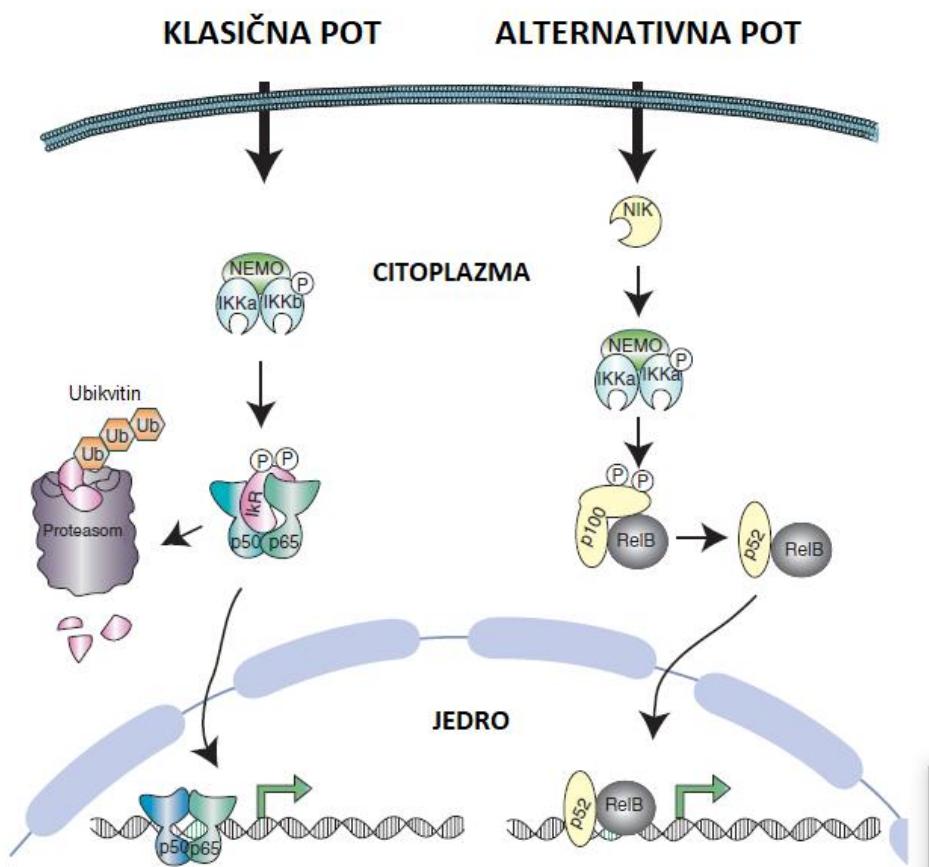
Transkripcijski faktorji NF-κB so izraženi v skoraj vseh celičnih tipih in imajo ključno vlogo pri odgovoru celic na določene zunanje dražljaje. Aktivacija signalne poti NF-κB je lahko posledica bakterijskih ali virusnih infekcij, ishemije, acidoze, sevanja UV ali γ in delovanja vnetnih citokinov, rastnih dejavnikov, hormonov, nekaterih kemoterapeutikov ter reaktivnih kisikovih zvrst [47].

V večini celic se dimer NF-κB nahaja v citoplazmi, kjer je vezan v neaktivni kompleks z zavirnim proteinom IκB. Za aktivacijo NF-κB poznamo dve glavni poti: klasično (oz. kanonično) in alternativno (oz. nekanonično). Najpogosteje se klasična pot začne z vezavo zunajceličnega liganda na površinski receptor (npr. vezava TNF-α na TNFR1). Temu sledi aktivacija citoplazemskega kinaznega kompleksa, imenovanega "kinaza IκB (IKK)", ki je sestavljen iz treh podenot: dveh sorodnih katalitičnih kinaz (IKK α in IKK β) in ogrodnega proteina, imenovanega NEMO. V primeru alternativne poti, ki jo sprožijo drugačni ligandi

(npr. limfotoksin- β), je za aktivacijo kinaze IKK α odgovoren encim NIK (angl. *NF- κ B-inducing kinase*) [45, 47].

Pri klasični poti je aktiviran encim IKK β , ki fosforilira zaviralni protein I κ B, vezan na dimer NF- κ B (npr. I κ B- α vezan na heterodimer p50-p65). Temu sledi vezava ubikvitina na I κ B in njegova razgradnja v proteasomu. Posledično lahko dimer NF- κ B vstopi v jedro in se veže na DNA. Pri alternativni poti encim IKK α specifično fosforilira protein p100, ki je vezan v kompleks z RelB. Sledi delna proteoliza, pri kateri nastane aktivni dimer p52-RelB, ki se prav tako lahko premesti v jedro in uravnava izražanje genov. Klasična in alternativna pot aktivacije signalne poti NF- κ B sta prikazani na sliki 3 [45].

Aktivacija NF- κ B je večinoma prehodna (po navadi traja okrog 30 minut). Glavne molekule pri inaktivaciji signalne poti NF- κ B naj bi bili na novo sintetizirani proteini I κ B, ki lahko vstopijo v jedro, se vežejo na dimere NF- κ B in jih premestijo nazaj v citosol. Čeprav je aktivnost transkripcijskih faktorjev NF- κ B inducibilna v večini celic, so v limfocitih B, makrofagih, nevronih, gladkih mišičnih celicah žil in v številnih tumorjih odkrili konstitutivno aktivne proteine NF- κ B [45, 47].



Slika 3: Shematski prikaz klasične in alternativne poti aktivacije signalne poti NF- κ B [47].

1.3.3 Kontrola signalne poti NF-κB

Kot smo že omenili, se v večini nestimuliranih celic neaktivni dimeri NF-κB nahajajo v citoplazmi, vezani na svoje zaviralne proteine IκB. Tipični predstavniki proteinov IκB, ki določajo lokacijo dimerov v citosolu, so IκB- α , IκB β , IκB ϵ ter prekurzorska proteina NF-κB p100 in p105. Glavna netipična člana družine zaviralnih proteinov sta Bcl-3 in IκB ζ , ki po ustreznji stimulaciji celic uravnavata aktivnost NF-κB v jedru. Vsi proteini IκB vsebujejo pet do sedem ponovitev ankirinskih motivov, s katerimi se vežejo na domeno RHD proteinov NF-κB. Na splošno velja, da se individualni proteini IκB prednostno povezujejo le z določeno podskupino dimerov NF-κB. IκB- α in IκB β zavirata komplekse, ki vsebujejo proteina c-Rel ali p65, pri tem pa ima IκB- α višjo afiniteto do dimera p65:p50 v primerjavi s kompleksom p65:p65. Aktiviran transkripcijski faktor NF-κB poveča izražanje gena za IκB, kar predstavlja pomembno negativno povratno zanko, od katere je odvisno trajanje odgovora NF-κB [47].

Za uravnavanje aktivnosti NF-κB so pomembne tudi potranslacijske modifikacije. Pri aktivaciji signalne poti je ključna fosforilacija 2 serinskih aminokislinskih ostankov kompleksa IKK ter posledična fosforilacija in ubikvitacija proteinov IκB. Poleg tega pa so tudi podenote samih proteinov NF-κB podvržene različnim potranslacijskim modifikacijam (npr. fosforilaciji, ubikvitaciji, acetilaciji), ki so med drugim pomembne za doseganje maksimalne aktivnosti transkripcijskih dejavnikov in prekinitev odgovora NF-κB. Odkrili so tudi, da je delovanje NF-κB zavroto, če pride do oksidacije ali alkilacije cisteina v domeni RHD, ki je odgovorna za vezavo na DNA [47].

1.3.4 Vloga NF-κB pri raku prostate

NF-κB je že zelo dolgo obravnavan kot obetavna terapevtska tarča pri zdravljenju raka prostate, saj obstajajo eksperimentalni in klinični dokazi, da je vpletен v celično signaliziranje, ki spodbuja preživetje in rast rakavih celic, invazijo in metastaziranje tumorjev ter razvoj rezistence na kemoterapijo in radioterapijo. Študije na ljudeh ter laboratorijski poskusi *in vivo* in *in vitro* so pokazali, da je NF-κB konstitutivno aktiven v večini primerov raka prostate [48].

Pri raku prostate je razvoj lokalizirane neoplazme v invazivno, metastatsko in smrtno bolezen povezan s pojavom androgenske neodvisnosti tumorskih celic. Slednja korelira s povečano aktivnostjo NF-κB in posledično povečanim izražanjem preživitvenih in antiapoptotičnih genov (Bcl-2, Bcl-XL, IAP, ciklin D1 ...), kar povzroči zmanjšano

občutljivost rakavih celic na apoptozo, posredovano s TNF- α . Razvoj androgenske neodvisnosti in rezistence na apoptozo pri raku prostate pa korelira tudi z visokimi koncentracijami serumskega TNF- α . Vezava TNF- α na površinski receptor TNFR1 v teh celicah ne sproži proteinske kaskade, ki se konča z aktivacijo transkripcijskega faktorja AP-1 (aktivatorski protein 1) in smrtjo celice, temveč pride do preusmeritve signala in aktivacije NF- κ B [49, 50].

2 NAMEN DELA

Transkripcijski faktorji NF-κB in cisteinske peptidaze predstavljajo zelo obetavne terapevtske tarče pri zdravljenju raka prostate, saj je v večini primerov aktivnost NF-κB v tumorskih celicah povišana, praviloma pa je povečano tudi izražanje različnih cisteinskih katepsinov. Porušeno uravnavanje delovanja navedenih molekul je eden izmed glavnih krivcev za tumorsko invazijo, metastaziranje, pojav rezistence na antiandrogeno terapijo in napredovanje bolezni do terminalne faze.

Da bi ugotovili, ali imajo cisteinski katepsi B, L in S kakršnokoli vlogo pri uravnavanju signalne poti NF-κB, bomo v celični liniji človeškega adenokarcinoma prostate PC-3 s TNF- α inducirali signalno pot NF-κB v prisotnosti različnih zaviralcev cisteinskih peptidov (kokošjega cistatina, cistatina C in Gü 2149). Pripravili bomo tri različne sete celičnih lizatov. Pri prvem setu lizatov bomo zaviralo delovanje ovrednotili z merjenjem encimske kinetike preko razgradnje treh fluorogenih substratov (Z-RR-AMC, Z-FR-AMC in Z-VVR-AMC). V drugem setu bomo s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata in prenosa western detektirali transkripcijski faktor NF-κB (protein p65) v citoplazemski in jedrni frakciji celic, v tretjem setu pa njegov zaviralec IκB- α (fosforilirano in nefosforilirano obliko). Za najučinkovitejšega izmed zaviralcev bomo vpliv na signalno pot potrdili še z detekcijo NF-κB v jedru in citoplazmi celic PC-3 s pomočjo konfokalne mikroskopije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Celična linija PC-3

Celična linija PC-3 (ATCC: CRL-1435): celice adenokarcinoma prostate izolirane iz metastatskega raka prostate (stadij IV).

3.1.2 Gojišča

Osnovno gojišče:

Advanced DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) : Ham's F12 = 1 : 1

Kompletno gojišče (100 mL):

44 mL Advanced DMEM	Gibco
44 mL Ham's F12	Gibco
10 mL FBS (fetalni govejji serum)	Gibco
1 mL L-glutamin	Sigma-Aldrich
1 mL penicilin/streptomycin	Sigma-Aldrich

3.1.3 Reagenti in kemikalije

Preglednica 1: Uporabljeni reagenti in kemikalije ter njihov izvor.

Reagent/kemikalija	Proizvajalec
akrilamid/bis-akrilamid	Sigma-Aldrich
amonijev persulfat	Sigma-Aldrich
L-cistein	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT	Sigma-Aldrich
E-64	Sigma-Aldrich
EDTA (etilendiamintetraocetna kislina)	Sigma Life Sciences
96-odstotni etanol	Stella TECH
formaldehid	Sigma-Aldrich

Reagent/kemikalija	Proizvajalec
glicin	Sigma Life Sciences
Gü 2149	Prof. dr. Michael Güttschow (Univerza v Bonnu)
HEPES	Sigma-Aldrich
KCl	Carlo Erba Reagenti
KH ₂ PO ₄	J.T.Baker
koktejl proteaznih in fosfataznih zaviralcev	Thermo Scientific
komplet reagentov za določevanje celokupne koncentracije proteinov (DCT TM Protein Assay - reagenti A, B, S)	Bio-Rad
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne
NaCl	Fluka
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck Millipore
natrijev acetat	Fluka
natrijev dodecil sulfat (SDS)	Merck
nigrozin	Merck Millipore
Nonident P-40	Sigma-Aldrich
PBS (Dubbecco's phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich
PEG 8000	Sigma-Aldrich
PMSF	Imidex
ProLong TM Gold Antifade Mountant	Molecular Probes TM
SuperSignal TM West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal TM West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific
TEMED (<i>N</i> , <i>N</i> , <i>N'</i> , <i>N'</i> -tetrametiletilendiamin)	Sigma-Aldrich
tris-baza	Sigma Life Sciences
tris-HCl	Merck Millipore
Triton X-100	Serva
Tween [®] 20	Merck Millipore
Z-RR-AMC	Bachem
Z-FR-AMC	Bachem
Z-VVR-AMC	Biomol

3.1.4 Pufrski sistemi

10-kratni PBS pH=7,4; 1000 mL

(1370 mM NaCl, 27 mM KCl, 101 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 18 mM KH₂PO₄)

80 g NaCl

2 g KCl

18,05 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

2,4 g KH₂PO₄

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

Pufer za odlepljanje celic; 500 mL (0,02-% EDTA v PBS)

50 mL 10x PBS

537 µL 0,5 M EDTA

450 mL destilirana voda

Raztopino sterilno filtriramo.

Lizirni pufer za IκB-α pH=6,5; 200 mL

(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1-% Triton X-100)

2,383 g HEPES

1,7532 g NaCl

400 µL 0,5 M EDTA

2 mL Triton X-100

Z destilirano vodo dopolnimo do 200 mL in uravnamo pH na 6,5.

Lizirni pufer A pH=7,9; 100 mL

20 mL 50 mM HEPES

1,5 mL 0,1 M MgCl₂

2 mL 0,5 M KCl

1 mL 10-% Nonident P-40

0,5 mL 0,1 M DTT

1 mL 100 mM PMSF

Z destilirano vodo dopolnimo do 100 mL.

Lizirni pufer B pH=7,9; 100 mL

40 mL 50 mM HEPES

1,5 mL 0,1 M MgCl₂

2,45 g NaCl

40 mL 0,5 M EDTA

25 mL glicerol

1 mL 100 mM PMSF

Z destilirano vodo dopolnimo do 100 mL.

Lizirni pufer za merjenje aktivnosti katepsinov pH=5,5; 200 mL

(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1-% Triton X-100)

2,383 g HEPES

1,7532 g NaCl

400 μ L 0,5 M EDTA

2 mL Triton X-100

Z destilirano vodo dopolnimo do 200 mL in uravnamo pH na 5,5.

10-kratni pufer za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata; 1000 mL (10x SDS-PAGE pufer)

(239 mM tris baza, 1,92 M glicin, 35 mM natrijev dodecil sulfat)

29 g tris baza

144 g glicin

10 g natrijev dodecil sulfat

Z destilirano vodo dopolnimo do 1000 mL.

10-kratni TBS pH=7,4; 1000 mL

(250 mM Tris baza, 1370 mM NaCl, 30 mM KCl)

30 g tris baza

80 g NaCl

2,2 g KCl

Dopolnimo do 800 mL z destilirano vodo in umerimo pH na 7,4. Nato dopolnimo z destilirano vodo do 1000 mL

1,5 M tris-HCl pH=6,8 ali pH=8,8; 500 mL

90,855 g tris

Dopolnimo z destilirano vodo do 500 mL in umerimo pH na 6,8 ali 8,8.

TTBS; 1000 mL (0,1-% Tween® 20 v TBS)

99,9 mL 10x TBS

899,1 mL destilirana voda

1 mL Tween® 20

Pufer za odstranjevanje vezanih protiteles z membrane; 1000 mL (stripping buffer)

(2-% SDS, 94 mM Tris-HCl, 100 nM β -merkaptoetanol)

20 g SDS

62,5 mL 1,5 M Tris-HCl pH=6,8

7 mL β -merkaptoetanol

Dopolnimo z destilirano vodo do 1000 mL.

Osnovni pufer za endopeptidazno aktivnost katepsina B pH=6,0; 500 mL

(88 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 12 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,1-% PEG 8000)

6,07 g NaH₂PO₄ x H₂O

1,07 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

0,5 g PEG 8000

Dopolnimo z destilirano vodo do 500 mL in uravnamo pH na 6,0.

Osnovni pufer za aktivnost katepsina L pH=5,5; 500 mL

(15 mM ocetna kislina, 85 mM natrijev acetat, 0,1-% PEG 8000)

0,45 g ocetna kislina

3,48 g natrijev acetat

0,5 g PEG 8000

Dopolnimo z destilirano vodo do 500 mL in uravnamo pH na 6,0.

Osnovni pufer za aktivnost katepsina S pH=6,5; 500 mL

(28 mM K₂HPO₄, 72 mM KH₂PO₄, 0,1-% PEG 8000)

2,43 g K₂HPO₄

4,91 g KH₂PO₄

0,5 g PEG 8000

Dopolnimo z destilirano vodo do 500 mL in uravnamo pH na 6,5.

Aktivacijski pufer za katepsine B, L in S; 50 mL

(5 mM L-cistein, 1,5 mM EDTA)

50 mL osnovni pufer za ustrezni katepsin

30,29 mg L-cistein

27,9 mg EDTA

Obvezno shranjujemo v hladilniku (2–8 °C); rok uporabnosti: 14 dni.

6-kratni nanašalni pufer pH=7,6; 100 mL

100 mM EDTA

60 % glicerol

1 % SDS

0,06 % bromfenol modro

pH uravnamo na 7,6 s Trisom.

