

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JAN RAKUŠA

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JAN RAKUŠA

**VPLIV DIFERENCIACIJE MAKROFAGOV NA
LOKALIZACIJO IN AKTIVNOST KATEPSINOV**

**THE INFLUENCE OF MACROPHAGE DIFFERENTIATION
ON CATHEPSIN LOCALIZATION AND ACTIVITY**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof.dr. Janka Kosa, univ.dipl.biokem., in somentorstvom asist.dr. Zale Jevnikar, univ.dipl.mikrobiol. Eksperimentalno delo sem opravljal v celičnem in biotehnološkem laboratoriju na Katedri za farmacevtsko biologijo. Konfokalno mikroskopijo sem opravljal na Inštitutu za patološko fiziologijo na Medicinski fakulteti.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Janku Kosu za priložnost izdelave diplomske naloge ter za vse strokovne nasvete, ki so mi omogočili izdelavo te diplomske naloge.

Za ves trud, potrpežljivost, pomoč in strokovne nasvete pri laboratorijskem delu ter pisanju diplome se iskreno zahvaljujem somentorici asist. dr. Zali Jevnikar.

Iskrena hvala tudi predsedniku komisije prof.dr. Borutu Božiču in članu komisije doc. dr. Iztoku Grabnarju, ki sta mi v tako kratkem času pregledala diplomsko nalogo.

Prisrčna hvala tudi vsem prijateljem, ki so me spremljali na moji študijski poti, ter so mi v dobrih in slabih trenutkih zmeraj stali ob strani.

Posebno zahvalo namenjam svoji družini, očetu, mami ter bratoma, ki so mi omogočili študij ter me ves čas podpirali. Največja zahvala pa gre Mateji za vso potrpežljivost, vzpodbudo, strokovne nasvete ter zaupanje vame.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof.dr. Janka Kosa, univ.dipl.biokem., ter somentorstvom asist.dr. Zale Jevnikar, univ.dipl.mikrobiol.

Jan Rakuša

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD	1
1.1 Proteaze.....	1
1.2 Cisteinski Katepsini	2
1.2.1 Lokalizacija in aktivnost cisteinskih Katepsinov	3
1.3 Katepsin X	5
1.3.1 Izražanje in vloga Katepsina X.....	6
1.4 Katepsin B.....	6
1.4.1 Izražanje in vloga Katepsina B.....	7
1.5 Cisteinski Katepsini pri makrofagih	9
2 NAMEN DELA	11
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 MATERIALI	12
3.1.1 Reagenti	12
3.1.2 Laboratorijska oprema	14
3.1.3 Gojišča	15
3.1.4 Raztopine in pufri	15
3.1.4.1 Pufri in raztopine za NaDS PAGE in prenos Western.....	15
3.1.4.2 Pufri za ELISA test:	16
3.1.4.3 Ostali pufri	16
3.1.5 Celice	17
3.1.5.1 Celična linija U937	17
3.1.5.2 Odmrzovanje celic	17

3.1.5.3	Gojenje in diferenciacija celic	17
3.1.5.4	Štetje celic.....	18
3.1.5.5	Zamrzovanje celic.....	18
3.2	METODE.....	19
3.2.1	Imunoencimski test na trdni podlagi (ELISA)	19
3.2.1.1	Sendvič ELISA	19
3.2.1.2	Priprava vzorcev	20
3.2.1.3	Določanje celokupnih proteinov z metodo po Bradfordu.....	20
3.2.1.4	Izvedba ELISA testa	20
3.2.2	Fluorescenčna konfokalna mikroskopija	21
3.2.2.1	Priprava preparatov	22
3.2.2.2	Analiza preparatov	23
3.2.3	Pretočna citometrija	23
3.2.3.1	Izvedba.....	23
3.2.4	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS PAGE)	24
3.2.4.1	Izvedba NaDS PAGE.....	25
3.2.4.2	Priprava gelov:	25
3.2.4.3	Priprava vzorcev:	25
3.2.4.4	Elektroforeza:.....	26
3.2.4.5	Prenos Western:	26
3.2.5	Določanje aktivnosti Katepsina B in Katepsina X z razgradnjo fluorogenih substratov.....	27
3.2.5.1	Izvedba.....	27
4	REZULTATI	28
4.1	Vpliv diferenciacije U937 na koncentracijo Katepsinov X in B	28
4.2	Vpliv diferenciacije U937 na aktivnost Katepsinov X in B	29

4.2.1	Določanje aktivnosti z razgradnjo fluorogenih substratov	29
4.2.2	Določanje aktivnosti s specifičnim označevalnim inhibitorjem cisteinskih Katepsinov DCG-04 z metodo NaDS PAGE	29
4.3	Vpliv diferenciacije U937 na prenos Katepsinov X in B na plazemsko membrano. .	31
4.4	Vpliv diferenciacije U937 na lokalizacijo Katepsinov	31
4.4.1	Vpliv diferenciacije U937 na lokalizacijo Katepsinov X in B	31
4.4.2	Vpliv diferenciacije U937 na kolokalizacijo Katepsina X s celičnimi vezikli....	32
4.4.3	Vpliv diferenciacije U937 na kolokalizacijo cisteinskih Katepsinov.....	34
5	RAZPRAVA	36
6	SKLEPI	41
7	LITERATURA	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizem katalitičnega delovanja cisteinskih proteaz.....	3
Slika 2: Kristalni strukturi Katepsina B ter Katepsina X.....	7
Slika 3: Razgradnja DQ-kolagena tipa IV pri migraciji rakavih celic MCF-10A neoT.	8
Slika 4: Shematski prikaz diferenciacije makrofagov in dendritičnih celic.....	9
Slika 5: Indirektna (A) in direktna (B) ELISA.....	19
Slika 6: Primerjava koncentracij aktivnega Katepsina X ter Katepsina B v celicah U937..	28
Slika 7: Rezultati določanja aktivnosti z razgradnjo fluorogenih substratov za Katepsin X in Katepsin B v celicah U937.	29
Slika 8: Določanje aktivnosti Katepsinov X in B z DCG-04 z metodo NaDS PAGE v celicah U937.....	30
Slika 9: Rezultati pretočne citometrije za Katepsin X in Katepsin B v celicah U937.....	31
Slika 10: Lokalizacija Katepsina X in Katepsina B ter njuna kolokalizacija v celicah U937...	32
Slika 11: Kolokalizacija Katepsina X z različnimi celičnimi označevalci v celicah U937.	33
Slika 12: Kolokalizacija Katepsina X s celičnimi označevalci v celicah U937.....	33
Slika 13: Kolokalizacija Katepsina X s celičnimi označevalci na membrani celic v diferenciranih celicah U937.....	34
Slika 14: Kolokalizacija cisteinskih Katepsinov v celicah U937, pred in po diferenciaciji s PMA..	35