3.1.5 Poliakrilamidni geli

Ločevalni gel (12-%)

3,15 mL 40-% akrilamid

2,625 mL 1,5 M tris-HCl (pH=8,8)

4,455 mL H₂O

131,25 µL 10-% SDS

131,25 µL 10-% APS

4,5 µL TEMED

Koncentracijski gel (5-%)

752 μ L	40-% akrilamid
780 μ L	1,5 M tris-HCl (pH=6,8)
4 mL	H ₂ O
60 μ L	10-% SDS
60 μ L	10-% APS
6 μ L	TEMED

3.1.6 Proteini

Preglednica 2: Uporabljeni proteini in njihov izvor.

Protein	Proizvajalec
BSA (bovine serum albumin)	Serva
cistatin C	Cimerman N.; 1993 [51]
kokošji cistatin	Bode W. in sodelavci; 1988 [52]
kozja protimišja protitelesa (IgG + IgM), konjugirana s hrenovo peroksidazo	Jackson Immuno Research
kozja protizajčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Invitrogen
mišja protitelesa proti NF- κ B (p65)	Santa Cruz Biotechnology
mišja protitelesa proti NF- κ B (p65), označena z barvilom Alexa Fluor 488	Santa Cruz Biotechnology
označevalec velikosti (SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard)	Thermo Fisher Scientific
papain	Sigma-Aldrich
TNF- α	Sigma-Aldrich
tripsin	Gibco
zajčja protitelesa proti fosforolirani obliki I κ B- α (Ser 32)	Cell Signaling Technology
zajčja protitelesa proti I κ B- α (44D4)	Cell Signaling Technology
zajčja protitelesa proti PCNA (jedrni antigen proliferirajočih celic)	Santa Cruz Biotechnology

3.1.7 Laboratorijska oprema in aparature

Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema in aparature ter njihovi proizvajalci.

Laboratorijski instrument/aparatura	Proizvajalec
analitska tehnica AB104	Mettler Toledo
analitska tehnica Exacta 610EB	Tehnica
avtoklav	Kambič laboratorijska oprema
avtomatska večkanalna pipeta	Biohit
avtomatske enokanalne pipete (5–120 μ L)	Biohit
celični inkubator CB 210	Binder
centrifuga 5415R	Eppendorf
centrifuga Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific
centrifugirke (15 in 50 mL)	TPP®
čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Safire™	Tecan Group Ltd.
črne mikrotitrskie plošče	Thermo Fischer Scientific
G-box	Syngene
gojitvene posode T25 in T75	TPP®
iBlot®	Life Technologies
inkubator WTB Binder	Binder
sterilna komora LFVP12	Iskra PIO, d. o. o.
sterilna komora PIO SMBC 183AV, PIO LFVP9	Iskra PIO, d. o. o.
komplet za gelsko elektroforezo	Bio-Rad
konfokalni mikroskop	Zeiss
kuhalnik	Končar
magnetno mešalo Rotamix 606MM	Tehnica
mikrocentrikugirke (500 μ L, 1500 μ L in 2000 μ L)	Sarstedt
namizna centrifuga Capsulefuge PMC060	TOMY
pH meter	Hanna instruments
pipetor	Biohit Midi Plus
platične stekleničke za gojišče	TPP®
polavtomatske pipete	Eppendorf
prozorne mikrotitrskie plošče	TPP®

Laboratorijski instrument/aparatura	Proizvajalec
ročna večkanalna pipeta	Costar®
serološke pipete	TPP®
svetlobni mikroskop TMS-F	Nikon
tehtnica PB 3001	Mettler Toledo
ultrazvočna kadička Sonis3	Iskra PIO, d. o. o.
vibracijski mešalnik Vibromix 10	Tehtnica
vibracijski mešalnik Vibromix 314 EVT	Tehtnica
vodna kopel	Grant JB Academy

3.2 METODE

3.2.1 Postopki za delo s celično linijo PC-3

Vsi v nadaljevanju opisani postopki so potekali v skladu s principi aseptičnega dela v sterilni komori. Preden smo vso potrebno opremo in kemikalije prenesli v notranjost sterilne komore, smo jih dezinficirali s 70-% etanolom. Pred delom smo si vedno nadeli zaščitne rokavice in jih pred vsakim vstopom v sterilno komoro dezinficirali s 70-% etanolom.

3.2.1.1 Odmrzovanje celic

Celice PC-3 dolgoročno shranjujemo v Dewarjevih posodah v plinski fazi dušika ($T \approx -196^{\circ}\text{C}$). Kriovialo s celicami smo ob uporabi ustrezne zaščite vzeli iz vsebnika in jo 2 minuti inkubirali v vodni kopeli pri 37°C . V sterilni komori smo celice suspendirali v 1 mL predhodno ogretega gojišča (37°C) in jih prenesli v centrifugirko, dodali še 4 mL gojišča in vsebino centrifugirali 5 minut pri sobni temperaturi in 1200 obratih/min. Supernatant smo odlili in dodali 1 mL svežega gojišča, v katerem smo premešali celice in jih prenesli v plastično gojitveno posodo s filtrom, kamor smo predhodno odpipetirali ustrezeno količino ogretega gojišča (posoda T25: 4–5 mL gojišča; posoda T75: 8–9 mL gojišča).

3.2.1.2 Gojenje, subkultiviranje in štetje celic

Celice smo gojili v sterilnih plastičnih posodah s površino 25 cm^2 oziroma 75 cm^2 v celičnem inkubatorju (37°C in 5-% CO_2). Gojišče smo zamenjali na vsakih 48 oziroma 72 ur.

Celice smo subkultivirali, preden so dosegle maksimalno gostoto (konfluentnost), in jih v ustrejni koncentraciji precepili. Iz stare gojitvene posode smo najprej odpipetirali gojišče in ga zavrgli (ker so celice PC-3 pritrjene, ostanejo v posodi). Celice smo 2-krat sprali s 5 mL pufrja PBS (brez Mg^{2+} in Ca^{2+} ionov) in ga zavrgli. V posodo smo enakomerno porazdelili 5 mL raztopine tripsina v fosfatnem pufru z 0,02-% EDTA (90 μL tripsina v 5 mL fosfatnega pufru z 0,02-% EDTA) in celice približno 8 minut pustili v celičnem inkubatorju. Nato smo posodo od strani nežno potresli, da bi celice ločili od podlage, in s svetlobnim mikroskopom preverili, ali so se vse celice odlepile. Zatem smo s serološko pipeto nekajkrat sprali dno posode in celotno suspenzijo prenesli v centrifugirko, kamor smo predhodno odpipetirali 3 mL svežega gojišča, s katerim smo inaktivirali tripsin. Vsebino smo 5 minut centrifugirali pri 2000 obratih/min pri sobni temperaturi. Supernatant smo v celoti zavrgli in pelet resuspendirali v 1 mL svežega gojišča. Če smo celice subkultivirali le z namenom nadaljnjega gojenja, smo ustrezен volumen suspendiranih celic prenesli v svežo posodo T75.

z 8 mL gojišča. Če pa smo celice žeeli uporabiti v poskusu, jih je bilo potrebno najprej prešteti, da smo v vseh gojitvenih posodah imeli ustrezno koncentracijo celic.

Celice smo prešteli tako, da smo iz 1 mL suspenzije vzeli 100 mikrolitrski alikvot. Če je bilo celic toliko, da jih ni bilo mogoče natančno prešteti pod mikroskopom, smo jih ustrezno razredčili s svežim gojiščem, redčenje pa smo upoštevali pri izračunu. Alikvotu smo dodali še 100 μL 0,2%-raztopine nigrozina in dobro premešali. Na objektno stekelce s hemocitometrom smo na zgornje in spodnje polje nanesli po 10 μL končne suspenzije in celice prešteli s pomočjo svetlobnega mikroskopa. Nigrozin prehaja samo prek poškodovane membrane in mrtve celice obarva črno, zato smo pri štetju upoštevali le neobarvane celice, ki so se nahajale znotraj označenih območij na hemocitometru. Celice smo prešteli na vsaj 4 poljih. Celokupno število celic (N) v prvotni suspenziji smo izračunali po enačbi 1.

$$\mathbf{N} = \bar{x} * f_r * 2 * 10^4$$

Enačba 1: \bar{x} je povprečje štirih štetij, f_r je faktor redčenja, s katerim upoštevamo morebitno redčenje z gojiščem, z 2 je potrebno pomnožiti zaradi redčenja z raztopino nigrozina, z 10^4 pa zaradi upoštevanja volumna na hemocitometru.

3.2.1.3 Priprava celičnih lizatov

V okviru eksperimentalnega dela smo pripravili 3 različne sete celičnih lizatov. V prvem setu smo preverjali prisotnost fosforilirane oblike I κ B- α in celokupne količine I κ B- α , v drugem setu smo v jedrni in citosolni frakciji detektirali transkripcijski faktor NF-κB, tretji set pa je služil za kinetične meritve aktivnosti cisteinskih katepsinov.

a) 1. set celičnih lizatov za detekcijo I κ B- α

Z delom smo začeli, ko so celice PC-3 v 12 gojitvenih posodah dosegle ustrezno gostoto. Najprej smo pripravili posamezna gojišča z 1 μM koncentracijo zaviralcev cisteinskih peptidov:

- 1. vzorec (kontrola): 10 μL DMSO + 9,990 mL gojišča
- 2. vzorec (cistatin C): 45 μL 222 μM raztopine cistatina C + 9,955 mL gojišča
- 3. vzorec (kokošji cistatin): 130 μL 77 μM raztopine kokošjega cistatina + 9,870 mL gojišča
- 4. vzorec (Gü 2149): 10 μL 1 mM raztopine Gü 2149 + 9,990 mL gojišča

Iz vseh 12 posod smo odpipetirali staro gojišče, ga zavrgli in celice inkubirali v 3 mL gojišča z zavircem oz. DMSO pri 37 °C in 5-% CO₂. Po 2 urah (čas t₀) smo v prvih 4 vzorcih začeli s pripravo lizatov (opisana v nadaljevanju), iz ostalih 8 posod pa smo odstranili celotno

gojišče in ga zamenjali z novim, ki je vsebovalo 20 ng/mL TNF- α in 1 μ mol/L zaviralca oz. DMSO. Celice smo zopet inkubirali pri 37 °C in 5-% CO₂. Iz drugih 4 posod smo lizate pripravili po 30 minutah, iz zadnjih 4 pa po 3 urah.

Priprava lizatov pri času t₀, 30 min in 3 h je potekala po naslednjem postopku:

1. Po običajnem odlepljanju celic smo suspenzijo celic prenesli v centrifugirko, dodali 3 mL PBS in 5 minut centrifugirali pri 2000 obratih/min in sobni T.
2. Supernatant smo odlili, resuspendirali pelet v 1 mL PBS, dodali še 5 ml PBS ter 5 minut centrifugirali pri 2000 obratih/min in sobni T.
3. Zopet smo odlili supernatant, pelet resuspendirali v preostali trekočini, ga prenesli v mikrocentrifugirko, dodali 1 ml PBS in centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih/min in sobni T.
4. Odstranili smo celoten supernatant, celice pa smo resuspendirali v hladnem lizirnem pufru za I κ B- α (volumen lizirnega pufra je odvisen od količine peleta celic - navadno 100 μ L).
5. Tako smo dodali koktajl proteaznih in fosfataznih zaviralcev (1/100 celotnega volumna).
6. Vzorce smo premešali, dali na led za 30 minut, nato pa shranili na -80 °C.
7. Naslednji dan smo lizate odtajali na ledu in jih dali v ultrazvočno kadičko 2-krat za 5 sekund in 1-krat za 8 sekund. Vzorce smo centrifugirali 15 minut pri 4 °C in maksimalnem številu obratov. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in dali na led, pelet pa zavrgli.

b) 2. set celičnih lizatov za meritev aktivnosti katepsinov B, L in S

Drugi set celičnih lizatov smo pripravili pri času t₀ in po 3 urah na popolnoma enak način kot lizate za detekcijo I κ B- α , le da smo izpustili 2. in 5. korak. Uporabili smo lizirni pufer za merjenje aktivnosti katepsinov (pH=5,5).

c) 3. set celičnih lizatov za detekcijo NF- κ B v citosolni in jedrni frakciji

Pri tej metodi smo celice PC-3 tretirali na enak način kot pri prvih dveh setih (enake koncentracije zaviralcev, TNF- α , časovni intervali ter pogoji inkubacije), postopek se razlikuje le po pripravi celičnih lizatov, saj smo morali ločiti jedrno in citosolno frakcijo.

Priprava lizatov pri času t₀, 30 min in 3 h je potekala po naslednjem postopku:

1. Po običajnem odlepljanju celic smo suspenzijo celic prenesli v centrifugirko, dodali 5 mL hladnega PBS ter 5 minut centrifugirali pri 2000 obratih/min in 8–9 °C.
2. Supernatant smo odlili, resuspendirali pelet v 1 mL hladnega PBS, dodali še 5 ml hladnega PBS ter 5 minut centrifugirali pri 2000 obratih/min in 8–9 °C.

3. Zopet smo odlili supernatant, pelet resuspendirali v preostali tekočini, ga prenesli v mikrocentrifugirko, dodali 1 mL hladnega PBS in centrifugirali 5 minut pri 12000 obratih/min in 4 °C.

4. Odstranili smo celoten supernatant, celice resuspendirali v 125 µL ledeno mrzlega lizirnega pufra A z dodanim zavircem PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid), suspenzijo mešali na vibracijskem mešalniku 10 sekund in nato inkubirali na ledu 10 minut. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 4 °C in 5200 obratih/min. Supernatant (citosolno frakcijo) smo prenesli v nove mikrocentrifugirke in jih shranili na –80 °C.

5. Pelet smo resuspendirali v 1,5 mL hladnega PBS in centrifugirali 5 minut pri 12000 obratih/min in 4 °C. Odstranili smo supernatant in pelet resuspendirali v 70 µL ledeno mrzlega lizirnega pufra B z dodanim zavircem PMSF. Vzorce smo inkubirali v ultrazvočni kadički (3-krat 8 sekund) in nato 1 uro na ledu (vsakih 15 minut smo jih premešali na vibracijskem mešalniku). Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 4 °C in maksimalnem številu obratov. Supernatant (jedrno frakcijo) smo prenesli v sveže mikrocentrifugirke in shranili na –80 °C.

3.2.2 Merjenje celokupne koncentracije proteinov v celičnih lizatih

Celokupno koncentracijo proteinov smo izmerili v vseh celičnih lizatih, kar nam je omogočilo, da smo v nadalnjih poskusih (SDS-PAGE, encimska kinetika) pripravili vzorce z enako količino proteinov. Uporabili smo metodo DC™ proizvajalca Bio-Rad, ki spada med kolorimetrične metode.

Celične lizate smo najprej odtalili na ledu, jih premešali in pripravili ustrezne redčitve v lizirnem pufru. Kot standard smo uporabili BSA (goveji serumski albumin) v koncentracijah 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL in 1,5 mg/mL, slepo raztopino pa je predstavljal lizirni pufer. Reagent A' smo pripravili tako, da smo 1 mL reagenta A dodali 20 µL reagenta S.

Za meritev smo uporabili prozorno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami. V posamezne vdolbine smo napijetirali 5 µL vzorca (slepa raztopina, standardna raztopina ali raztopina celičnega lizata; pri slepi smo imeli štiri paralele, pri ostalih pa dve). Nato smo v vse vdolbine z vzorci z enokanalno avtomatsko pipeto napijetirali 25 µL reagenta A', s pomočjo multikanalne avtomatske pipete pa še 200 µL reagenta B. Vzorce smo pri sobni temperaturi inkubirali 15 minut in s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire™ izmerili absorbanco pri 750 nm. Na podlagi dobljenih vrednosti absorbance pri standardnih raztopinah smo izdelali

umeritveno krivuljo, s pomočjo katere smo z upoštevanjem redčitev izračunali celokupno koncentracijo proteinov v celičnih lizatih.

3.2.3 Encimska kinetika

Aktivnost cisteinskih peptidaz smo spremljali preko encimske reakcije, v kateri se je porabljal peptidni fluorogeni substrat, ki v svoji strukturi vsebuje AMC (7-amido-4-metilkumarin). Ko encim cepi substrat, se AMC sprosti in za razliko od nerazgrajenega substrata močno fluorescira. Fluorescenco, izraženo v RFU (povprečne enote relativne fluorescence), smo izmerili s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan SafireTM. Vse meritve so potekale pri 37 °C.

3.2.3.1 Določanje koncentracije aktivnega cistatina C in kokošjega cistatina

Želeli smo določiti delež aktivnega cistatina C in kokošjega cistatina, ki smo ju uporabili za tretiranje celic PC-3, zato smo izvedli metodo titracije s testnim encimom papainom. Poskus je potekal v večih korakih:

a) Določanje ustrezne koncentracije papaina in substrata Z-FR-AMC

Najprej smo morali določiti optimalni koncentraciji papaina in fluorogenega substrata Z-FR-AMC, pri katerih smo dosegli linearno zvezo med izmerjeno fluorescenco po pretvorbi substrata (izraženo v RFU) in časom (izražen v sekundah).

Za negativno kontrolo smo uporabili aktivacijski pufer za katepsin S, ki smo ga v vodni kopeli segreli na 37 °C. Pripravili smo dve raztopini papaina v aktivacijskem pufru (0,5 nM in 1,5 nM). 115 µL aktivacijskega pufra in raztopine papaina smo nanesli na prozorno mikrotitrsko ploščo in jo pet minut inkubirali pri 37 °C. Tik pred meritvijo smo pripravili še 100 µM in 200 µM raztopino substrata, ki smo ga nanesli na črno mikrotitrsko ploščo (v vsako vdolbinico 5 µL). 95 µL aktivacijskega pufra oziroma raztopine papaina smo s pomočjo ročne večkanalne pipete prenesli iz prozorne plošče k substratu tik pred meritvijo (končna koncentracija substrata je bila tako 5 µM oziroma 10 µM). Postavitev vzorcev na črni mikrotitrski plošči je prikazana v preglednici 4.

Najoptimalnejši odgovor smo dobili pri kombinaciji 1,5 nM papaina in 10 µM substrata Z-FR-AMC, zato smo to kombinacijo uporabljali tudi v nadaljnji poskusih.

Preglednica 4: Postavitev reagentov na črni mikrotitrski plošči pri določevanju ustreznih koncentracij papaina in substrata Z-FR-AMC.

	1. in 2. stolpec	3. in 4. stolpec
A SLEPA KONTROLA	aktivacijski pufer + 5 μ M Z-FR-AMC	aktivacijski pufer + 10 μ M Z-FR-AMC
B VZOREC	0,5 nM papain + 5 μ M Z-FR-AMC	0,5 nM papain + 10 μ M Z-FR-AMC
C SLEPA KONTROLA	aktivacijski pufer + 5 μ M Z-FR-AMC	aktivacijski pufer + 10 μ M Z-FR-AMC
D VZOREC	1,5 nM papain + 5 μ M Z-FR-AMC	1,5 nM papain + 10 μ M Z-FR-AMC

b) Določanje koncentracije aktivnega papaina s titracijo z ireverzibilnim zaviralcem cisteinskih peptidov E-64

Drugi korak je bila določitev koncentracije aktivnega papaina. Določili smo jo s titracijo papaina z nizkomolekularnim ireverzibilnim zaviralcem cisteinskih peptidov E-64 (molarno razmerje med papainom in zaviralcem je 1 : 1). Pripravili smo 7 raztopin zaviralca E-64 v DMSO (20 nM, 12 nM, 8 nM, 4 nM, 2 nM in 1 nM) in 1,5 nM raztopino papaina v aktivacijskem pufru za katepsin S, ki smo jo pred uporabo 5 minut inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C. Na prozorno mikrotitrsko ploščo smo v prvo vdolbinico odpipetirali 108 μ L aktivacijskega pufra ter 6 μ L DMSO (slepa kontrola), v drugo vdolbinico 108 μ L 1,5 nM papaina in 6 μ L DMSO (100-% aktivnost papaina), od 3. do 8. vdolbinice pa smo nanesli 108 μ L 1,5 nM papaina in 6 μ L spojine E-64 z ustrezno koncentracijo. Delali smo v paralelkah. Raztopine smo pri 37 °C inkubirali 45 minut. Tukaj pred meritvijo smo pripravili še 200 μ M raztopino fluorogenega substrata Z-FR-AMC, ki smo ga nanesli na črno mikrotitrsko ploščo (v vsako vdolbinico 5 μ L). S pomočjo ročne večkanalne pipete smo 95 μ L raztopin iz prozorne plošče prenesli k substratu, končna koncentracija substrata je bila tako 10 μ M, končna koncentracija E-64 pa 1,0 nM, 0,6 nM, 0,4 nM, 0,2 nM, 0,1 nM in 0,05 nM.

Aktivno koncentracijo papaina smo določili na podlagi linearne funkcije, pri kateri je odvisna spremenljivka naklon premice, ki ponazarja vrednost fluorescence v odvisnosti od časa (izražen v RFU/s), neodvisna spremenljivka pa koncentracija E-64 (izražena v nmol/L). Pri tem smo upoštevali stehiometrično razmerje med zaviralcem in encimom 1 : 1. Ugotovili smo, da je delež aktivne koncentracije papaina 75-%, zato smo v nadalnjih poskusih uporabili 2 nM raztopino papaina, da smo dosegli 1,5 nM koncentracijo aktivnega encima.

c) **Določanje koncentracije aktivnega cistatina C in kokošjega cistatina s titracijo s papainom**

Na podlagi rezultatov iz prvih dveh poskusov smo lahko določili delež aktivnega cistatina C in kokošjega cistatina. Princip določitve je bil popolnoma enak kot pri titraciji, opisani pod točko b), le da smo namesto 1,5 nM pripravili 2 nM raztopino papaina, namesto zaviralca E-64 pa smo uporabili cistatin C oziroma kokošji cistatin. Najprej smo pripravili raztopine cistatinov z enakimi končnimi koncentracijami kot pri poskusu z E-64 (1,0 nM, 0,6 nM, 0,4 nM, 0,2 nM, 0,1 nM in 0,05 nM), a do zaviralnega učinka ni prišlo, zato smo pripravili raztopine z višjimi koncentracijami. Pri cistatinu C smo linearno zvezo med naklonom premice (izražen v RFU/s) in koncentracijo cistatina C (izražena v nmol/L) dosegli pri naslednjih koncentracijah: 7,5 nM, 7,0 nM, 6,4 nM, 6,0 nM, 5,5 nM in 5,0 nM. Pri kokošjem cistatinu pa smo linearno zvezo med naklonom premice (izražen v RFU/s) in koncentracijo kokošjega cistatina (izražena v nmol/L) dosegli pri nekoliko višjih koncentracijah: 300 nM, 275 nM, 250 nM, 225 nM, 200 nM in 175 nM.

3.2.3.2 Meritev aktivnosti katepsinov B, L in S v celičnih lizatih

a) **Meritev aktivnosti katepsina B**

Najprej smo celične lizate odtalili na ledu in aktivacijski pufer za endopeptidazno aktivnost katepsina B (pH=6,0) segreli na 37 °C v vodni kopeli. Slednjega smo uporabili kot slepo raztopino in za pripravo raztopin celičnih lizatov s koncentracijo celokupnih proteinov 0,2 mg/mL. Po pripravi vzorcev smo na prozorno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami odpipetirali po 215 µL posamezne raztopine in 5 minut inkubirali na 37 °C. V tem času smo 100 µM raztopino substrata Z-RR-AMC (Z-Arg-Arg-7-amido-4-metilkumarin), ki smo jo pripravili v osnovnem pufru za endopeptidazno aktivnost katepsina B, napipetirali na črno mikrotitrsko ploščo (v vsako vdolbinico smo nanesli 5 µL). Tik pred meritvijo smo z ročno večkanalno pipeto prenesli 95 µL vzorcev iz prozorne plošče na črno ploščo (končna koncentracija Z-RR-AMC je bila 5 µM). To smo naredili dvakrat, da smo za vsak vzorec imeli 2 paralelni meritvi. Nato smo ploščo čim hitreje položili v čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Safire™ in 30 minut merili porast fluorescence.

b) **Meritev aktivnosti katepsina S**

Meritev aktivnosti katepsina S smo izvedli na popolnoma enak način kot pri katepsinu B, le da smo uporabili substrat Z-VVR-AMC (Z-Val-Val-Arg-7-amido-4-metilkumarin), ki ga v glavnem razgraje katepsin S, deloma pa tudi katepsin L. 10 µM raztopino Z-VVR-AMC

smo pripravili v osnovnem pufru za katepsin S (končna koncentracija substrata na črni mikrotitrski plošči je bila 0,5 μ M), za pripravo raztopin celičnih lizatov s koncentracijo celokupnih proteinov 0,2 mg/mL pa smo uporabili aktivacijski pufer za katepsin S.

c) **Meritev aktivnosti katepsina L**

Za merjenje aktivnosti katepsina L smo uporabili popolnoma enako metodo kot pri katepsinu B in S, le da smo nanesli substrat Z-FR-AMC (Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilkumarin), ki ga v glavnem razgrajuje katepsin L, deloma pa tudi katepsin B. Za pripravo 20 μ M raztopine Z-FR-AMC smo uporabili osnovni pufer za katepsin L (končna koncentracija substrata na črni mikrotitrski plošči je bila 1 μ M), raztopine celičnih lizatov s koncentracijo celokupnih proteinov 0,5 mg/mL pa smo pripravili z aktivacijskim pufrom za katepsin L.

3.2.4 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE)

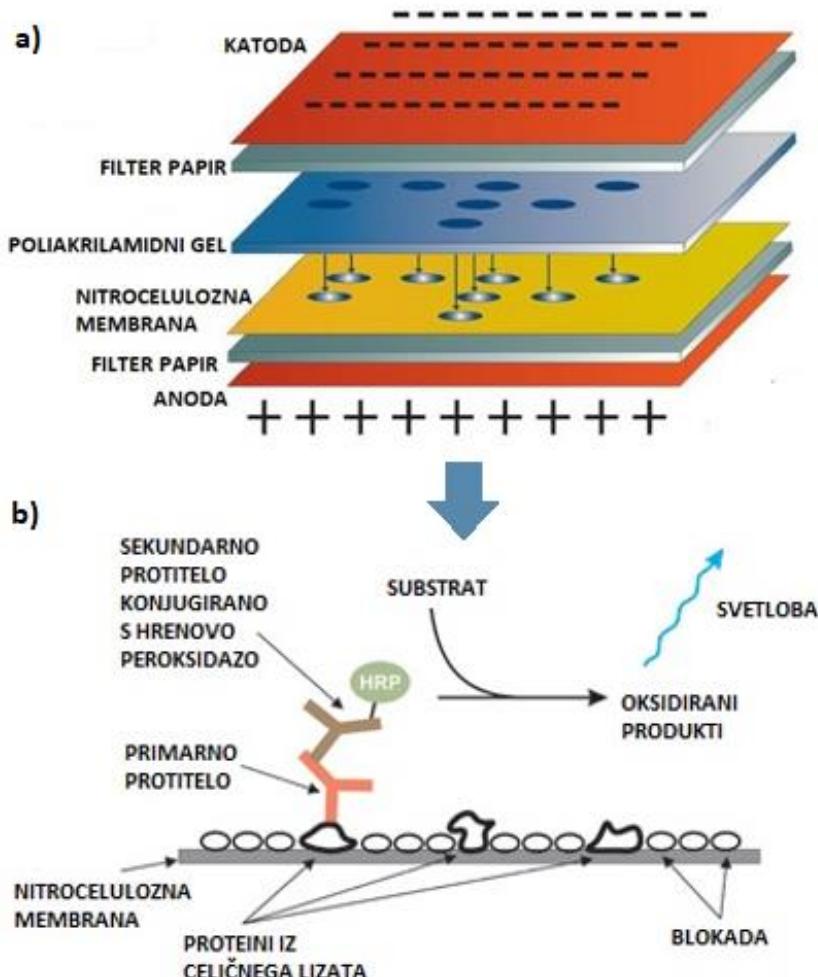
SDS-PAGE je ločevalna metoda, pri kateri ločevanje molekul poteka samo na osnovi njihove molekulske mase, saj imajo vsi proteini zaradi nespecifične vezave natrijevega dodecilsulfata enako razmerje med nabojem in dolžino verige, s tem pa tudi enako elektroforezno mobilnost. Osnovna komponenta poliakrilamidnega gela so monomeri akrilamida, ki polimerizirajo v dolge verige, prečno povezane z N,N'-metilenbisakrilamidom. Polimerizacija steče v prisotnosti prostih radikalov, katerih vir je običajno amonijev persulfat, stabilizira pa jih TEMED [53].

Za izvedbo SDS-PAGE smo najprej pripravili zmes za spodnji ločevalni gel (receptura je v poglavju 3.1.5) in jo vlili med dve stekleni plošči, vpeti v stojalo (razdalja med njima je bila 1,5 mm). Mešanico smo prekrili s približno 300 μ L izopropanola, da ni bila v stiku z zrakom, saj bi to preprečilo premreževanje. Po 45 minutah smo izopropanol odstranili, pripravili zmes za zgornji koncentracijski gel (receptura je v poglavju 3.1.5), jo vlili na vrh separacijskega gela ter vstavili glavniček za oblikovanje žepkov. Po 45 minutah smo plošči z gelom vpeli v kadičko, v katero smo nalili pufer za SDS-PAGE. Pred nanosom vzorcev smo glavniček odstranili in žepke nekajkrat sprali s pomočjo polavtomatske pipete. Vzorce smo pripravili tako, da smo celične lizate najprej odtalili na ledu in v sveže mikrocentrifugirke prenesli volumen lizata, ki je vseboval 50 μ g proteinov. Temu smo dodali 5 μ L nanašalnega pufra in dopolnili z lizirnim pufrom, tako da je končni volumen vzorcev znašal 30 μ L. Mikrocentrifugirke z vzorci smo 8 minut kuhalili v vreli vodi in s tem povzročili denaturacijo proteinov. S polavtomatsko pipeto smo celoten volumen vzorcev nanesli v

žepke v gelu. V enega od žepkov smo nanesli še označevalec velikosti. Elektroforeza je potekala približno 2 uri pri konstantni napetosti 100 voltov.

3.2.5 Imunokemijska detekcija NF- κ B ter I κ B- α s prenosom western

NF- κ B in I κ B- α smo želeli detektirati z imunološko metodo, ki temelji na specifičnih interakcijah med želeno proteinsko molekulo in monoklonskimi protitelesi. Ker imajo protitelesa visoko molekulsko maso, težko prodrejo v poliakrilamidni gel, zato je potrebno proteine iz gela prenesti na nitrocelulozno membrano, kjer so veliko bolj dostopni za vezavo. Proteine smo ločili s SDS-PAGE in jih prenesli iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno membrano s pomočjo aparature iBlot®. Prenos je potekal 7 minut pri konstantni električni napetosti 20 V (prenos proteinov na nitrocelulozno membrano in detekcija specifičnega proteina s protitelesi sta prikazana na sliki 4).



Slika 4: Shematski prikaz prenosa western: a) prenos na membrano in b) detekcija s protitelesi [54, 55]

3.2.5.1 Detekcija fosforilirane oblike IκB-α in celokupnega IκB-α

Po končanem prenosu smo nitrocelulozno membrano 1 uro inkubirali v blokirnem sredstvu¹ (5-% BSA v TTBS), s čimer smo preprečili nespecifično vezavo protiteles na nezasedene predele membrane. Raztopino BSA smo zavrgli in membrano 3-krat po 5 minut spirali s TTBS². TTBS smo odlili in dodali raztopino primarnih zajčjih protiteles proti fosforilirani obliki IκB-α (redčili smo jih v 5-% BSA v TTBS v razmerju 1 : 2500). Inkubacija je potekala čez noč na stresalniku pri 4–8 °C. Naslednji dan smo raztopino primarnih protiteles odstranili in membrano 3-krat po 10–15 minut spirali s TTBS. Nato smo sekundarna protitelesa (kozja protitelesa proti primarnim zajčjim protitelesom s konjugirano hrenovo peroksidazo) razredčili v 5-% BSA v TTBS v razmerju 1 : 4500. Membrano smo stresali 1 uro pri sobni temperaturi in nato raztopino sekundarnih protiteles zavrgli. Sledilo je 5-minutno spiranje s TTBS, ki smo ga izvedli 3-krat. Membrano smo nato položili med dva prozorna plastična sloja in jo izpostavili mešanici pufra in visoko občutljivega kemiluminiscenčnega substrata v razmerju 1 : 1 (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate in SuperSignal™ West Femto Luminol/Enhancer Solution). Oddano svetlobo po pretvorbi substrata smo detektirali z napravo G-box. Po detekciji smo membrano 20 minut spirali s TTBS, nato pa smo jo 1 uro stresali v pufru za odstranjevanje vezanih protiteles pri 60 °C. Zopet je sledilo spiranje s TTBS (2x po 20 minut), nato pa 30-minutna blokada s 5-% BSA v TTBS. Po trikratnem 5-minutnem spiranju s TTBS smo na membrano nanesli zajčja protitelesa proti IκB-α, redčena v 5-% BSA v TTBS v razmerju 1 : 2500. Membrano smo v raztopini čez noč inkubirali na stresalniku pri 4–8 °C in naslednji dan nadaljevali po istem postopku kot pri zgoraj opisani detekciji fosforilirane oblike IκB-α.

Da bi ovrednotili enakomernost nanosa proteinov na membrano, smo po odstranjevanju protiteles, ponovni 30-minutni blokadi s 5-% BSA v TTBS in spiranju s TTBS (3-krat po 5 minut) na blokirano membrano nanesli zajčja protitelesa proti β-aktinu redčena v 5-% BSA v TTBS v razmerju 1 : 3000. Inkubacija je potekala 1 uro na stresalniku pri sobni temperaturi. Nato smo nadaljevali po istem postopku kot pri detekciji (ne)fosforilirane oblike IκB-α, le da smo membrano izpostavili drugemu kemiluminiscenčnemu substratu (SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate raztopljen v pufru SuperSignal™ West Dura Luminol/Enhancer Solution v razmerju 1 : 1), ki ima manjšo občutljivost, saj je koncentracija

¹ Inkubiranje membrane v raztopini blokirnih sredstev je vedno potekalo na stresalniku pri sobni temperaturi.

² Vsa spiranja membrane s TTBS so potekala na stresalniku pri sobni temperaturi.

Nika Pahor, Magistrsko delo

Vpliv zaviralcev cisteinskih peptidov na aktivacijo signalne poti NF- κ B v celicah PC-3

β -aktina v celičnih lizatih veliko višja kot koncentracija I κ B- α . Oddano svetlobo po pretvorbi substrata smo detektirali z napravo G-box. Po snemanju smo membrano zavrgli.

Detektirane lise smo kvantificirali z denzitometrično analizo v programu GeneSnap proizvajalca Syngene in jih normalizirali glede na kontrolni vzorec pri času t₀.

3.2.5.2 Detekcija NF- κ B v citosolni in jedrni frakciji

Detekcija NF- κ B je potekala po podobnem postopku kot detekcija I κ B- α , le da smo ločene proteine iz citosolne in jedrne frakcije prenesli na dve različni nitrocelulozni membrani.

Preglednica 5: Uporabljena blokirna sredstva in protitelesa pri detekciji NF-κB, β-aktina in PCNA.