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Cisteinski katepsini, njihovo izražanje ter način delovanja.....	4
Preglednica II: Reagenti in topila, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njihov proizvajalec.....	12
Preglednica III: Laboratorijska oprema, katero smo uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njen proizvajalec.....	14
Preglednica IV: Sestava gelov za izvedbo NaDS PAGE.....	25

POVZETEK

Cisteinski Katepsini so nepogrešljivi za učinkovit imunski odziv. Nekoč so to vrsto lizosomskih proteaz povezovali le z antigensko predstavitvijo in procesiranjem grancimov znotraj endo-lizosomskih veziklov, sedaj je znano, da so vključeni tudi pri drugih imunskih procesih. Sodelovanje pri migraciji in diferenciaciji imunskih celic je povezano s premestitvijo cisteinskih Katepsinov iz perinuklearnega področja na druga mesta v celici. V okviru diplomskega dela smo raziskovali lastnosti cisteinskih karboksiptidaz Katepsina X in B med diferenciacijo monocitov U937 v makrofage. S specifično metodo ELISA smo dokazali, da se koncentracija Katepsinov X in B v makrofagih značilno poveča v primerjavi z nediferenciranimi celicami. Z uporabo fluorogenih substratov ter s specifičnim označevalnim inhibitorjem cisteinskih Katepsinov DCG-04 smo dokazali, da se po diferenciaciji celic U937 izrazito poveča aktivnost Katepsina B, medtem ko se aktivnost Katepsina X ne spremeni. S pretočno citometrijo smo potrdili, da diferenciacija U937 spodbudi prenos Katepsinov X in B na celično membrano. Premestitev Katepsinov X in B iz področja perinuklearnih lizosomov v bližino membrane smo potrdili s fluorescenčno konfokalno mikroskopijo. Dokazali smo, da se del Katepsina X ob membrani nahaja v Rab-11-pozitivnih reciklirajočih endosomih. Naši rezultati potrjujejo hipotezo, da proces diferenciacije monocitov v makrofage povzroči spremembe v izražanju, aktivnosti in znotrajcelični lokalizaciji cisteinskih Katepsinov. Povečano izražanje Katepsinov X in B ter značilna premestitev v bližino celične membrane, potrjuje, da imajo cisteinske karboksiptidaze pri makrofagih specifične vloge, ki niso vezane zgolj na razgradnjo substratov v lizosomih.

ABSTRACT

Cysteine cathepsins are essential for efficient immune response. In immune cells this type of lysosomal proteases was linked with antigen presentation and granzyme processing inside endo-lysosomal vesicles, but it is now clear, that they are involved in other immune processes. The role of cysteine cathepsins in migration and differentiation of immune cells is associated with their trafficking from perinuclear region to other cellular places. We have studied the properties of cysteine carboxypeptidases cathepsins X and B during the differentiation of monocytes to macrophages. The concentration of cathepsin X and B in macrophages was significantly increased compared to non-differentiated U937 cells, as shown by cathepsin specific ELISAs. Specific fluorogenic substrates and the activity-based probe DCG-04 were used to analyze the impact of the differentiation process on cathepsin activity. Interestingly, we detected a significant increase in cathepsin B activity, while the activity of cathepsin X was not affected. Using flow cytometry we determined that differentiation of U937 cells stimulates the translocation of cathepsins X and B to the cell membrane. The transfer of cathepsins X and B from lysosomes to the vicinity of the cell membrane was confirmed by confocal microscopy. Further, we showed that a part of cathepsin X is translocated from the lysosomes to Rab-11-positive recycling endosomes that are located near the cell membrane. Our results confirm the hypothesis, that monocyte differentiation to macrophages leads to changes in expression, activity and intracellular localization of cysteine cathepsins. Increased expression of cathepsins X and B and their significant translocation to the vicinity of the cell membrane, suggest that cysteine carboxipeptidases have specific roles in macrophages, which are not related solely to endo-lysosomal degradation.

SEZNAM OKRAJŠAV

A	absorbanca
AK	aminokislina
APC	antigen predstavitevne celice
APS	amonijev persulfat
Arg	arginin
Asn	asparagin
BSA	goveji serumski albumin
c	koncentracija
CBB	Commassiejevo briljantno modro
CTSB	katepsin B
CTSX	katepsin X
Cys	cistein
Da	Dalton
dH ₂ O	deionizirana voda
DMEM	»Dulbecco modified Eagle medium«, po Dulbeccu spremenjeno Eaglovo gojišče
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ECM	»extracellular matrix«, zunajcelični matriks
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	»Enzyme-linked immunosorbent assay«, imunoencimski test na trdnem nosilcu
FCS	fetalni telečji serum
FSC	»forward scatter«, sprednje sipanje
GA	Golgijev aparat
GER	zrnat endoplazmatski retikulum
Gln	glutamin
GM-CSF	granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
His	histidin
HRP	hrenova peroksidaza
IAP	»integrin associated protein«, z integrinom povezan protein
Ile	izolevcin
kDA	kilodalton

LFA-1	»Lymphocyte function associated antigen-1«, z limfocitno funkcijo povezan antigen 1
M	molarnost (mol/liter)
mAb	monoklonsko protitelo
Mac-1	»Macrophage antigen-1«, makrofagni antigen 1
M-CSF	makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
MMP	matriks metaloproteaze
mRNA	informacijska RNA
NaDS	natrijev dodecilsulfat
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	»phosphate buffer saline«, s fosfatom pufrana slanica
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat
PVDV	poliviniliden difluorid
rCTSB	rekombinantni katepsin B
rCTX	rekombinantni katepsin X
RPM	»rotation per minute«, št. obratov na minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute gojišče
SSC	»side scatter«, stransko sipanje
TEMED	tetrametiletildiamin
TMB	tetrametilbenzidin
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa
UV	ultravijolična svetloba
°C	stopinja celzija
λ	valovna dolžina

1 UVOD

1.1 Proteaze

Proteaze, poznane tudi pod imeni proteinaze, peptidaze ali proteolitični encimi, so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v polipeptidni verigi. Glede na mesto cepitve peptidne vezi delimo proteaze na eksopeptidaze in endopeptidaze. Eksopeptidaze lahko cepijo peptidno vez na obeh koncih verige, zato ločimo karboksipeptidaze, ki cepijo C-terminalni del, in aminopeptidaze, ki cepijo N-terminalni del verige. Glede na število odcepljenih fragmentov pa poznamo mono-peptidaze, dipeptidaze, tripeptidaze, omegapeptidaze ... Glede na kemijsko skupino, odgovorno za katalizo, so proteaze razdeljene na več razredov: aspartatne proteaze, cisteinske proteaze, metaloproteaze, serinske proteaze, treoninske proteaze in proteaze z neznanim katalitskim mehanizmom. Razredi se naprej delijo na klane, klani pa na družine. Klane sestavljajo družine, ki so si podobne predvsem v terciarni strukturi, v družine pa so združene proteaze s homolognimi zaporedji. Ta razvrstitev temelji na evolucijski sorodnosti in mehanizmu delovanja proteaz (1, 2).