	CITOSOLNA FRAKCIJA	JEDRNA FRAKCIJA
DETEKCIJA NF-κB	5-% mleko v TTBS mišja protitelesa proti NF-κB (v 3-% BSA v TTBS; razmerje 1 : 182) kozja protitelesa proti mišjim protitelesom s konjugirano hrenovo peroksidazo (v 5-% mleku v TTBS; razmerje 1 : 4500)	
DETEKCIJA β-AKTINA oz. PCNA	5-% mleko v TTBS zajčja protitelesa proti β-aktinu (v 5-% mleku v TTBS; razmerje 1 : 3000) kozja protitelesa proti zajčjim protitelesom s konjugirano hrenovo peroksidazo (v 5-% mleku v TTBS; razmerje 1 : 4500)	3-% BSA v TTBS zajčja protitelesa proti PCNA (v 3-% BSA v TTBS; razmerje 1 : 250) kozja protitelesa proti zajčjim protitelesom s konjugirano hrenovo peroksidazo (v 3-% BSA v TTBS; razmerje 1 : 4500)

3.2.6 Konfokalna mikroskopija

Konfokalno mikroskopijo smo uporabili za detekcijo NF-κB v jedru in citoplazmi celic PC-3 v kontrolnih vzorcih in v vzorcih s kokošnjim cistatinom. Z metodo smo želeli dodatno potrditi vpliv najučinkovitejšega zaviralca na signalno pot NF-κB. Protitelesa proti NF-κB so bila označena z barvilm Alexa Fluor 488, ki oddaja zeleno svetlobo, zato smo vzorce osvetlili z vzbujevalnim laserjem valovne dolžine 488 nm.

3.2.6.1 Priprava preparatov za konfokalno mikroskopijo

Najprej smo v ploščo s 24 vdolbinicami, v katere smo položili krovna stekelca, nacepili 1 mL celic PC-3 v dveh različnih koncentracijah (9×10^2 in $1,5 \times 10^3$ celic/mL). Pri vsaki koncentraciji smo imeli eno kontrolo in en vzorec z zavircem pri času t_0 (2-urna inkubacija celic v gojišču z 1 μM zavircem ali PBS) ter eno kontrolo in en vzorec z zavircem pri času 30 minut (2-urna inkubacija celic v gojišču z 1 μM zavircem ali PBS, ki ji je sledila 30-minutna inkubacija celic v gojišču z 1 μM zavircem ali PBS ter 20 ng/mL TNF-α). Po 3 dneh smo preverili gostoto celic na krovnih stekelcih in se odločili, da bomo preparate pripravili iz vzorcev s koncentracijo $1,5 \times 10^3$ celic/mL.

Priprava preparatov je potekala izven sterilne komore pri sobni temperaturi. Najprej smo zavrgli gojišče in celice sprali z 1 mL PBS, nato pa jih fiksirali z 10-% formalinom. Po 30 minutah smo formalin zavrgli in celice zopet sprali z 1 mL PBS. Po spiranju smo jih 10 minut inkubirali v 0,5 mL 0,1%-raztopine Tritona X-100 v PBS, s čimer smo dosegli permeabilizacijo celic, ki je potrebna za prehod protiteles prek membrane. Po ponovnem spiranju celic s PBS smo izvedli blokado z 0,5 mL 3%-BSA v PBS. Po eni uri smo blokirno sredstvo odstranili in dodali 200 μ L raztopine mišjih monoklonskih protiteles proti NF- κ B (p65), označenih z barvilom Alexa Fluor 488. Raztopina protiteles s koncentracijo 1 μ g/mL je bila pripravljena v 3%-BSA v PBS. Celice smo zaščitene pred svetlobo inkubirali 1,5 ure. Po odstranitvi protiteles smo dodali 1 mL PBS in ga v roku 5 minut 3-krat zamenjali s svežim, da smo celice dobro sprali. Krovna stekelca smo iz vdolbinic prenesli na filter papir in jih posušili na zraku. Za vsako krovno stekelce smo pripravili eno objektno steklo in nanj nanesli kapljico medija proti bledenju z DNA-specifičnim barvilom DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), ki ga uporabljamo za označevanje jeder. Nato smo posušena krovna stekelca s stranjo, poraslo s celicami, položili na kapljico in odstranili vse zračne mehurčke. Preparate smo pokrili z aluminijasto folijo in jih čez noč hrаниli pri 4–8 °C. Naslednji dan smo robove krovnih stekelc polakirali z lakom za nohte, da se preparati ne bi posušili. Do mikroskopiranja smo jih zaščitili pred svetlobo in hrаниli pri 4–8 °C.

3.2.7 Statistična obdelava podatkov

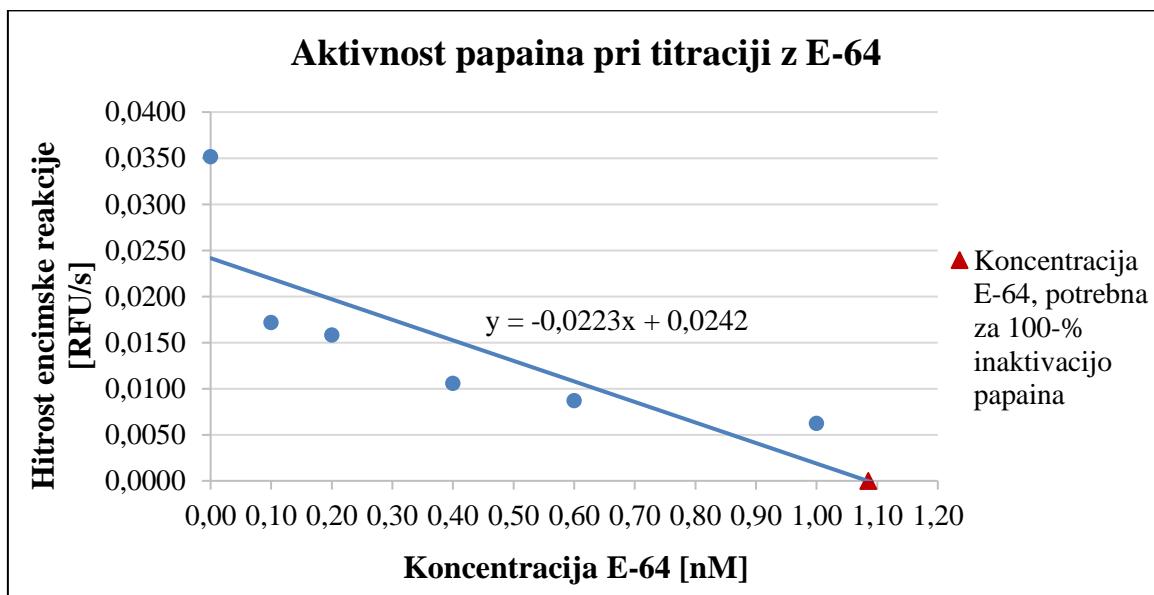
Statistično obdelavo podatkov smo izvedli v programu Microsoft Excel 2016. Pri izračunu koncentracije celokupnih proteinov v lizatih (izdelava umeritvene krivulje) in določitvi koncentracije aktivnega cistatina C in kokošjega cistatina smo uporabili metodo linearne regresije ter končne vrednosti izračunali iz enačbe $y = kx + n$.

Pri merjenju aktivnosti katepsinov B, L in S smo uporabili dvostranski (angl. two-tailed) t-test, s katerim smo preverili, ali se izmerjena aktivnost katepsinov v celičnih lizatih z zaviralci statistično razlikuje od aktivnosti encimov, ki smo jo izmerili v kontrolnih vzorcih. Razlika med vzorci je bila statistično pomembna, če je bila stopnja značilnosti (α) manjša od 0,05.

4 REZULTATI

4.1 Določanje koncentracije aktivnega cistatina C in kokošjega cistatina

Najprej smo določili aktivno koncentracijo testnega encima papaina s titracijo s sintetičnim zavircem E-64. Rezultati meritev so predstavljeni na sliki 5.



Slika 5: Graf aktivnosti papaina ob dodatku naraščajočih koncentracij zavirala E-64.

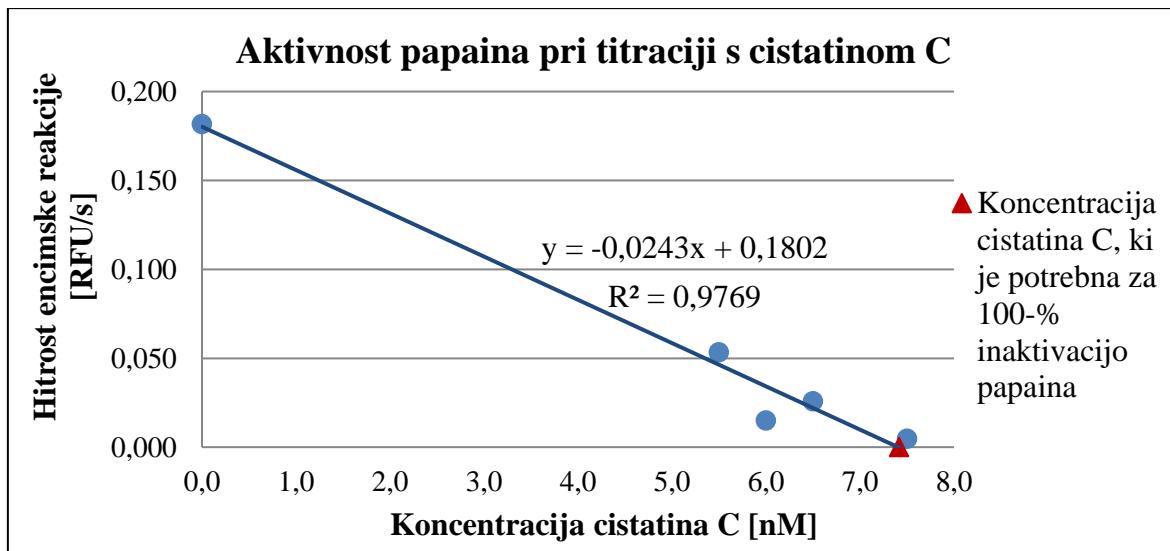
Iz enačbe $y = -0,0223x + 0,0242$ smo izračunali vrednost koncentracije E-64, pri kateri je hitrost encimske reakcije enaka 0 (100%-inaktivacija papaina). Upoštevali smo, da je stehiometrijsko razmerje med encimom in zavircem 1 : 1 in tako izračunali delež aktivnega papaina.

Koncentracija E-64, ki je potrebna za 100%-inaktivacijo papaina: 1,09 nM.

Koncentracija celokupnega papaina (aktivnega in neaktivnega): 1,5 nM.

Delež aktivnega papaina v odstotkih: $(1,09 \text{ nM} / 1,5 \text{nM}) * 100 \% = 72,7 \% \approx 75 \%$.

Sledilo je določanje aktivne koncentracije cistatina C in kokošjega cistatina, pri čemer smo upoštevali delež aktivnega papaina. Dobljene vrednosti so prikazane na slikah 6 in 7.



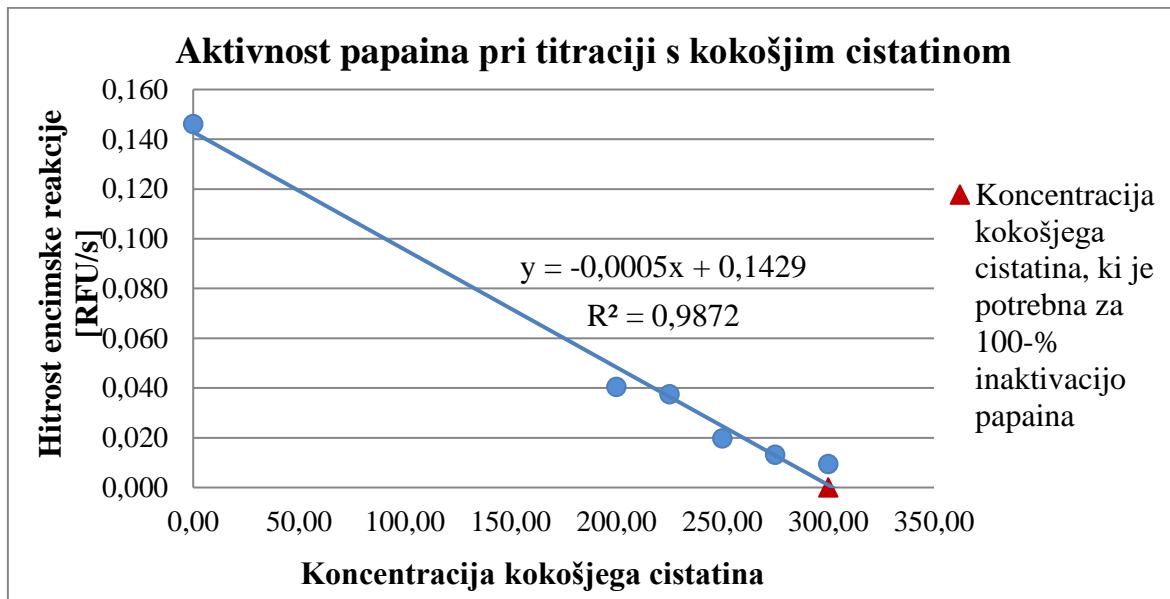
Slika 6: Graf aktivnosti papaina ob dodatku naraščajočih koncentracij cistatina C.

Iz enačbe $y = -0,0243x + 0,1802$ smo izračunali koncentracijo cistatina C, pri kateri pride do 100-% inaktivacije papaina. Tudi tu smo upoštevali stehiometrijsko razmerje 1 : 1 in tako izračunali delež aktivnega cistatina C.

Koncentracija cistatina C, ki je potrebna za 100-% inaktivacijo 1,5 nM papaina: 7,42 nM.

Koncentracija aktivnega papaina: 1,5 nM.

Delež aktivnega cistatina C v odstotkih: $(1,5 \text{ nM} / 7,42 \text{ nM}) * 100 \% = 20,2 \%$.



Slika 7: Graf aktivnosti papaina ob dodatku naraščajočih koncentracij kokošnjega cistatina.

Delež aktivnega kokošnjega cistatina smo določili po enakem postopku kot pri cistatini C.

Koncentracija kokošjega cistatina, ki je potrebna za 100%-inaktivacijo 1,5 nM papaina: 285,8 nM.

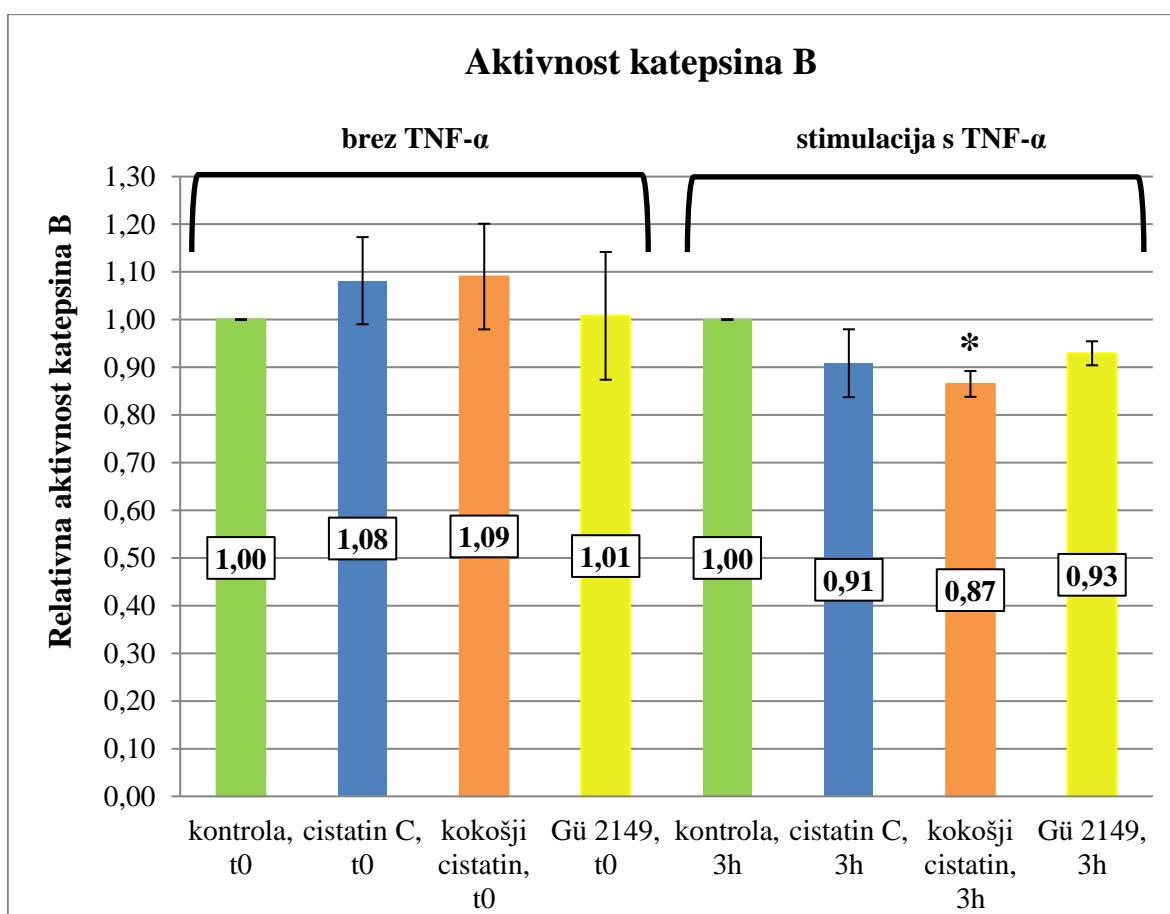
Koncentracija aktivnega papaina: 1,5 nM.

Delež aktivnega cistatina C v odstotkih: $(1,5 \text{ nM} / 285,8 \text{ nM}) * 100 \% = 0,5 \%$.

4.2 Določanje aktivnosti katepsina B v celičnih lizatih

Aktivnost katepsina B smo spremljali preko encimske reakcije, v kateri se je porabljal peptidni fluorogeni substrat Z-RR-AMC.

Iz grafa na sliki 8 je razvidno, da po 2-urni inkubaciji celic PC-3 v gojiščih z zaviralci ni prišlo do inhibicije katepsina B, temveč je bila aktivnost pri cistatinu C in kokošjem cistatinu celo nekoliko povečana glede na kontrolni vzorec (gojišče z DMSO). Po dodatni 3-urni inkubaciji celic PC-3 v gojiščih s kombinacijo zaviralcev in TNF- α smo dokazali statistično značilno delno inhibicijo le pri kokošjem cistatinu ($\alpha = 0,02$).



Slika 8: Graf aktivnosti katepsina B pri času t₀ in po 3 urah.

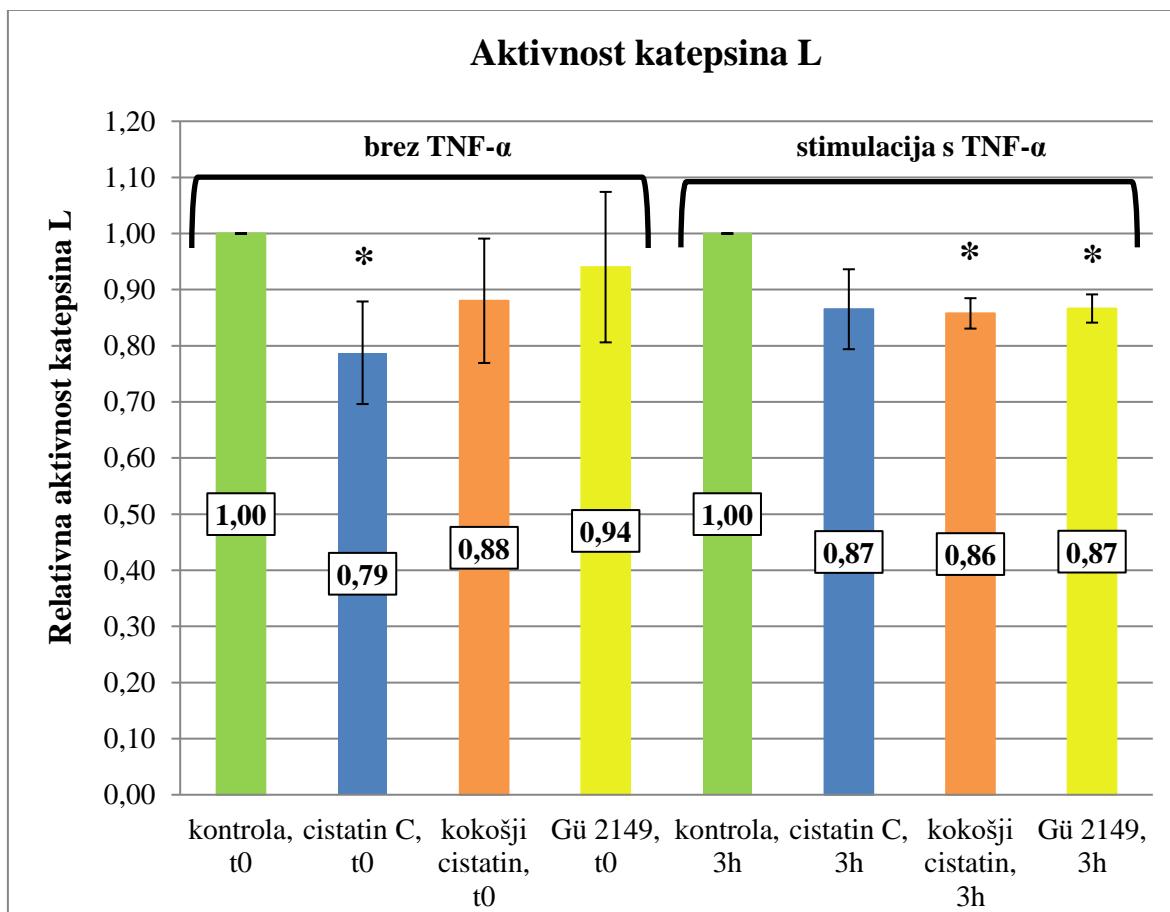
Predstavljeni so normalizirani rezultati glede na aktivnost katepsina B pri kontrolnem vzorcu v isti časovni točki. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne deviacije 4 ponovitev. Statistično značilna razlika v aktivnosti glede na kontrolni vzorec je na grafu označena z zvezdico.

4.3 Določanje aktivnosti katepsina L v celičnih lizatih

Aktivnost katepsina L smo spremljali preko encimske reakcije, v kateri se je porabljal peptidni fluorogeni substrat Z-FR-AMC.

Kot lahko razberemo iz grafa na sliki 9, je pri času t_0 prišlo do statistično značilne delne inhibicije katepsina L ($\alpha = 0,03$) le pri vzorcu s cistatinom C. Po dodatnih 3 urah inkubacije je bila povprečna vrednost aktivnosti pri vzorcu s cistatinom C in TNF- α sicer nižja kot pri kontroli v isti časovni točki, vendar razlika ni bila statistično značilna. Po 3 urah sta tako le kokošji cistatin ($\alpha = 0,002$) in Gü 2149 ($\alpha = 0,0003$) povzročila statistično značilno inhibicijo.

Pri tem pa je potrebno upoštevati, da substrata Z-FR-AMC ne razgrajuje le katepsin L, temveč deloma tudi katepsin B.



Slika 9: Graf aktivnosti katepsina L pri času t_0 in po 3 urah.

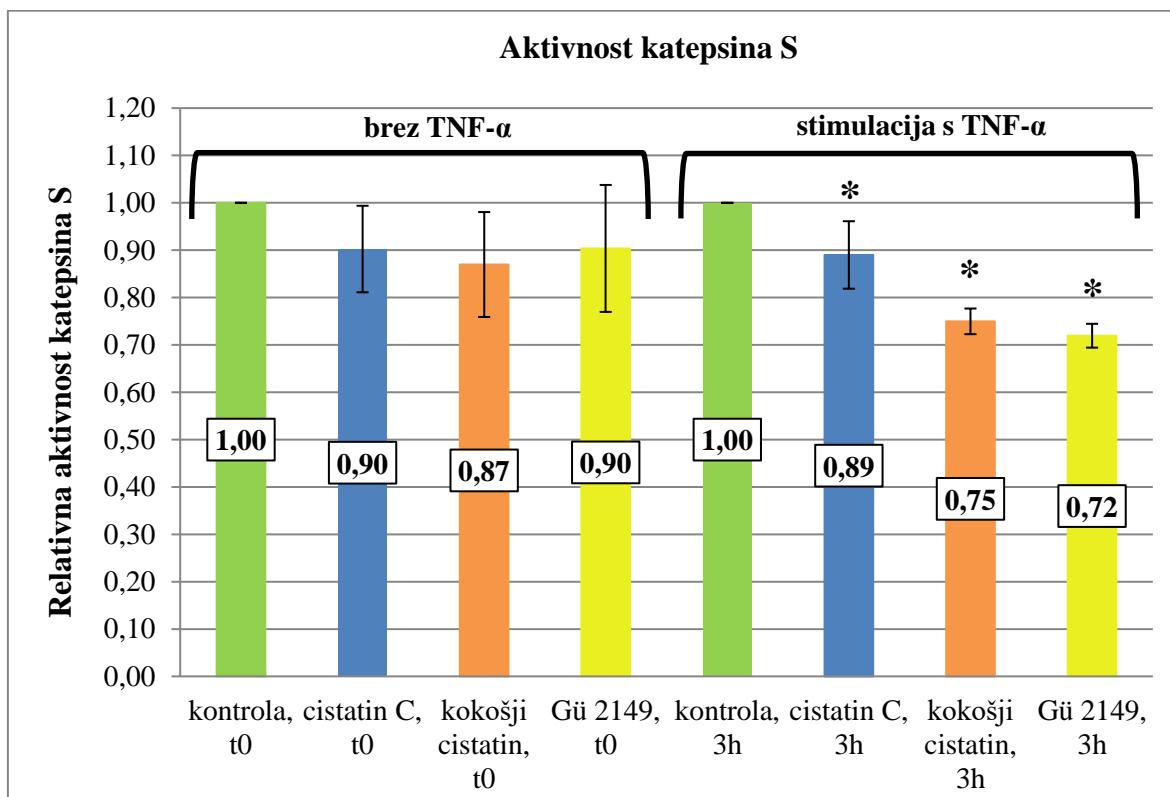
Predstavljeni so normalizirani rezultati glede na aktivnost katepsina L pri kontrolnem vzorcu v isti časovni točki. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne deviacije 3 ponovitev (pri prvih dveh poskusih je bilo v vzorcu 0,5 mg/mL proteinov, pri zadnji ponovitvi pa 0,4 mg/mL proteinov). Statistično značilna razlika v aktivnosti glede na kontrolni vzorec je na grafu označena z zvezdico.

4.4 Določanje aktivnosti katepsina S v celičnih lizatih

Aktivnost katepsina S smo spremljali preko encimske reakcije, v kateri se je porabljal peptidni fluorogeni substrat Z-VVR-AMC.

Rezultati, prikazani na sliki 10, kažejo, da aktivnost katepsina S pri testnih vzorcih ob času t_0 ni bila zmanjšana v primerjavi s kontrolo. Po dodatni 3-urni inkubaciji celic PC-3 v gojiščih z zaviralci in TNF- α pa je prišlo do statistično značilne inhibicije pri vseh testnih vzorcih glede na kontrolo v isti časovni točki (cistatin C: $\alpha = 0,04$; kokošji cistatin: $\alpha = 0,01$; Gü 2149: $\alpha = 0,0003$). Najučinkovitejši inhibitorni učinek je dosegel Gü 2149.

Pri interpretaciji rezultatov je potrebno upoštevati, da substrat Z-VVR-AMC deloma razgrajuje tudi katepsin L.



Slika 10: Graf aktivnosti katepsina S pri času t_0 in po 3 urah.

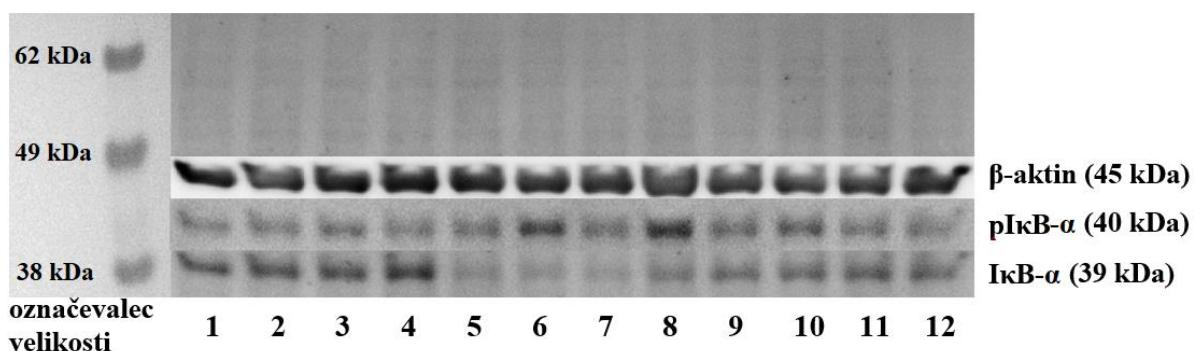
Predstavljeni so normalizirani rezultati glede na aktivnost katepsina S pri kontrolnem vzorcu v isti časovni točki. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne deviacije 3 ponovitev. Statistično značilna razlika v aktivnosti glede na kontrolni vzorec je na grafu označena z zvezdico.

4.5 Detekcija I κ B- α in NF- κ B v celičnih lizatih

Vpliv zaviralcev na aktivacijo signalne poti NF- κ B smo preverjali s prenosom western. Želeli smo ugotoviti, ali je prišlo do sprememb v količini fosforilirane oblike I κ B- α (pI κ B- α) in celokupne količine I κ B- α po 2-urni izpostavitvi celic PC-3 gojišču z zaviralci ter zaporedni 30-minutni oz. 3-urni inkubaciji v gojišču s kombinacijo zaviralcev in aktivatorjem signalne poti TNF- α . Preverili smo tudi, če se je pri enakih pogojih spremenila količina NF- κ B (p65) v jedru in citosolu.

Po detekciji pI κ B- α , I κ B- α in NF- κ B na nitrocelulozni membrani smo dobljene lise kvantificirali z denzitometrično analizo. Rezultate smo normalizirali glede na kontrolo ob času t₀. Pri končnih vrednostih pI κ B- α , I κ B- α in citosolnega NF- κ B smo upoštevali tudi rezultate β -aktina, ki je služil za oceno enakomernosti nanosa proteinov na membrano. Ekvivalent β -aktina pri jedrni frakciji celičnih lizatov je bil protein PCNA.

4.5.1 Detekcija fosforilirane oblike I κ B- α in celokupne količine I κ B- α



Slika 11: Detekcija pI κ B- α in I κ B- α s specifičnimi protitelesi.

Na nitrocelulozni membrani smo določili tudi prisotnost proteina β -aktina, ki nam je služil za oceno enakomernosti nanosa proteinov (nanos je znašal 50 μ g). Intenziteta lis kaže, da so se vzorci malenkostno razlikovali v vsebnosti proteinov. Vzorci si sledijo v istem vrstnem redu kot na sliki 12.

→ Razmerje med pI κ B- α in I κ B- α (slika 12):

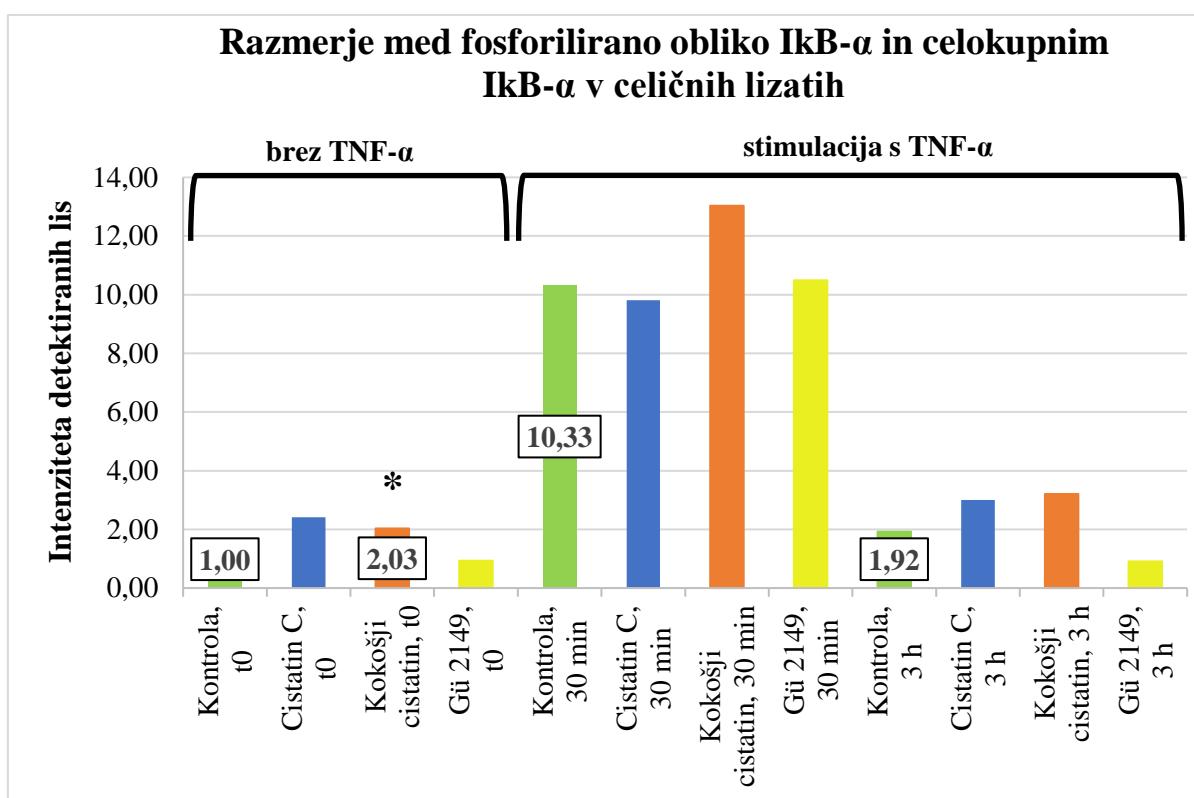
Rezultati po 2 urah inkubacije z zaviralci (čas t₀): pri vzorcu s kokošjim cistatinom je bilo razmerje približno 2-krat večje kot pri kontroli, pri cistatinu C in Gü 2149 pa rezultati niso bili ponovljivi.

Rezultati po 30-minutni inkubaciji z zaviralci in TNF- α : pri vseh vzorcih smo detektirali višje razmerje pI κ B- α /I κ B- α glede na kontrolo ob času t₀. V primerjavi z istimi vzorci ob času t₀ je bilo razmerje pri vseh poskusih višje le pri Gü 2149, pri cistatinu C in kokošjem cistatinu pa je bilo 1-krat nekoliko nižje, 2-krat pa močno povišano.

Zaradi neponovljivih rezultatov nismo uspeli dokazati razlike med vzorci in kontrolo pri 30 minutah.

Rezultati po 3-urni inkubaciji z zaviralci in TNF- α : pričakovali smo, da bodo razmerja med pI κ B- α in I κ B- α podobna kot pri času t₀, vendar zaradi neponovljivih rezultatov pri vzorcih tega ne moremo potrditi, pri 3-urni kontroli pa je bilo razmerje vedno višje glede na kontrolo ob času t₀.