Proteaze lahko delimo tudi na razgrajevalne, ki hidrolizirajo peptidne vezi, dokler tarčni protein ni popolnoma razkrojen, ali regulatorne, ki s cepitvijo ene ali več specifičnih vezi vplivajo na biološko aktivnost tarčnega proteina (3). Razgrajevalne proteaze sodelujejo pri nespecifični razgradnji proteoma (celokupni nabor proteinov v določeni celici, tkivu ali organizmu), regulatorne pa so zadolžene za nadzorovano procesiranje encimov, rastnih faktorjev, receptorjev in drugih peptidnih ter proteinskih tarč. Prepleteno delovanje obeh tipov proteaz omogoča pravilno delovanje celic, posledično pa tudi celotnega organizma. Z znotrajcelično in zunajcelično razgradnjo ter modulacijo proteinov proteaze regulirajo osnovne biološke procese, kot so preoblikovanje tkiv, nastajanje novih žil, imunski odziv, reproduktivni procesi, razvoj zarodka, procesa rasti in staranja (4). Proteaze so pogosto vključene v kompleksne signalne reakcije, dobro preučen primer predstavlja proces koagulacije krvi, kjer pride do kaskadne aktivacije večih proteaz, ki naprej modificirajo ali razgrajujejo različne tarčne substrate (5).

Nepravilno ali prekomerno delovanje proteaz so dokazali pri številnih patoloških procesih, kot so: vnetne bolezni, revmatoidni artritis, kardiovaskularne bolezni, nevrodegenerativne bolezni, osteoporoza, multipla skleroza, mišična distrofija, pankreatitis, sladkorna bolezen

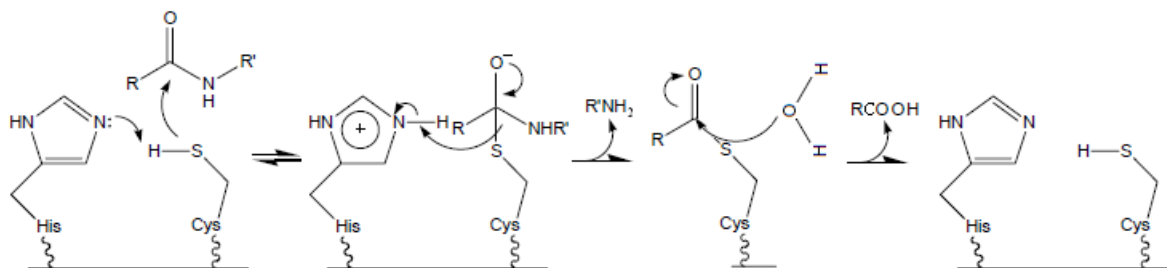
in nenazadnje rak (4). Zaradi spremenjenega izražanja pri patoloških procesih kažejo proteaze velik potencial kot diagnostični in prognostični dejavniki pri različnih boleznih, zlasti pri rakavih obolenjih. S terapevtskega stališča pa predstavlja regulacija proteolitične aktivnosti ključen mehanizem zdravljenja številnih patoloških stanj (6).

1.2 Cisteinski katepsini

Pojem »katepsin« se že od leta 1920 uporablja za lizosomske proteaze, ne glede na razred, kateremu pripadajo. Pojem tako vključuje serinski proteazi (katepsina A in G), aspartatni proteazi (katepsina D in E) in enajst znanih človeških cisteinskih katepsinov (katepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W). Cisteinski katepsini spadajo v papainsko družino lizosomskih proteaz (klan CA, družina C1, poddružina A). Večinoma gre za endopeptidaze, z izjemo katepsinov C in H, ki sta aminopeptidazi ter B in X, ki imata karboksipeptidazno aktivnost. Katepsina B in H obenem izražata tudi endopeptidazno aktivnost (7).

Cisteinske katepsine celica sintetizira v obliki prekurzorjev, velikih 30-50 kDa, ki so nato glikozilirani in fosforilirani v Golgijevem aparatu. Sledi vezava na manoza-6-fosfatne receptorje in transport v endosome. Med dozorevanjem endosomov v primarne in sekundarne lizosome se z eno ali več proteoliznimi cepitvami tvorijo aktivni katepsini (8). Izjema je katepsin W, ki je lokaliziran v endoplazmatskem retikulumu. Aktivni cisteinski katepsini so glede na kvartarno strukturo monomeri z molekulsko maso med 22 in 28 kDa. Sestavljeni so iz dveh domen, z aktivnim mestom v obliki črke V. V levi domeni prevladujejo α vijačnice, v desni pa β strukture. Izjema je katepsin C, ki je tetramer z molekulsko maso 200 kDa (9).

Katepsini so optimalno aktivni v rahlo kislem (pH 5,0-6,5), reducirajočem okolju, kakršnega najdemo v lizosomih in imajo skupen mehanizem delovanja, ki ga prikazuje slika 1. Pri delovanju uporabljajo molekulo vode za nukleofilni napad na karbonilno skupino v amidni vezi, pri čemer sta ključnega pomena AK Cys₃₁ in His₁₈₀, ki jo imenujemo tudi katalitična diada. Proton sulfhidrilne skupine Cys je vezan na imidazolni obroč His, vendar le v pH območju, v katerem je encim aktiven. Po nukleofilnem napadu na karbonilno skupino peptidne vezi nastane tiolestrski tetraedrični intermediat (10).



Slika 1: Mehanizem katalitičnega delovanja cisteinskih proteaz (11).

Hkrati imata pri katalitičnem delovanju pomembno vlogo AK Gln in Asn. Gln preko amidne skupine skupaj z SH-skupino Cys v aktivnem mestu tvori oksanionsko luknjo, ki stabilizira nastali intermediat, Asn pa pomaga pri pravilni orientaciji imidazolovega obroča His. Poleg omenjenih so pri posameznih encimih pomembne AK, ki z vodikovimi vezmi zagotavljajo večjo stabilnost strukturi aktivnega mesta (12).

Dolgo časa je veljalo, da je vloga Katepsinov omejena na končno razgradnjo proteinov v lizosomih, vendar se je kasneje izkazalo, da so vpleteni v več zelo pomembnih celičnih procesov. Danes vemo, da so Katepsini udeleženi pri znotraj- in zunajceličnem razgrajevanju proteinov, procesiranju propeptidov in hormonov, apoptozi, preoblikovanju kostnega tkiva, reproduktivnih procesih, procesih diferenciacije, povečajo gibljivost in invazivnost celic, itd. Cisteinski Katepsini so udeleženi pri različnih efektorskih mehanizmi pridobljenega in naravnega imunskega odziva in so nepogrešljivi za učinkovit imunski odziv. Nekoč so Katepsine povezovali zgolj z antigensko predstavitvijo in procesiranjem grancimov znotraj endo-lizosomskih veziklov, vendar je sedaj jasno, da so nepogrešljivi tudi pri diferenciaciji, adheziji in migraciji imunskih celic, regulaciji citokinov, indukciji apoptoze, aktivaciji cimogenov serinskih proteaz ter številnih drugih procesih (13). Moteno uravnavanje njihove encimske aktivnosti je povezano s številnimi bolezenskimi procesi: revmatoidni artritis, ateroskleroza, Alzheimerjeva bolezen, multipla skleroza, mišična distrofija, nevrološke motnje, pankreatitis, sladkorna bolezen, luskavica, vnetne reakcije in nenazadnje rakava obolenja (14, 15). Prav zaradi pomembne vloge pri rakavih obolenjih predstavljajo cisteinski Katepsini pomembne tarče za diagnozo, prognozo in terapijo raka (8).