Zaradi velike variabilnosti bioloških ponovitev nismo uspeli potrditi nobenih pomembnih razlik v razmerju med pI κ B- α in I κ B- α med 3-urnimi vzorci in kontrolo.



Slika 12: Razmerje med fosforilirano obliko I κ B- α in celokupnim I κ B- α v celičnih lizatih.
Predstavljene vrednosti, pridobljene iz 3 poskusov, so bile normalizirane glede na kontrolni vzorec pri času t₀. Ponovljivi rezultati glede na kontrolo v isti časovni točki so na grafu označeni z zvezdico.

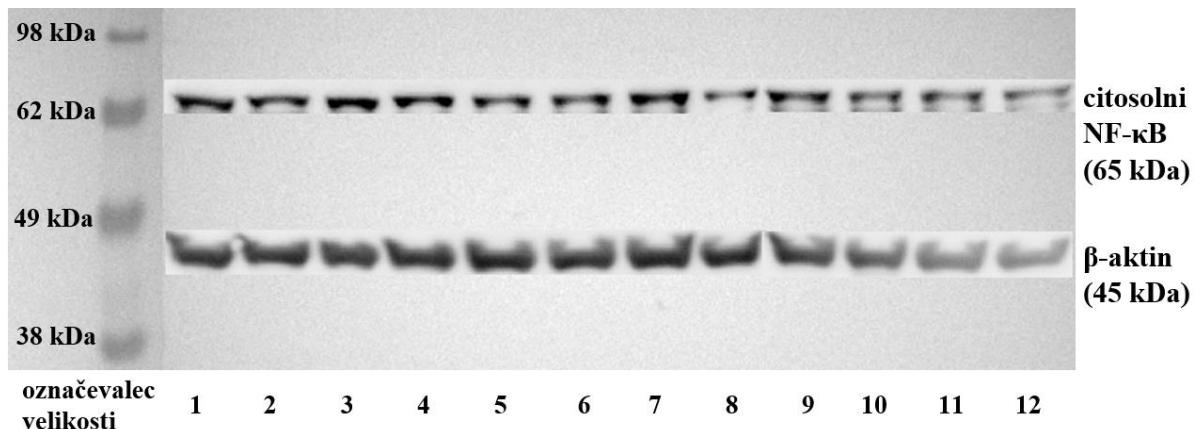
4.5.2 Detekcija NF- κ B v celičnih lizatih

→ Detekcija NF- κ B v citosolni frakciji (slika 13):

Rezultati po 2 urah inkubacije z zaviralci (čas t_0): zaradi precejšnje variabilnosti rezultatov nismo uspeli dokazati statistično značilnih razlik med vzorci in kontrolo.

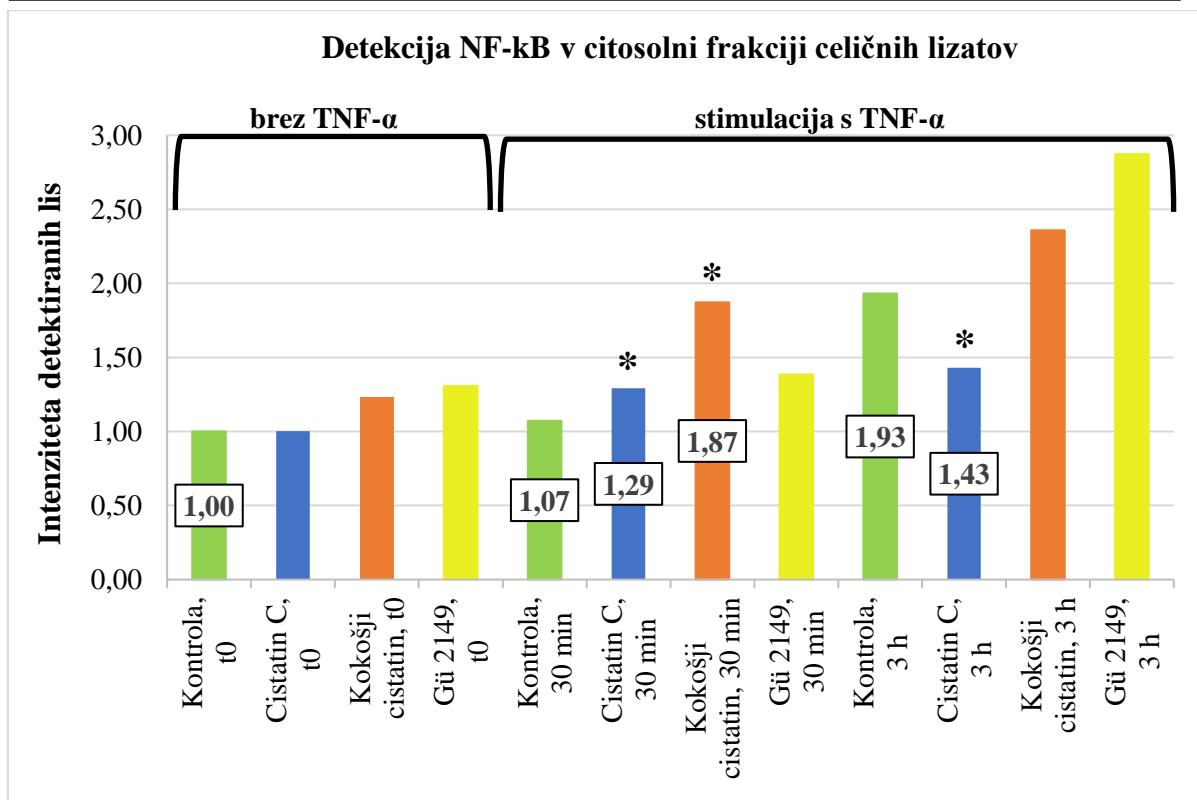
Rezultati po 30-minutni inkubaciji z zaviralci in TNF- α : ker smo celice tretirali s TNF- α , smo sklepali, da se bo pri kontrolnem vzorcu nivo NF- κ B v citosolu znižal zaradi prenosa transkripcijskega faktorja v jedro, vendar ni bilo vedno tako. Pri kontroli je bila prisotnost NF- κ B pri dveh poskusih sicer res nižja, pri enem pa celo dvakrat višja glede na ničelno kontrolo. V vzorcih s cistatinom C in kokošjim cistatinom smo vsakič detektirali večjo količino citosolnega NF- κ B v primerjavi s 30-minutno kontrolo. Pri vzorcu z Gü 2149 rezultati niso bili ponovljivi.

Rezultati po 3-urni inkubaciji z zaviralci in TNF- α : domnevali smo, da bo nivo citosolnega NF- κ B po 3 urah podoben kot ob času t_0 , vendar tega nismo uspeli potrditi. Dokazali smo le, da je bila pri cistatinu C količina NF- κ B v citosolni frakciji vedno nižja kot pri kontroli v isti časovni točki.



Slika 13: Detekcija citosolnega NF- κ B s specifičnimi protitelesi.

Na nitrocelulozni membrani smo detektirali tudi protein β -aktin, ki nam je služil za oceno enakomernosti nanosa proteinov (nanos je znašal 50 μ g). Intenziteta lis kaže, da je bila v prvih 9 vzorcih vsebnost proteinov podobna, zadnji trije vzorci pa so vsebovali manj proteinov. Vzorci si sledijo v istem vrstnem redu kot na sliki 14.

**Slika 14: Detekcija NF- κ B v citosolni frakciji celičnih lizatov.**

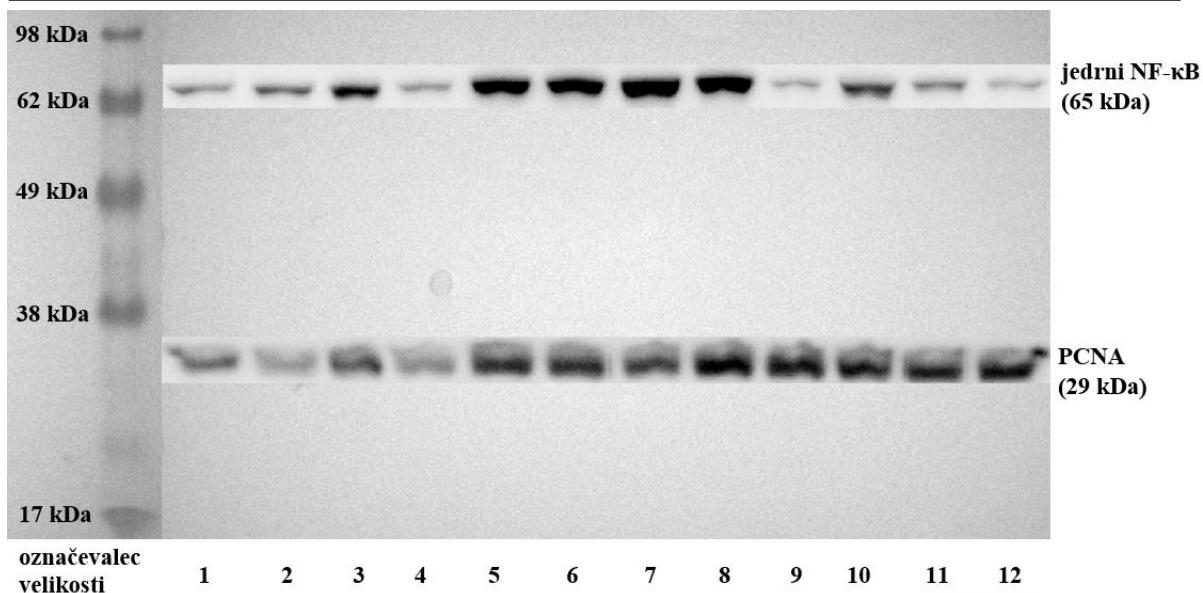
Predstavljene vrednosti, pridobljene iz 3 poskusov, so bile normalizirane glede na kontrolni vzorec pri času t₀. Ponovljivi rezultati glede na kontrolo v isti časovni točki so na grafu označeni z zvezdico.

→ **Detekcija NF- κ B v jedrni frakciji (slika 18):**

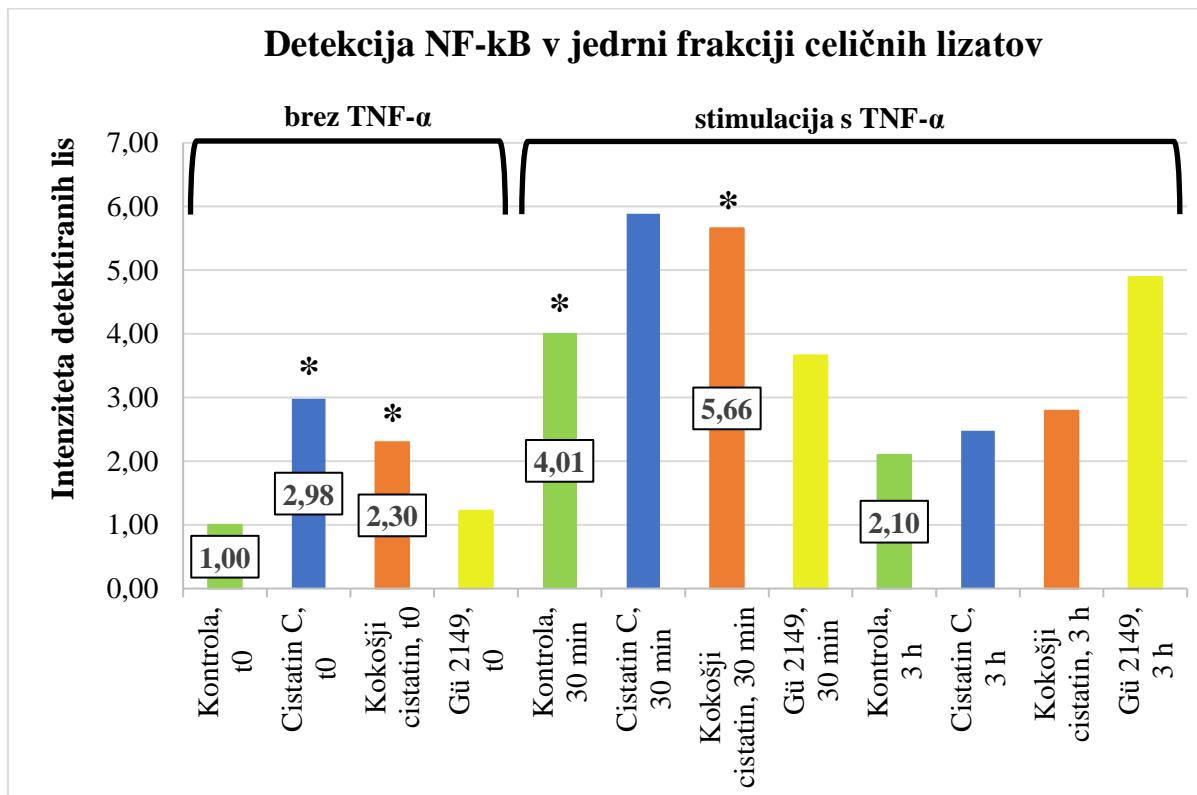
Rezultati po 2 urah inkubacije z zaviralci (čas t₀): vrednosti NF- κ B so bile pri cistatinu C in kokošjem cistatinu večje kot pri kontroli. Pri Gü 2149 nismo pridobili ponovljivih rezultatov.

Rezultati po 30-minutni inkubaciji z zaviralci in TNF- α : kot smo domnevali, se je v vseh vzorcih povišala količina jedrnega NF- κ B v primerjavi z ničelno kontrolo. Največji prenos NF- κ B v jedro smo zaznali pri vzorcu s kokošjim cistatinom (v povprečju za 40 % večji prenos kot pri 30-minutni kontroli). Zaradi neponovljivih rezultatov pri cistatinu C in Gü 2149 nismo uspeli dokazati razlike glede na kontrolo pri 30 minutah.

Rezultati po 3-urni inkubaciji z zaviralci in TNF- α : sklepali smo, da bo nivo jedrnega NF- κ B po 3 urah podoben kot pred stimulacijo s TNF- α , vendar tega nismo uspeli potrditi pri nobenem vzorcu.

**Slika 15:** Detekcija jedrnega NF- κ B s specifičnimi protitelesi.

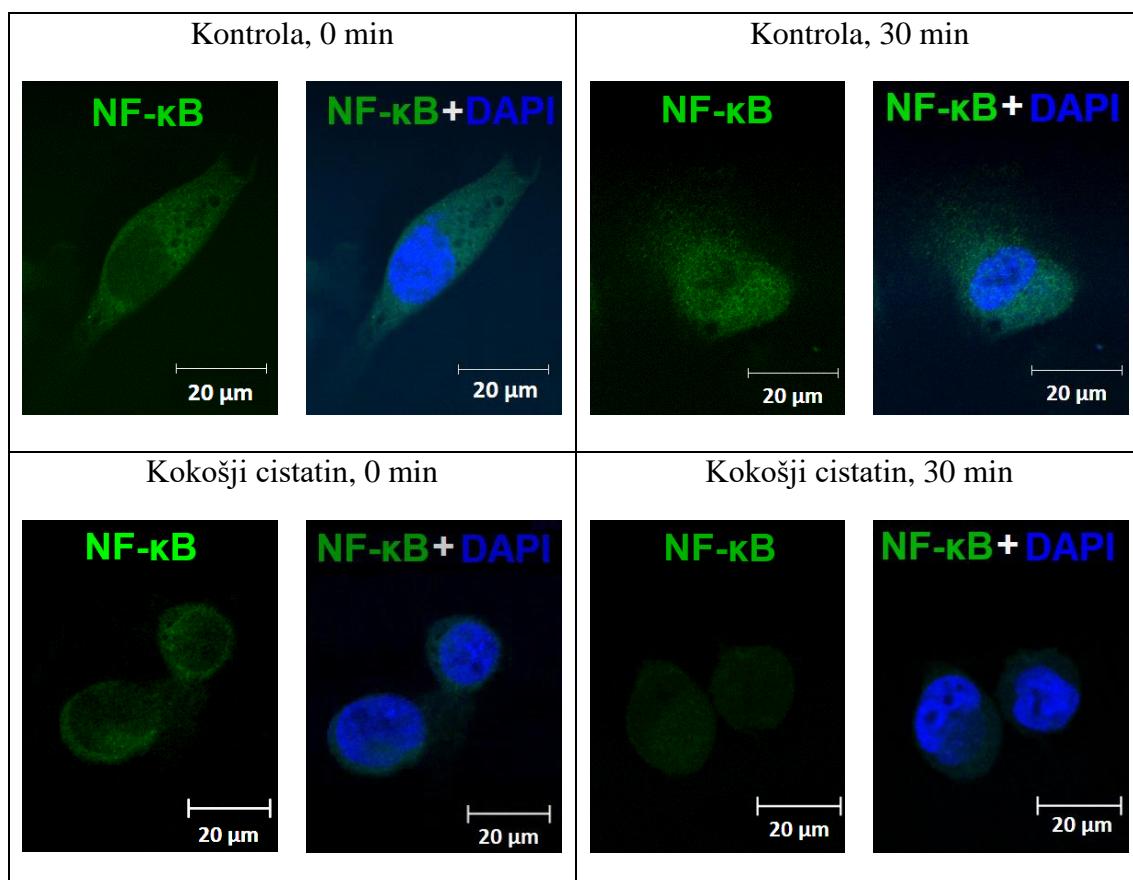
Na nitrocelulozni membrani smo določili še količino proteina PCNA, ki nam je služil za oceno enakomernosti nanosa proteinov (nanos je znašal 50 µg). Intenziteta lis kaže, da je bil nanos nekoliko neenakomeren. V prvih 4 vzorcih je bila vsebnost proteinov najnižja, v naslednjih treh nekolika višja, v zadnjih 5 vzorcih pa je bilo proteinov največ. Vzorci si sledijo v istem vrstnem redu kot na sliki 16.

**Slika 16:** Detekcija NF- κ B v jedrni frakciji celičnih lizatov.

Predstavljene vrednosti, pridobljene iz 3 poskusov, so bile normalizirane glede na kontrolni vzorec pri času t₀. Ponovljivi rezultati glede na kontrolo v isti časovni točki so na grafu označeni z zvezdico.

4.6 Konfokalna mikroskopija

Povečano prisotnost NF- κ B v jedru smo želeli v primeru kokošjega cistatina potrditi še s konfokalno mikroskopijo, zato smo pripravili celične preparate, v katerih smo jedro označili z DNA-specifičnim barvilo DAPI (modre barve), za označitev NF- κ B pa smo uporabili protitelesa, označena z barvilo Alexa Fluor 488 (zelene barve). Kot lahko vidimo na sliki 19, je bilo ob času t₀ pri obeh vzorcih v jedrih manj NF- κ B kot v citosolu, saj je zeleno obarvanje jader manj intenzivno. Pri 30-minutni kontroli je na mestu jedra opazen porast zelene fluorescence, kar kaže na translokacijo NF- κ B iz citoplazme v jedro. Pri vzorcu s kokošjim cistatinom je to še bolj očitno, saj je razlika med jedrom in citoplazmo komaj opazna.



Slika 17: Celice PC-3 z označenim NF- κ B in jedrom.

Slike za vse 4 vzorce so bile posnete pri istih pogojih (enake intenzitete laserjev in 40-kratna povečava). Pri vsakem vzorcu so na levi strani celice z označenim NF- κ B (zeleni barvi), na desni pa imajo celice označene tudi jedro (modra barva). Beli daljice prikazujejo merilo (20 μ m).

5 RAZPRAVA

Transkripcijski faktor NF-κB, ki je prisoten v skoraj vseh celičnih tipih, je že več desetletij predmet številnih raziskav zaradi vloge pri razvoju rakavih obolenj in kroničnih vnetnih bolezni, kot so astma, artritis, slatkorna bolezen ... [45, 47]. Dokazali so, da je v številnih tumorjih in njihovem mikrookolju močno povečana ekspresija in aktivnost NF-κB, ki z regulacijo široke palete genov zavira apoptozo, pripomore k proliferaciji tumorskih celic, sodeluje pri razvoju rezistence na kemoterapijo in radioterapijo ter pripomore k nastanku metastaz. Za to potencialno terapevtsko tarčo je bilo odkritih na stotine naravnih in sintetičnih spojin, ki zavirajo signalno pot NF-κB na različnih nivojih (zaviranje fosforilacije in razgradnje IκB- α , translokacije NF-κB v jedro, vezave na DNA ...), vendar je njihova uporaba v kliničnem okolju omejena le na zdravljenje nekaterih levkemij in limfomov v kombinaciji z drugimi protitumornimi učinkovinami [48, 56]. Ena glavnih težav dolgotrajne sistemski uporabe zaviralcev signaliziranja NF-κB je pojav imunosupresije, saj ima NF-κB nepogrešljivo vlogo pri delovanju imunskega sistema. Poleg tega se pri terapiji z nekaterimi zaviralci NF-κB lahko že v nekaj tednih pojavi rezistenza, katere mehanizmi še niso razjasnjeni. Iskanje bolj selektivnih zaviralcev, ki bi učinkovito zavrli aktivnost NF-κB le v tumorskih celicah, je tako še vedno zelo aktualno [56].

Cisteinske peptidaze prav tako kot NF-κB predstavljajo potencialne terapevtske tarče pri zdravljenju raka, saj je njihova ekspresija povišana v večini tumorskih celic (tudi pri raku prostate). V sklopu magistrske naloge smo se osredotočili na katepsine B, L in S, za katere obstajajo številni dokazi, da so vpleteni v napredovanje malignih obolenj. Spodbujajo invazijo in metastaziranje tumorjev, sodelujejo pri angiogenezi, razgradnji zunajceličnega matriksa in tumorski neovaskularizaciji. Na voljo pa so tudi dokazi, da cisteinski katepsini (zlasti katepsin B) v nekaterih primerih celo spodbujajo apoptozo tumorskih celic, zato je lahko njihova inhibicija dvoren meč. Posledično je za vsak celični tip potrebno definirati njihovo vlogo, saj se ta lahko spreminja z napredovanjem malignih obolenj [57–60]. Tumorske celice se prav tako razlikujejo v ekspresiji endogenih zaviralcev katepsinov. Številne študije so pokazale, da je v invazivnih celicah raka dojke in prostate močno znižano razmerje med endogenimi zaviralci katepsinov in katepsini v primerjavi z manj invazivnimi tumorskimi celicami. Uporaba bolj in manj selektivnih zaviralcev cisteinskih katepsinov se je večkrat izkazala za uspešno strategijo pri zaviranju rasti in invazivnosti tumorskih celičnih linij [61–64].

Na področju onkologije je torej na voljo ogromno raziskav o cisteinskih peptidazah in njihovih zaviralcih ter o zaviranju signalne poti NF-κB, zelo malo pa je študij, ki bi preučevale morebitno povezanost med cisteinskimi katepsini in delovanjem transkripcijskega faktorja NF-κB.

Poglavitni namen magistrske naloge je bil preučiti vpliv endogenih zaviralcev cisteinskih peptidaz cistatina C in kokošjega cistatina ter sinteznega zaviralca Gü 2149 na fosforilacijo IκB- α in translokacijo NF-κB iz citosola v jedro celic PC-3.

V sklopu laboratorijskega dela smo najprej izvedli titracijo s testnim encimom papainom, s katero smo določili koncentracijo aktivnega cistatina C in kokošjega cistatina. Ugotovili smo, da je delež aktivnega cistatina C znašal 20 %, delež kokošjega cistatina pa 0,5 %. Pri poskusih smo vedno uporabili 1 μ M koncentracijo vseh treh zaviralcev, kar pomeni, da je bila v gojiščih koncentracija aktivnega cistatina C približno 200 nM, kokošjega cistatina pa 5 nM. V literaturi smo za oba cistatina in katepsine B, L in S pridobili konstante inhibicije, ki znašajo od 0,001 nM do največ 1,7 nM. Na podlagi teh vrednosti smo sklepali, da so bile koncentracije aktivnega cistatina C in kokošjega cistatina pri tretiranju celic dovolj visoke za učinkovito inhibicijo [38, 65, 66].

V nadaljevanju smo učinkovitost inhibicije katepsinov B, L in S preverili z uporabo encimske kinetike. Po 2-urnem inkubiraju celic PC-3 (čas to) z zaviralcji je prišlo do statistično značilne šibke inhibicije samo pri vzorcu s cistatinom C, ki je zmanjšal aktivnost katepsina L za približno 20 %. V nasprotju s pričakovanji pa je bila aktivnost katepsina B po 2-urni izpostavitvi cistatinu C in kokošjemu cistatinu celo rahlo višja kot pri kontroli (približno 8–9 %). Tukaj je možen vzrok za neuspešno inhibicijo prisotnost zaporne zanke v strukturi katepsina B, saj ta ovira dostop zaviralcem do aktivnega mesta, ki pa je manj dostopno tudi za substrate, s čimer lahko delno pojasnimo manjšo fluorescenco pri kontroli [65]. K manjši aktivnosti encimov pri kontroli je najverjetneje prispeval tudi dodatek DMSO, ki nekoliko zavira delovanje cisteinskih peptidaz (kontroli smo dodali DMSO, ker je bil v njem raztopljen Gü 2149). Možno je tudi, da je prišlo do slučajnih napak pri meritvi celokupnih proteinov v celičnih lizatih ali pri pripravi vzorcev za encimsko kinetiko. Za neuspešno inhibicijo katepsinov pa je lahko krivo morebitno počasno prehajanje zaviralcev prek celične membrane.

Po dodatni 3-urni izpostavitvi celic zaviralcem skupaj s TNF- α smo zaznali nižjo aktivnost encimov glede na rezultate ob času nič, vendar vrednosti niso bile statistično značilne pri vseh vzorcih.

Cistatin C je povzročil inhibicijo katepsina S (zmanjšanje aktivnosti za približno 11 %). Pri katepsinu B in L je sicer bil nakazan zaviralen učinek, vendar ga zaradi velikih standardnih deviacij nismo uspeli potrditi. Po podatkih iz literature naj bi cistatin C v pM območju inhibiral katepsina L in S, katepsin B pa v nanomolarnih koncentracijah, vendar so ti rezultati pridobljeni na izoliranih encimih in ne v celičnih linijah, kjer je potrebno upoštevati, da morajo zaviralci preiti celično membrano in tudi membrano lizosoma, da dosežejo tarčne molekule. Za nezaznaven vpliv cistatina C bi lahko bila kriva tudi morebitna visoka koncentracija substratov cisteinskih peptidov v celicah, ki v nekaterih primerih zmanjša učinek kompetitivnega zaviralca [65–67].

Nizkomolekularni zaviralec Gü 2149, ki naj bi pri 1 μ M koncentraciji zaviral le katepsin S ($K_i = 45$ nM), je povzročil statistično značilno inhibicijo katepsina L (aktivnost encima je bila zmanjšana za 13 %), kar ni v skladu z izsledki preliminarnih poskusov, saj naj bi bila za to potrebna vsaj 10-krat večja koncentracija zaviralca. Gü 2149 se je izkazal kot najmočnejši zaviralec katepsina S (28 % zmanjšanje aktivnosti encima). Rezultati poskusov na rekombinantnem katepsinu S so pokazali, da že 50 nM koncentracija Gü 2149 zadošča za 80 % znižanje aktivnosti katepsina S, vendar pa je potrebno pri poskusih na celičnih linijah upoštevati tudi manjšo dostopnost tarčnih encimov [44]. Podatki o sposobnosti prehajanja spojine Gü 2149 prek celične membrane niso na voljo, zato težko potrdimo, da je to vzrok za slabši zaviralni učinek.

Po 3-urni inkubaciji je bil kokošji cistatin edini, ki je povzročil statistično značilno inhibicijo vseh treh katepsinov. Najmočneje je zavrl aktivnost katepsina S (za 25 %), pri katepsinu L je povzročil 14 % znižanje aktivnosti in bil je edini, ki je inhibiral tudi katepsin B (aktivnost je zmanjšal za 13 %).

Pri večini meritev je bila aktivnost katepsinov L in S po 3 urah malenkostno znižana tudi pri kontrolnem vzorcu (rezultati niso prikazani). Ker je bila edina razlika v tretiranju celic dodatek TNF- α , smo preverili, če obstajajo podatki o morebitnem vplivu tega citokina na aktivnost omenjenih katepsinov, vendar jih nismo zasledili. Najverjetneje je za manjšo aktivnost encimov pri kontroli kriv dodatek DMSO.

Po ovrednotenju vpliva zaviralcev na aktivnost izbranih katepsinov smo nadaljevali z detekcijo proteinov, vpletenih v signaliziranje NF- κ B, v posameznih časovnih točkah (2-

urna inkubacija z zaviralci (čas t_0) ter dodatna 30-minutna oz. 3-urna inkubacija z zaviralci in TNF- α). Z metodo SDS-PAGE smo ločili proteine iz celičnih lizatov, jih prenesli na nitrocelulozno membrano in detektirali s protitelesi proti pI κ B- α , I κ B- α in NF- κ B.

V raziskavi iz leta 2004 so po 30-minutnem tretiranju celic PC-3 z 10 ng/mL TNF- α v celičnih lizatih zaznali večjo količino I κ B- α in še večji porast koncentracije pI κ B- α [49]. Mi smo uporabili TNF- α s koncentracijo 20 ng/mL in v skladu z rezultati iz omenjene raziskave pri kontrolnih vzorcih zaznali porast pI κ B- α po 30 minutah, količina celotnega I κ B- α pa se je v našem primeru zmanjšala za skoraj petkrat, kar je najverjetnejše posledica razgradnje I κ B- α na proteasomu po stimulaciji s citokinom. V skladu s povišano koncentracijo pI κ B- α smo po 30-minutah pri kontroli izmerili tudi močno povečano prisotnost NF- κ B v jedru. Po 3-urni inkubaciji se je količina pI κ B- α znižala, vendar je bila še vedno višja kot pri ničelni kontroli, koncentracija celokupnega I κ B- α pa se je povišala, vendar še ni dosegla nivoja pred stimulacijo s TNF- α . To povišanje lahko pripisemo dejству, da povečana aktivnost NF- κ B pomeni tudi povečano prepisovanje genov za I κ B- α . Na novo sintetizirani inhibitori proteini lahko vežejo NF- κ B v citoplazmi in v jedru ter tako v fizioloških pogojih prekinejo aktivacijo signalne poti [45]. V našem primeru pa je bil tudi po 3 urah prisoten eksogeni TNF- α , ki je stimuliral fosforilacijo I κ B- α , kar lahko pojasni dejstvo, da se količina pI κ B- α po 3 urah ni vrnila na začetni nivo. Pri 3-urnih kontrolnih vzorcih smo za NF- κ B dobili različne vrednosti, zato ne moremo z gotovostjo trditi, ali je prišlo do translokacije NF- κ B v jedro, kljub povišani koncentraciji pI κ B- α .

V vzorcih s cistatinom C nam pri detekciji pI κ B- α in I κ B- α ni uspelo dobiti ponovljivih rezultatov. Kljub temu pa smo ugotovili, da je bila ob času t_0 translokacija NF- κ B v jedro pri vzorcih s cistatinom C v povprečju kar trikrat večja kot pri kontroli. Zanimivo bi bilo torej preveriti, če že sama prisotnost tega zaviralca predstavlja dražljaj za fosforilacijo I κ B- α in posledični prenos transkripcijskega faktorja v jedro. Po fosforilaciji se protein zelo hitro razgradi, kar pomeni, da pI κ B- α po 2-urni inkubaciji s cistatinom C mogoče ni bil več prisoten. Prav tako bi težko po 2 urah zaznali upad celokupne koncentracije I κ B- α , saj aktivacija NF- κ B v tem času povzroči sintezo novega proteina [46, 68, 69]. Da bi lahko potrdili, ali cistatin C stimulira fosforilacijo I κ B- α , bi torej morali namesto po 2-urni inkubaciji z zaviralcem detektirati pI κ B- α in I κ B- α že prej (npr. po 30 minutah).

Ugotovili smo, da je ob času t_0 cistatin C inhibiral le katepsin L, torej obstaja možnost, da je zmanjšanje aktivnosti tega encima povzročilo povečanje aktivnosti NF- κ B. To bi bilo

potrebno potrditi z dodatnimi poskusi (npr. z utišanjem gena za katepsin L v celicah PC-3). Pri pregledovanju literature pa smo naleteli tudi na zanimivo študijo, pri kateri so ugotovili, da je dodatek eksogenega cistatina C ($20 \mu\text{g/mL}$ za 2 uri) mišjim makrofagom, ki so bili predhodno tretirani z IFN- γ , povzročil izrazito povišanje aktivnosti NF-κB. Raziskovalci so predpostavili, da ta učinek mogoče ni povezan le z zmanjšanjem aktivnosti cisteinskih peptidov (meritev niso izvedli), temveč z delovanjem cistatina C na receptorje, ki uravnava regulacijo genov [70]. To bi bilo možno tudi v našem primeru, seveda pa je potrebno poudariti, da se mišji makrofagi in PC-3 celice močno razlikujejo in da smo v naših poskusih uporabili 20-krat nižjo koncentracijo cistatina C, ki je že brez prisotnosti citokina povečal aktivnost NF-κB.

Žal smo pri detekciji jedrne frakcije NF-κB v vzorcih s cistatinom C v zadnjih dveh časovnih točkah dobili neponovljive rezultate, medtem ko je bila prisotnost citosolnega NF-κB po 30 minutah vedno višja kot pri kontroli, po 3 urah pa vedno nižja. Kljub ponovljivim vrednostim pri citosolnem NF-κB ne vemo, ali je dejansko prišlo do večjega/manjšega prenosa NF-κB v jedro glede na kontrolo, saj tega ne moremo potrditi z rezultati jedrne frakcije.

Očitno je, da ima dodatek eksogenega cistatina C tudi v prisotnosti TNF- α določen vpliv na signaliziranje NF-κB, vendar težko z gotovostjo zaključimo, kakšen je njegov končni učinek. Največja težava je najverjetneje neselektivnost zaviralca, saj poleg testiranih cisteinskih peptidov inhibira tudi katepsin H ter nekatere lizosomske kaspaze (npr. legumain) [71]. Možno je, da imajo encimi, ki jih cistatin C zavira, različne učinke na signaliziranje NF-κB, kar bi lahko pojasnilo neponovljive rezultate. Poleg tega pa lahko zaviralec znotraj celic pride v stik s številnimi drugimi makromolekulami, ki vplivajo na njegovo delovanje (npr. katepsin D razgrajuje cistatin C, torej se v delih celic, kjer je koncentracija omenjenega encima višja, najverjetneje zniža koncentracija tega zaviralca). Potrebno je tudi poudariti, da je cistatin C multifunkcionalen protein, torej je mogoče, da je njegov vpliv na signalno pot NF-κB popolnoma neodvisen od inhibicije katepsinov [35, 37, 40].

Pri detekciji pIκB- α , IκB- α in NF-κB v vzorcih z Gü 2149 nismo uspeli dokazati razlik med vzorci in kontrolo zaradi neponovljivih rezultatov, zato smo se osredotočili le na to, kako so se količine proteinov s časom spremajale v vzorcih z Gü 2149. Ugotovili smo, da se je po 30-minutni izpostavitvi TNF- α močno znižala količina celokupnega IκB- α in povečala translokacija NF-κB v jedro, razmerje med pIκB- α in IκB- α pa je bilo vsakič močno premaknjeno v prid pIκB- α . Rezultati torej nakazujejo, da je aktivacija NF-κB v vzorcih z Gü 2149 potekala zelo podobno kot pri kontroli in da prisotnost zaviralca ne vpliva na

signalno pot NF-κB. Pri 3-urnih vzorcih se je celokupna količina IκB-α spet povišala zaradi ponovne sinteze IκB-α, kar smo zaznali tudi pri kontrolnih vzorcih. Žal so bile vrednosti za NF-κB po 3 urah neponovljive (prav tako kot pri kontroli), zato ne moremo potrditi, ali je bila pri vzorcih Gü 2149 signalna pot še vedno aktivirana.