1.2.1 Lokalizacija in aktivnost cisteinskih Katepsinov

Lokalizacija cisteinskih Katepsinov v tkivih je odvisna predvsem od vloge, ki jo Katepsini opravljajo v določenih tkivih. Določeni Katepsini (B, H, L in C) so konstitutivno prisotni v vseh tkivih, saj je njihovo delovanje nujno potrebno v skoraj vseh celicah našega telesa.

Preostali cisteinski Katepsini (S, V, X, O, K, F in W) se izražajo le v specifičnih vrstah celic. Specifično izražanje nekaterih Katepsinov je povezano s specifično vlogo, ki jo opravljajo v tkivih, v katerih se nahajajo (12, 16). V preglednici I je prikazano izražanje posameznih cisteinskih Katepsinov ter njihov način delovanja. Znotraj celice so Katepsini običajno lokalizirani v endo-lizosomskih veziklih (12), kot so lizosomi, zgodnji in pozni endosomi ter reciklirajoči endosomi (3). Posebnež glede znotrajcelične lokalizacije je Katepsin W, ki se nahaja v endoplazmatskem retikulumu.

Preglednica I: Cisteinski Katepsini, njihovo izražanje ter način delovanja.

IME	IZRAŽANJE	NAČIN DELOVANJA
Katepsin B	konstitutivno prisoten v vseh tkivih	endopeptidaza, karboksipeptidaza
Katepsin C	konstitutivno prisoten v vseh tkivih	aminopeptidaza
Katepsin F	srce, skeletne mišice, možgani, jajčniki, moda	endopeptidaza
Katepsin H	konstitutivno prisoten v vseh tkivih	aminopeptidaza, endopeptidaza
Katepsin K	osteoklasti, jajčniki, večina epitelijskih tkiv	endopeptidaza
Katepsin L	konstitutivno prisoten v vseh tkivih	endopeptidaza
Katepsin O	verjetno prisoten v večini tkiv	endopeptidaza
Katepsin S	alveolarni makrofagi, vranica, limfociti T	endopeptidaza
Katepsin V	priželjci, možgani, roženica, moda	endopeptidaza
Katepsin W	naravne celice ubijalke ter limfociti T	endopeptidaza
Katepsin X	celice imunskega sistema, možgani	karboksipeptidaza

Spremembe v lokalizaciji cisteinskih Katepsinov, tako znotraj- kot zunajcelični, so običajno posledica posebnih fizioloških ali patoloških stanj v organizmu. Največkrat na spremembo v lokalizaciji vpliva povečana ali zmanjšana ekspresija genov, ki nosijo zapis za Katepsine, in je običajno posledica mutacije na genu, spremenjene regulacije transkripcije, večih transkripcijskih variant, ali pa nepravilnih posttranskripcijskih modifikacij. Pomemben vpliv imajo tudi vsa stanja v organizmu, pri katerih pride do spremembe v prepustnosti lizosomov. Takrat pride do prehajanja lizosomskih encimov iz lizosomov v citosol ter naprej v druge predele celic. S spremembo lokalizacije Katepsinov lahko pride tudi do sprememb v funkciji samih Katepsinov (14).

Aktivnost Katepsinov je nadzorovana z regulacijo sinteze Katepsinov na nivoju transkripcije, regulacijo procesiranja Katepsinov do aktivne oblike, z vezavo endogenih inhibitorjev (stefini in cistatini) in koencimov ter nenazadnje s pH stabilnostjo (9). Katepsini so dolgo veljali za lizosomske encime, ki so aktivni le pri kislem pH. Ta pogled

je spremenilo dejstvo, da so številni katepsini v fizioloških in patoloških razmerah preusmerjeni iz lizosomov v zunajcelični prostor, v druge celične organele ali v citoplazmo in so lahko aktivni tudi pri nevtralnem pH (3).

Med dobro preučene primere izvenlizosomske lokalizacije in delovanja katepsinov spada razgradnja zunajceličnega matriksa s katepsinom B, ki poteka tako v lizosomih kot izven celice (17). Tudi remodelacija kostnega matriksa s katepsinom K, ki ga izločajo osteoklasti v prostor imenovan »resorptive pit«, je klasičen primer izvenlizosomskega delovanja katepsinov. Procesiranje transkripcijskih faktorjev v celičnem jedru s katepsinom L, pa lahko nastopi v primeru spremembe začetnega kodona pri prevajanju DNA (14).

1.3 Katepsin X

Nedavno odkrita lizosomska cisteinska proteaza katepsin X sodi v družino papaina in njemu podobnih cisteinskih katepsinov. Gen za človeški katepsin X se nahaja na 20. kromosomu v regiji q13 in se sintetizira kot preprokatepsin X. Po procesiranju signalnega zaporedja in proregije nastane aktivni encim, ki je lokaliziran v endo-lizosomskih veziklih. Od ostalih cisteinskih proteaz ga ločijo značilne strukturne posebnosti, dva peptidna vključka ter nenavadno kratka proregija. Prvi peptidni vključek, dolg tri AK (His-Ile-Pro), se nahaja v neposredni bližini Gln ostanka v oksanionski luknji in nakazuje na značilno substratno specifičnost. Drugi peptidni vključek, dolg 15 AK, pa naj bi bil bistven za karboksi-dipeptidazno delovanje. Proregija, ki je pri katepsinu X zelo kratka (38 AK), vsebuje cisteinski ostanek Cys_{10p}, kateremu pripisujejo posebno vlogo v regulaciji in/ali katalitični aktivnosti samega katepsina X (18, 19).

Katepsin X deluje kot eksopeptidaza in lahko izraža tako karboksi-monopeptidazno, kot tudi karboksi-dipeptidazno aktivnost, vendar za razliko od katepsina B nima endopeptidazne aktivnosti. Ključnega pomena za eksopeptidazno aktivnost katepsina X je mini zanka. V zanki je prisoten His₁₈₀, ki lahko s pozitivnim nabojem imidazolovega obroča preklaplja med dvema konformacijama. To pojasnjuje preklap med karboksi-monopeptidaznim in karboksi-dipeptidaznim delovanjem katepsina X (20). Strukturno gledano je katepsin X monomer iz dveh domen, leve in desne. Prevladujoča sekundarna struktura N-končne domene na levi so α -vijačnice, C-končna domena na desni pa vključuje β -strukture (slika 2). Domeni sta na vrhu ločeni in tvorita žep v obliki črke V, v katerem se nahajata aminokislini Cys₃₁ in His₁₈₀ (21).