Pri vzorcih s kokošjim cistatinom smo podobno kot pri cistatinu C ugotovili povečan prenos NF-κB v jedro že ob času t_0 , v skladu s tem pa smo istočasno detektirali tudi 2-krat višjo količino pIκB-α. Torej lahko zaključimo, da je že brez prisotnosti TNF-α prišlo do aktivacije signalne poti NF-κB. Kokošji cistatin ob času t_0 ni inhibiral nobenega izmed treh katepsinov, kar pomeni, da inhibicija cisteinskih peptidov ni odgovorna za povečan prenos NF-κB v jedro. Kot smo že omenili, so cistatini multifunkcionalni proteini, zato menimo, da je mehanizem aktivacije signalne poti NF-κB neodvisen od inhibicije katepsinov [37]. To potrjuje tudi dejstvo, da v primeru sinteznega zaviralca Gü 2149, ki je inhibiral katepsina L in S, ni prišlo do sprememb v signaliziranju NF-κB v primerjavi s kontrolo. Za potrditev naše domneve bi bilo smotrno, da bi celice tretirali z bolj selektivnimi sinteznimi zaviralci cisteinskih peptidov.

Po 30 minutah inkubiranja s kokošjim cistatinom in TNF-α je bila translokacija NF-κB še večja, kar je najverjetnejše posledica dodatka citokina. Žal smo pri detekciji pIκB-α v isti časovni točki dobili neponovljive rezultate. Po 3 urah je bila vrednost pIκB-α približno 2-krat nižja kot ob času t_0 , kar nakazuje na zmanjšanje aktivnosti signalne poti, vendar tega nismo uspeli potrditi z vrednostmi NF-κB, saj so se od poskusa do poskusa precej razlikovale. Dokazali smo, da je pri 3 urah kokošji cistatin inhibiral vse tri katepsine, s čimer bi lahko pojasnili neponovljive rezultate, saj je možno, da imajo omenjeni encimi nasprotujuče si vloge pri signaliziranju NF-κB.

Ker je bila ena izmed glavnih omejitev imunodetekcije neponovljivost rezultatov pri večih vzorcih (tudi pri kontroli), smo raziskali, kaj bi lahko bil vzrok nizke reproducibilnosti metode. Avtorji v študijah največkrat opozarjajo na nezanesljivost t. i. hišnih proteinov (angl. housekeeping proteins), s katerimi preverjamo nanos proteinov na nitrocelulozno membrano (β -aktin, PCNA) [72–74]. V praksi je najpogosteje uporabljen β -aktin, ki se v celicah nahaja v zelo visoki koncentraciji, zato ga na membrano pogosto nanesemo v prevelikih količinah. V tem primeru vrednosti optične gostote za β -aktin ne korelirajo s celokupno količino proteinov v vzorcu, kar privede do napačnih rezultatov za iskani protein.

V zadnjem času postaja pri izvedbi prenosa western vedno bolj aktualna normalizacija glede na celokupno količino proteinov v vzorcu (npr. Stain-Free method) [72].

Potrebno pa je poudariti, da je za imunodetekcijo določenega proteina potrebnih veliko postopkov, pri katerih lahko pride do napak, ki lahko privedejo do neponovljivih rezultatov (priprava gojišč z zaviralci in celičnih lizatov, meritev celokupnih proteinov, priprava vzorcev in izvedba SDS–PAGE, prenos proteinov na membrano, blokada membrane in inkubacija s protitelesi).

Na koncu eksperimentalnega dela smo vpliv najmočnejšega zaviralca (kokošjega cistatina) na aktivacijo poti NF- κ B preverili še s konfokalno mikroskopijo. Glede na rezultate pri prenosu western smo pričakovali, da bo razlika v prisotnosti NF- κ B v jedru vidna že ob času t_0 , vendar je bila intenziteta obarvanosti jeder precej podobna. Po 30 minutah je prišlo pri obeh vzorcih na mestu jedra do opaznega porasta zelene fluorescence, kar je potrdilo povečano translokacijo NF- κ B iz citoplazme v jedro. Pri vzorcu s kokošjim cistatinom je bilo to še bolj očitno, saj je bila razlika med jedrom in citoplazmo komaj opazna.

6 SKLEPI

V sklopu magistrskega dela smo preučevali učinke zaviralcev cisteinskih peptidov na aktivnost katepsinov in signaliziranje NF-κB v celicah PC-3.

Rezultati naših poskusov odkrivajo, da sintezni zaviralec Gü 2149 v nasprotju z izsledki predhodnih eksperimentov na izoliranih encimih ne zavira le delovanja katepsina S, temveč povzroči tudi zmanjšanje aktivnosti katepsina L. Potrebno pa je poudariti, da se je zaviralen učinek pri obeh pojavil šele po 5-urnem tretiranju celic. Ob tem času smo zaznali 13-% zmanjšanje aktivnosti katepsina L in 28-% inhibicijo katepsina S. Ugotovili smo, da Gü 2149 nima vpliva na aktivacijo signalne poti NF-κB, saj je proces potekal podobno kot pri kontrolnih vzorcih.

Glede na objavljene študije, opravljene na izoliranih encimih, naj bi oba testirana cistatina v uporabljeni koncentraciji zavirala delovanje vse treh katepsinov. V nasprotju s temi izsledki je po 2-urni inkubaciji cistatin C za 21 % zmanjšal aktivnost katepsina L, kokošji cistatin pa ni inhibiral nobenega encima. Po 5-urnem tretiranju je cistatin C za 11 % zavrl aktivnost katepsina S, kokošji cistatin pa je povzročil delno inhibicijo vseh tri katepsinov (catepsin B: 13 %; catepsin L: 14 %; catepsin S: 25 %). Glede na rezultate imunodetekcije NF-κB po 2-urnem inkubiranju z zaviralci sklepamo, da tako cistatin C kot kokošji cistatin predstavlja dražljaj za translokacijo NF-κB v jedro. Ker je človeški cistatin C analog kokošjega cistatina, menimo, da proteina posredujeta svoje učinke na podoben način. Molekularni mehanizem, ki bi pojasnil to delovanje, ni znan, glede na rezultate encimske kinetike ob času to pa sklepamo, da za translokacijo NF-κB ni odgovorna inhibicija katepsinov.

Ker je naše delo zgolj preliminarna raziskava, so za potrditev dobljenih rezultatov potrebni dodatni poskusi na celicah PC-3. Da bi lahko bolje preučili vpliv cistatinov na signalno pot, bi bilo najbolje izvesti imunodetekcijo že po 30-minutni inkubaciji celic brez prisotnosti TNF-α. Za ovrednotenje vpliva posameznih cisteinskih katepsinov na aktivacijo NF-κB pa bi bilo smotrno, da bi celice tretirali z bolj selektivnimi sinteznimi zaviralci. Poleg tega bi lahko izvedli tudi utišanje gena za posamezen katepsin.

7 VIRI

1. Kramer L, Turk D, Turk B. The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management. *Trends Pharmacol Sci* 2017; 38 (10): 873–898
2. Lecaille F, Kaleta J, Brömmel D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* 2002; 102 (12): 4459–88
3. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O et al. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1824 (1): 68–88
4. Cheng XW, Huang Z, Kuzuya M et al. Cysteine protease cathepsins in atherosclerosis-based vascular disease and its complications. *Hypertension* 2011; 58 (6): 978–86
5. Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* 2001; 20 (17): 4629–33
6. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477 (1–2): 98–111
7. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 27 (2): 157–162
8. Turk D, Gunčar G, Podobnik M, Turk B. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem* 1998; 379 (2): 137–147
9. Choe Y, Leonetti F, Greenbaum DC et al. Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *J Biol Chem* 2006; 281 (18): 12824–12832
10. Fonović M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840 (8): 2560–70
11. Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10 (9): 623–635
12. Rawlings ND, Barrett AJ, Woessner JF. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3. izdaja. Academic Press, 2013
13. López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* 2008; 283 (45): 30433–30437

14. Musil D, Zucic D, Turk D et al. 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): 2321–2330
15. Hasnain S, Hirama T, Huber CP et al. Characterization of cathepsin B specificity by site-directed mutagenesis. Importance of Glu245 in the S2-P2 specificity for arginine and its role in transition state stabilization. *J Biol Chem* 1993; 268 (1): 235–40
16. Hasnain S, Hirama T, Tam A, Mort JS. Characterization of recombinant rat cathepsin B and nonglycosylated mutants expressed in yeast. New insights into the pH dependence of cathepsin B-catalyzed hydrolyses. *J Biol Chem* 1992; 267 (7): 4713–21
17. Berquin IM, Sloane BF. Cathepsin B expression in human tumors. *Adv Exp Med Biol* 1996; 389: 281–94
18. Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 (9): 3849–53
19. Bianca Friedrichs, Carmen Tepel, Thomas Reinheckel et al. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J Clin Invest* 2003; 111 (11): 1733–1745
20. Buck MR, Karustis DG, Day NA et al. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 1992; 282 (1): 273–8
21. Büth H, Luigi Buttigieg P, Ostafe R et al. Cathepsin B is essential for regeneration of scratch-wounded normal human epidermal keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 2007; 86 (11–12): 747–61
22. Reinheckel T, Deussing J, Roth W, Peters C. Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol Chem* 2001; 382 (5): 735–41
23. Aggarwal N, Sloane BF. Cathepsin B: multiple roles in cancer. *Proteomics Clin Appl* 2014; 8 (5–6): 427–37
24. Burnett D, Abrahamson M, Devalia JL et al. Synthesis and secretion of procathepsin B and cystatin C by human bronchial epithelial cells in vitro: modulation of cathepsin B activity by neutrophil elastase. *Arch Biochem Biophys* 1995; 317 (1): 305–10
25. Baici A, Lang A, Zwicky R, Müntener K. Cathepsin B in osteoarthritis: uncontrolled proteolysis in the wrong place. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34 (6): 24–8

26. Brömmel D, Bonneau PR, Lachance P, Storer AC. Engineering the S2 subsite specificity of human cathepsin S to a cathepsin L- and cathepsin B-like specificity. *J Biol Chem* 1994; 269 (48): 30238–42
27. Portaro FC, Santos AB, Cezari MH et al. Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P4, P3, P2' and P3' variations in extended substrates. *Biochem J* 2000; 347 (1): 123–129
28. Visone T, Charron M, Wright WW. Activation and Repression Domains Within the Promoter of the Rat Cathepsin L Gene Orchestrate Sertoli Cell-Specific and Stage-Specific Gene Transcription in Transgenic Mice. *Biol Reprod* 2009; 81 (3): 571–579
29. Jean D, Guillaume N, Frade R. Characterization of human cathepsin L promoter and identification of binding sites for NF-Y, Sp1 and Sp3 that are essential for its activity. *Biochem J* 2002; 361(1): 173–84
30. McDonald JK, Ellis S. On the substrate specificity of cathepsins B1 and B2 including a new fluorogenic substrate for cathepsin B1. *Life Sci* 1975; 17 (8): 1269–76
31. Kirschke H, Wiederanders B, Brömmel D, Rinne A. Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J* 1989; 264 (2): 467–473
32. Shi GP, Webb AC, Foster KE et al. Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J Biol Chem* 1994; 269 (15): 11530–6
33. Pang M, Martinez AF, Jacobs J et al. RANK ligand and interferon gamma differentially regulate cathepsin gene expression in pre-osteoclastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328 (3): 756–63
34. Wang B, Sun J, Kitamoto S et al. Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* 2006; 281 (9): 6020–9
35. Anderluh G, Žerovnik E. Pore formation by human stefin B in its native and oligomeric states and the consequent amyloid induced toxicity. *Front Mol Neurosci* 2012; 5 (85): 1–8
36. Turk B, Turk D, Salvesen GS. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des* 2002; 8 (18): 1623–37
37. Shamsi A, Bano B. Journey of cystatins from being mere thiol protease inhibitors to at heart of many pathological conditions. *Int J Biol Macromol* 2017; 102: 674–693

38. Turk V, Stoka V, Turk D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front Biosci* 2008; 13: 5406–20
39. Zi M, Xu Y. Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis. *Immunol Lett* 2018; 196: 80–90
40. Mathews PM, Levy E. Cystatin C in aging and in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 2016; 32: 38–50
41. Siklos M, BenAissa M, Thatcher GR. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm Sin B* 2015; 5 (6): 506–19
42. Hanada K, Tamai M, Yamagishi M et al. Isolation and Characterization of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor. *Agric Biol Chem* 1978; 42 (3): 523–528
43. Li YY, Fang J, Ao GZ. Cathepsin B and L inhibitors: a patent review (2010 - present). *Expert Opin Ther Pat* 2017; 27 (6): 643–656
44. Meško M. Priprava rekombinantnega katepsina S v Pichia pastoris in njegova uporaba pri testiranju zaviralcev (Preparation of recombinant cathepsin S in Pichia pastoris and its use for the testing of inhibitors). Ljubljana 2014
45. Gilmore TD. Encyclopedia of Biological Chemistry. 2. izdaja. Academic Press, 2013; 302–305
46. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; 25 (51): 6680–4
47. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1 (4): 1–14
48. Nguyen DP, Li J, Yadav SS, Tewari AK. Recent insights into NF-κB signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. *BJU Int* 2014; 114 (2): 168–76
49. Shukla S, Gupta S. Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (9): 3169–78
50. Nuñez C, Cansino JR, Bethencourt F et al. TNF/IL-1/NIK/NF-kappa B transduction pathway: a comparative study in normal and pathological human prostate (benign hyperplasia and carcinoma). *Histopathology* 2008; 53 (2): 166–76

51. Cimerman N. Preparation of some recombinant human cystatin C mutants and their characterisation, Ph.D. thesis. University of Ljubljana. Ljubljana 1993
52. Bode W, Engh R, Musil D et al. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. EMBO J 1988; 7 (8): 2593–9
53. Štrukelj B, Kos J et al. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1. izdaja. Slovensko farmacevtsko društvo. Ljubljana 2007; 143–147, 174
54. Pranovo Biotech. <https://novowb.wordpress.com/tag/direct-detection/>. Dostop: 17. 6. 2018
55. Induslab. <http://www.induslab.com.br/index.php/reagentes/biologia-molecular/iblotr-transfer-stack-regular-nitrocellulose-10sets-box.html>. Dostop: 17. 6. 2018
56. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF-κB, an active player in human cancers. Cancer Immunol Res 2014; 2 (9): 823–830
57. Aggarwal N, Sloane BF. Cathepsin B: multiple roles in cancer. Proteomics Clin Appl 2014; 8 (5-6): 427–37
58. Sudhan DR, Siemann DW. Cathepsin L targeting in cancer treatment. Pharmacol Ther 2015; 155: 105–116
59. Small DM, Burden RE, Jaworski J et al. Cathepsin S from both tumor and tumor-associated cells promote cancer growth and neovascularization. Int J Cancer 2013; 133 (9): 2102–12
60. Burden RE, Gormley JA, Kuehn D et al. Inhibition of Cathepsin S by Fsn0503 enhances the efficacy of chemotherapy in colorectal carcinomas. Biochimie 2012; 94 (2): 487–93
61. Sudhan DR, Siemann DW. Cathepsin L Inhibition by the Small Molecule KGP94 Suppresses Tumor Microenvironment Enhanced Metastasis Associated Cell Functions of Prostate and Breast Cancer Cells. Clin Exp Metastasis 2013; 30 (7): 891–902
62. Wegiel B, Jiborn T, Abrahamson M et al. Cystatin C is downregulated in prostate cancer and modulates invasion of prostate cancer cells via MAPK/Erk and androgen receptor pathways. PLoS One 2009; 4 (11): e7953

63. Jiborn T, Abrahamson M, Gadaleanu V et al. Aberrant expression of cystatin C in prostate cancer is associated with neuroendocrine differentiation. *BJU Int* 2006; 98 (1): 189–196.
64. Zajc I, Sever N, Bervar A, Lah TT. Expression of cysteine peptidase cathepsin L and its inhibitors stefins A and B in relation to tumorigenicity of breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 2002; 187: 185–190
65. Brillard-Bourdet M, Nguyễn V, Ferrer-di Martino M et al. Purification and characterization of a new cystatin inhibitor from Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom. *Biochem J* 1998; 331 (1): 239–44
66. Mason RW, Sol-Church K, Abrahamson M. Amino acid substitutions in the N-terminal segment of cystatin C create selective protein inhibitors of lysosomal cysteine proteinases. *Biochem J* 1998; 330 (2): 833–8
67. Copeland RA. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods Biochem Anal* 2005; 46: 1–265
68. Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 1993; 259 (5103): 1912–5
69. Krappmann D, Scheidereit C. Regulation of NF-kappa B activity by I kappa B alpha and I kappa B beta stability. *Immunobiology* 1997; 198 (1–3): 3–13
70. Frendéus KH, Wallin H, Janciauskiene S, Abrahamson M. Macrophage responses to interferon-gamma are dependent on cystatin C levels. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41 (11): 226–9
71. Paraoan L, Grierson I. Focus on Molecules: Cystatin C. *Exp Eye Res* 2007; 84: 1019–1020
72. Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β-actin for Western blots. *Anal Biochem* 2013; 440 (2): 186–8
73. Dittmer A, Dittmer J. Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis*. 2006; 27 (14): 2844–5
74. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics* 2014; 11 (5): 549–60