1.3.1 Izražanje in vloga katepsina X

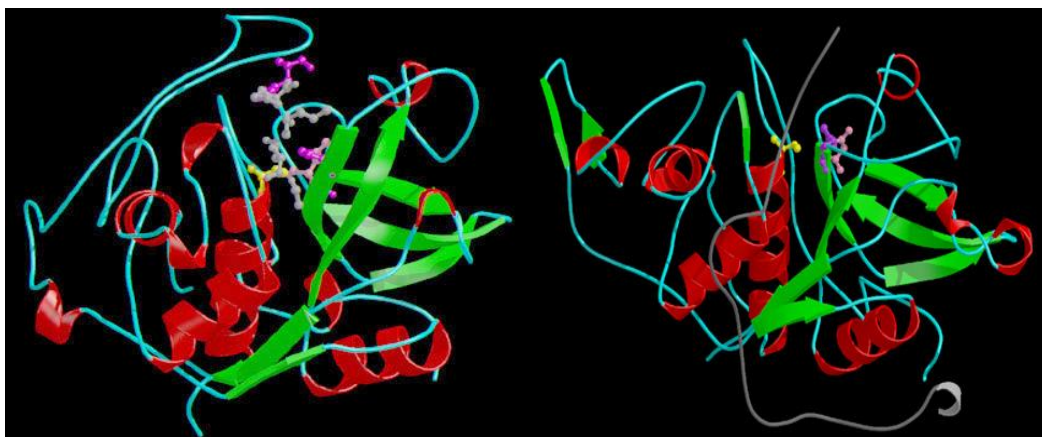
Izražanje katepsina X je omejeno predvsem na celice imunskega sistema, kot so monociti, makrofagi in dendritične celice (22). V imunskih celicah se pro oblika katepsina X nahaja v lizosomih, aktivni katepsin X pa je lokaliziran tudi ob celični membrani. Okoliščine in mehanizem prenosa katepsina X na membrano še ni pojasnjen. Povečano izražanje katepsina X je značilno tudi za tumorske in imunske celice raka prostate (23), pozno obliko gastričnega karcinoma, posebno pri bolnikih, okuženih s *H. pylori* (24) in možganske celice bolnikov z Alzheimer-jevo boleznijo (25).

Vezava katepsina X na heparan sulfat proteoglikane in prisotnost integrin-vezavnih motivov (RGD in ECD motiva) na katepsinu X nam nakazuje, da je njegova funkcija povezana s preko integrinov posredovanim celičnim signaliziranjem in adhezijo ter migracijo celic. Katepsin X deluje na integrinske receptorje tako, da cepi β_2 podenoto le teh, in se tako na različnih stopnjah vpleta v regulacijo delovanja imunskih celic. Dokazano je bilo, da katepsin X postopno odcepi 4 AK na C-koncu citoplazmatskega dela integrinske podenote β_2 in tako vpliva na integrinsko signaliziranje od znotraj navzven. Kljub dejstvu, da cepitev β_2 podenote integrinskih receptorjev poteče, so okoliščine, v katerih pride do cepitve, še nepojasnjene (26).

1.4 Katepsin B

Katepsin B je lizosomska cisteinska proteaza iz družine papaina in njemu podobnih lizosomskih cisteinskih proteaz. Katepsin B je konstitutivno prisoten v vseh celicah in ima široko substratno specifičnost. Genski zapis za človeški katepsin B se nahaja na 8. kromosomu v regiji 22, in se sintetizira kot preprokatepsin B na ribosomih zrnatega endoplazmatskega retikuluma (GER) (27). V Golgijevem aparatu (GA) pride do fosforilacije manoznih ostankov. Vezava fosforiliranega katepsina B na manozna-6-fosfatne receptorje v trans področju GA omogoča transport encima v endosome, ki zorijo v primarne in sekundarne lizosome. Med zorenjem se v lizosomih zniža vrednost pH, kar spodbudi proteolitične cepitve in s tem povezano aktivacijo encima. Najprej se odcepi propeptid in nastane enoverižna, 31 kDa velika oblika. V nekaterih celicah se odcepi dipeptid med mesti 126 in 128 in nastane dvoverižna oblika encima, sestavljena iz lahke (5 kDa) in težke (25/26 kDa) verige, ki sta povezani z dvema disulfidnima vezema. Aktivacija je lahko avtokatalitska in poteče kot bimolekularni proces, v katerem molekule aktivnega katepsina B katalizirajo cepitev proencima (27), lahko pa pri aktivaciji

sodelujejo druge proteaze, npr. katepsin D. Propeptid lahko deluje kot reverzibilni inhibitor katepsina B, vpliva pa tudi na stabilnost encima. Z odcepom propeptida pri nevtralnem ali alkalnem pH postane encim nestabilen in ireverzibilno denaturira (29). Slika 2 prikazuje kristalni strukturi katepsinov B in X.



Slika 2: Kristalni strukturi katepsina B (levo) ter katepsina X. α -vijačnice so obarvane v rdeče, β -strukture so obarvane v zeleno (30).

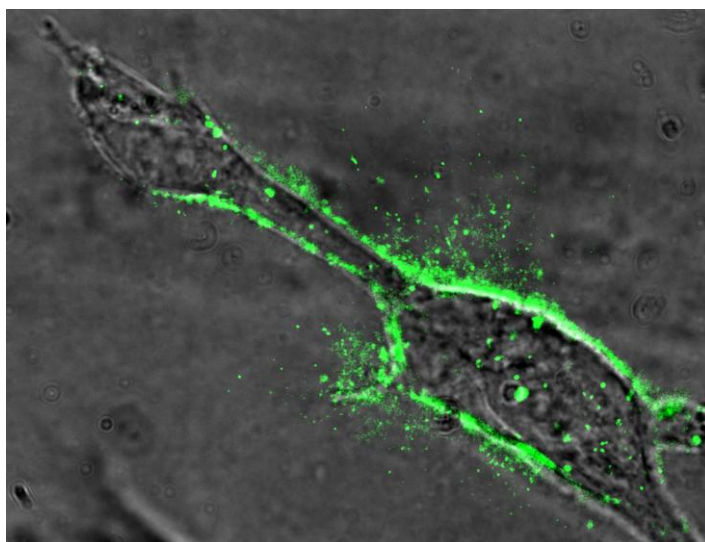
Katepsin B je edinstven med cisteinskimi proteazami, saj lahko deluje kot karboksiptidaza in kot endopeptidaza. Eksopeptidazna aktivnost katepsina B je povezana z 18 AK dolgo zaporno zanko, ki preprečuje dostop velikim polipeptidnim verigam, in z dvema histidinskima preostankoma favorizira vezavo karboksilne skupine na C-koncu substrata. Znano je, da pri kislem pH (4,5-5,5) prevladuje eksopeptidazna aktivnost, pri nevtralnem pH (7,4), pa endopeptidazna aktivnost. Nevtralen pH, ki je značilen za mikrookolje tumorskih celic in prisotnost specifičnih substratov spodbudi destabilizacijo fleksibilne zaporne zanke. Posledica je prehod zaporne zanke v odprto konformacijo, kar omogoča endopeptidazno aktivnost (31).

1.4.1 Izražanje in vloga katepsina B

Izražanje katepsina B je nespecifično, saj se izraža v vseh človeških celicah. Znotraj celice je aktivna oblika katepsina B običajno prisotna v endo-lizosomskih oddelkih (endosomi, lizosomi, multivezikularna telesa). Spremembe lokalizacije in aktivnosti katepsina B so značilne predvsem za tumorske celice. Katepsin B se v teh primerih lokalizira tudi v citosolu, na notranji in zunanji strani citoplazemske membrane, izloča pa se lahko tudi v zunajcelični prostor (31). Povečana ekspresija katepsina B na nivoju mRNA pri tumorskih

celicah je največkrat posledica amplifikacije gena za katepsin B, lahko pa je tudi posledica alternativnega izrezovanja intronov ali uporabe večjega števila promotorjev, ki so regulirani glede na mikrookolje in prisotnost relativnih koncentracij transkripcijskih faktorjev (32).

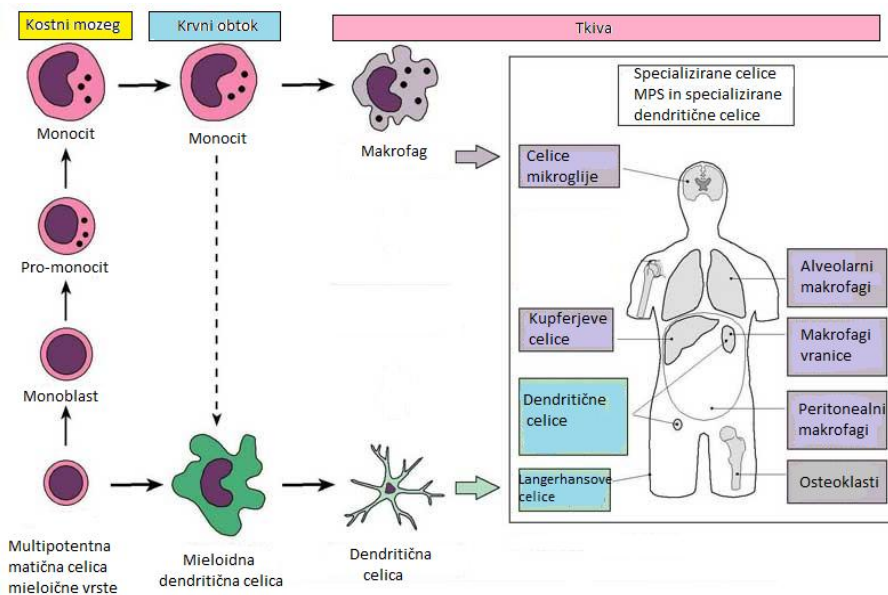
Katepsin B je pomemben za regulacijo ščitničnih hormonov. Vpleta se v razgradnjo kostnega tkiva in je udeležen pri procesiranju antigenov v antigen predstavitvenih celicah. Poleg normalne fiziološke funkcije pa katepsin B sodeluje v številnih patoloških procesih, pri čemer je še posebej pomembna njegova vloga pri razvoju raka. Katepsin B je eden ključnih encimov pri razgradnji zunajceličnega matriksa (ECM), ki je ključen korak pri invaziji ter metastaziranju tumorskih celic. Katepsin B lahko neposredno razgradi nekatere proteine zunajceličnega matriksa (fibronektin, laminin, kolagen tipa I in tipa IV), ali pa sodeluje pri aktivaciji drugih proteaz, ki razgrajujejo komponente ECM (17). Glede na mesto razgradnje poznamo zunajcelično in znotrajcelično razgradnjo ECM (slika 3). Katepsin B sodeluje v razgradnji po obeh poteh. Zunajcelična razgradnja poteka ob membrani tumorske celice. Pri njej sodelujejo proteaze, ki so vezane na membrano ali izločene v zunajcelični prostor. Znotrajcelična razgradnja poteka po predhodni fagocitozi ali endocitozi delno razgrajenega zunajceličnega matriksa v lizosomih ter heterofagosomih (33). Katepsin B ima pomembno vlogo tudi pri angiogenezi in apoptozi ter se tako še dodatno vpleta v razvoj raka (31).



Slika 3: Razgradnja DQ-kolagena tipa IV pri migraciji rakavih celic MCF-10A neoT. Na sliki opazimo zeleno obarvane razgradne produkte kolagena IV, ki se nahajajo znotraj- in zunajcelično, saj potekata tako znotrajcelična, kot tudi zunajcelična razgradnja kolagena (34).

1.5 Cisteinski katepsini pri makrofagih

Makrofagi so celice imunskega sistema, ki nastanejo v procesu diferenciacije monocitov v makrofage. Monociti so bele krvne celice, ki se razvijejo v kostnem mozgu iz multipotentne matične celice. Razvoj gre preko večih stopenj, in sicer: monoblasta, mielocita do monocita. Diferenciacija teh stopenj je regulirana z delovanjem številnih rastnih faktorjev. Monociti iz kostnega mozga vstopijo v krvni obtok, kjer ostanejo do trenutka, ko vstopijo v tkiva, ter se prične diferenciacija v makrofage ali dendritične celice (DC) (35). V primeru infekcije pa monociti hitro potujejo na mesto infekcije v tkivu, kjer se diferencirajo v tkivne makrofage. Diferenciacija se začne s prehodom monocita preko endotelijske membrane. Nadalje na diferenciacijo monocitov vplivajo številni dejavniki, med katerimi so najpomembnejši M-CSF (makrofagne kolonije stimulirajoči faktor), GM-CSF (granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči faktor), interleukin-4 ter interleukin-6. Za diferenciacijo v makrofage sta posebej pomembna M-CSF in interleukin-6 (36). Diferenciacija monocitov v makrofage privede do sprememb v velikosti in obliki celic, spremeni se površina celic, poveča pa se sposobnost makrofagov za sodelovanje v kompleksnem imunskem odgovoru na tujek v tkivu (35).



Slika 4: Shematski prikaz diferenciacije makrofagov in dendritičnih celic. Slika prikazuje proces diferenciacije iz multipotentne matične celice mieloične vrste v makrofag oz. dendritično celico preko vmesnih stopenj (povzeto po 37).

Makrofagi so prisotni v večini tkiv organizma, kjer imajo ključno vlogo pri imunskem odzivu in obnavljanju tkiva. Med najpomembnejše funkcije makrofagov spadata fagocitoza tujkov in razpadnih produktov celic ter aktivacija limfocitov T in drugih celic, ki sodelujejo v imunskem odgovoru. Poleg omenjenih fizioloških funkcij je vdor makrofagov v tkiva povezan z bolezenskimi procesi, kot so kronično vnetje, ateroskleroza, nevrodegenerativne motnje in napredovanje raka. Zaradi tega so mehanizmi vdora ali invazije makrofagov v tkiva tarča številnih raziskav (38).

Eden od mehanizmov, ki ga makrofagi uporabljajo pri prebijanju skozi ECM, je proteolitična razgradnja proteinov ECM. Invazija, ki vključuje proteolitično razgradnjo, je dobro raziskana pri tumorskih celicah, kjer je skoraj v celoti odvisna od metaloproteaz (MMPs-metalloproteinases) MMP9, MMP13 in MMP14 (MT1-MMP) (39). Številne raziskave, pa so potrdile, da inhibicija ali izbitje genov za MMPs pri makrofagih ne prepreči proteolitične invazije, kar kaže na vpletenost drugih proteaz, in sicer najverjetneje lizosomskih proteaz. Ena od predlaganih možnosti je, da proteolitično invazijo makrofagov omogočajo cisteinski Katepsini (40). To domnevo potrjuje dejstvo, da je izbitje genov za Katepsina S in B pri mišjih makrofagih omejilo zmožnost invazije skozi modelni ECM (41).

Na splošno je vloga cisteinskih Katepsinov v makrofagih slabo raziskana. Nedavne raziskave so pokazale, da je Katepsin B vpleten v znotrajcelični vezikularni transport TNF- α na plazemsko membrano. TNF- α oz. dejavnik tumorske nekroze alfa spada v skupino citokinov, ki posredujejo in uravnavajo prirojen imunski odziv ter diferenciacijo celic. TNF- α pa lahko sodeluje tudi pri indukciji apoptoze in vnetja ter zaviranju nastanka tumorjev (42). Pri diferenciaciji monocitov v makrofage pride do premestitve Katepsina X iz notranjosti celice v področja ob plazemski membrani. Katepsin X se pomembno vpleta v modulacijo delovanja makrofagov, in sicer preko interakcij z β_2 podenoto integrinskih receptorjev, pri čemer je najpomembnejši receptor Mac-1. Katepsin X preko interakcij z Mac-1 regulira celično adhezijo makrofagov, vpliva na fagocitozo, in antigensko predstavitev pri makrofagih. Vloga Katepsina X pri fagocitozi še ni popolnoma pojasnjena (26).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

V okviru diplomskega dela, bomo spremljali znotrajcelično premeščanje in aktivnost Katepsinov X in B po diferenciaciji monocitne celične linije U937 v makrofage.

- a) Vpliv diferenciacije celic U937 na koncentracijo Katepsinov X in B bomo ovrednotili z imunoencimskim testom na trdi podlagi (direktna ELISA).
- b) Vpliv diferenciacije celic U937 na spremembo aktivnosti Katepsinov X in B bomo ovrednotili z razgradnjo specifičnih fluorogenih substratov ter z označevalnim inhibitorjem cisteinskih Katepsinov DCG-04.
- c) Vpliv diferenciacije celic U937 na prenos Katepsinov X in B proti plazemski membrani bomo analizirali s pretočno citometrijo.
- d) S fluorescenčno konfokalno mikroskopijo bomo analizirali vpliv diferenciacije U937 na:
 - znotrajcelično lokalizacijo Katepsinov X in B;
 - kolokalizacijo Katepsina X s specifičnimi celičnimi označevalci;
 - kolokalizacijo različnih cisteinskih Katepsinov med sabo.

Za cisteinske Katepsine je znano, da se pri določenih fizioloških in bolezenskih procesih premestijo iz lizosomov na različne znotrajcelične lokacije, in da se spremeni njihova encimska aktivnost. Naša hipoteza je, da proces diferenciacije celične linije U937 iz monocitov v makrofage povzroči spremembe v izražanju, aktivnosti in znotrajcelični lokalizaciji Katepsinov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

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

REAGENT	PROIZVAJALEC
Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH	Bachem, Basel, Švica
akrilamid 40 %	Sigma, Saint Louis, ZDA
kunčja protimišja protitelesa označena z barvilom Alexa Fluor™ 488	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
oslovska protimišja protitelesa označena z barvilom Alexa Fluor™ 555	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
kozja protikunčja protitelesa označena z barvilom Alexa Fluor™ 488	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
oslovska protikunčja protitelesa označena z barvilom Alexa Fluor™ 555	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
amonijev persulfat ($\geq 98\%$)	Fluka, Buchs, Švica
»antifade« reagent 2 mL	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
AMS 36	prispeval M. Bogyo (Stanford University)
Bradfordov reagent	Sigma, Saint Louis, ZDA
BSA ($\geq 95,0\%$)	Sigma, Saint Louis, ZDA
$C_6H_8O_7 \times H_2O$ ($\geq 99,5\%$)	Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
CA-074 metilni ester	Bachem, Basel, Švica
CLIK 148	prispeval prof. Nobuhiko Katunuma
Coomassijevo briljantno modro (CBB)	Thermo Scientific, Waltham, ZDA
Kolera toxin (označevalec za lipidne rafte)	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
DAB	Sigma, Saint Louis, ZDA
DCG-04	prispeval M. Bogyo (Stanford University)
DMEM	ICN Biomedicals Inc., Irvine, ZDA
DMSO ($\geq 99,5\%$)	GibcoBRL (Invitrogen)
Dulbecco's PBS	Sigma, Saint Louis, ZDA
E Cadherin (celični označevalec)	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
EDTA 0,5M	Promega, Madison, ZDA
EDTA-Na ₂	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
EEA-1 (celični označevalec)	Abcam, Cambridge, Velika Britanija

etanol (70 %, 96 %)	Riedel-deHaën, Seelze, Nemčija
FCS	Thermo Scientific, Waltham, ZDA
formalin (10 %)	Sigma, Saint Louis, ZDA
glicerol	Fluka, Buchs, Švica
glicin (99,7-101 %)	Fluka, Buchs, Švica
HCl (37-38 %)	Merck, New Jersey, ZDA
H ₂ SO ₄ , 2M	Sigma, Saint Louis, ZDA
H ₂ O ₂ (30 %)	CarlRoth, Karlsruhe, Nemčija
KCl (≥ 98,5 %)	Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
Klatrin (celični označevalec)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, ZDA
KH ₂ PO ₄ (≥ 99,0 %)	Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
LAMP-1 (celični označevalec)	Abcam, Cambridge, Velika Brtanija
L-glutamin	ICN Biomedicals Inc., Irvine, ZDA
metanol (≥ 99,8 %)	Merck, New Jersey, ZDA
NaN ₃ (≥ 99,0 %)	Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
Na ₂ CO ₃ (≥ 99,0 %)	Kemika, Zagreb, Hrvaška
NaCl (≥ 99,8 %)	Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
NaDS (≥ 99,0 %)	Sigma, Saint Louis, ZDA
NaCl (≥ 99,8 %)	Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O (98,0-100,5 %)	Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
NaHCO ₃ (≥ 99,7 %)	Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
NaDS (≥ 99,0 %)	Fluka, Buchs, Švica
nigrozin	Sigma, Saint Louis, ZDA
penicilin/streptomycin	Euro Clone, Milano, Italija
PMA	Sigma, Saint Louis, ZDA
RAB-7 (celični označevalec)	Abcam, Cambridge, Velika Brtanija
RAB-11(celični označevalec)	Abcam, Cambridge, Velika Brtanija
RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
SeeBlue Plus2 PreStained Standard	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
streptavidin peroksidaza	Sigma, Saint Louis, ZDA
SuperSignal West Dura Extended duration Substrate (kemilumniscenčni substrat)	Thermo Scientific, Waltham, ZDA
TEMED (≥ 99,0 %)	Sigma, Saint Louis, ZDA
TMB	Sigma, Saint Louis, ZDA
tris (≥ 99,5 %)	Serva, Saint Louis, ZDA
triton X-100 (≥ 99,5 %)	Sigma, Saint Louis, ZDA
Tween 20	Sigma, Saint Louis, ZDA
Z- ArgArg-pNa.2HCl (substrat za CTSB)	Biocompare, San Francisco, ZDA

3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica III: Laboratorijska oprema, katero smo uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njen proizvajalec.

OPREMA	TIP IN PROIZVAJALEC
analizna tehtnica	EXACTA 610 EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija
aparature za NaDS PAGE	Mini-PROTEAN 3, Bio-Rad, Hercules, ZDA Protean II xi Cell, Bio-Rad, Hercules, ZDA
aparatura za določanje kemilumniscence	GBOX iChemi, Syngene, VB
avtomatski spiralec za mikrotitrne plošče	Columbus TECAN M8/2R, Mannendorf, Švica
avtoklav	A-63CV Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
celični inkubator	CB 210, BINDER, Tuttlingen, Nemčija
celična centrifuga	StatSpin Cytofuge, Iris, Chatsworth, ZDA
centrifuge	Sorvall RT7, GMI, ZDA Eppendorf 5804R, Hamburg, Nemčija Eppendorf 5415R, Hamburg, Nemčija
čitalec mikrotitrskih plošč	TECAN Safire ² , Tecan, Mannendorf, Švica
gojiščne platenke	TPP, Trasadingen, Švica
hladilnik (+4 °C)	LTH, Škofja Loka, Slovenija
komora z laminarnim pretokom zraka	PIO SMBC 183 AV, Iskra, Ljubljana, Slovenija LFVP 9, Iskra, Ljubljana, Slovenija
konfokalni mikroskop	Carl Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Oberkochen, Nemčija
magnetno mešalo	Roamix 550 MM, Tehtnica, Železniki, Slovenija
mikrotitrne plošče	Corning Costar, Saint Louis, ZDA
multikanalne pipete	Biohit, Helsinki, Finska
pH meter	HANNA HI932, Sigma, Saint Louis, ZDA
pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
pretočni citometer	FACS Calibur, BD Bioscience, New Jersey, ZDA
PVDF membrana	CarlRoth, Karlsruhe, Nemčija
spektrofotometer	Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, ZDA
stresalnik	Vibromix 403, Tehtnica, Železniki, Slovenija
suhi inkubator	WTB, Binder, Tuttlingen, Nemčija
ultrafiltracijska posoda	Amicon membrana YM3, Millipore, Bedford, ZDA
ultrazvočni homogenizator	Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole-Parmer Instrument, Vernon Hills, ZDA
vibracijsko mešalo (vortex)	Vibromix 104EV, Tehtnica, Železniki, Slovenija
zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje, Velenje, Slovenija

3.1.3 Gojišča

➤ *Kompletno gojišče RPMI (gojišče za celice U937)*

- 88 ml RPMI 1640 gojišča
- 10 ml FCS
- 1 ml L-glutamina
- 1 ml penicilina/streptomicina

3.1.4 Raztopine in pufri

3.1.4.1 Pufri in raztopine za NaDS PAGE in prenos Western

10-kratni elektroforezni pufer (pH 8,3):

- 29,0 g Tris baze
- 144,0 g glicina
- 10,0 g NaDS

Dopolnimo z dH₂O do 1 l. Pred uporabo pufer redčimo 10-krat z dH₂O.

Nanašalni pufer:

- 2,5 ml 0,5 M Tris HCl (pH 6,8)
- 2,0 ml glicerola
- 4,0 ml 10 % (m/v) NaDS
- 0,5 ml 0,1 % (m/v) bromfenol modro

Dopolnimo z dH₂O do 10 ml.

Pufer za prenos Western:

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

Dopolnimo z dH₂O do 1 l.

3.1.4.2 Pufri za ELISA test:

Pufer A:

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

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

Pufer B (za spiranje mikrotitrne ploščice pri testu ELISA)

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

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

Pufer C:

- 2 g BSA/100 ml pufra B

Pufer D (substratni pufer za TMB)

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

Dopolnimo z dH_2O do 1 l in uravnamo pH na 6.

3.1.4.3 Ostali pufri

PBS (fosfatni pufer z dodatkom NaCl):

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

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

Lizirni pufer (za lizo celic in ekstrakcijo proteinov iz celic)

- 200 ml fosfatnega pufra
- 0,8775 g NaCl
- 500 μl Triton X-100
- 1600 μl EDTA- Na_2

3.1.5 Celice

3.1.5.1 Celična linija U937

Pri delu smo uporabili celično linijo U937-človeške pro-monocitne celice, ki po stimulaciji s forbolnim estrom (PMA) diferencirajo do monocitov oz. makrofagov in so dober *in vitro* model za študij le-teh.

3.1.5.2 Odmrzovanje celic

Celice, shranjene v tekočem dušiku, smo hitro odtalili v vodni kopeli ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). S tem smo preprečili toksične učinke DMSO v gojišču za zamrzovanje. Odmrznjene celice smo prenesli v 10 ml gojišča in jih centrifugirali 5 min pri 1000 obr/min. Supernatant smo zavrgli, celice pa smo resuspendirali v svežem gojišču ter jih prenesli v gojiščno platenko. Sveže gojišče smo predhodno segreli na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.5.3 Gojenje in diferenciacija celic

Celice U937 smo gojili v gojišču RPMI 1640, kateremu smo dodali 10 % FCS, 2 mM L-glutamin ter antibiotik penicilin/streptavidin. Gojenje je potekalo v gojiščnih platenkah pri temperaturi $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, v atmosferi, nasičeni z vlago in z 5 % CO_2 v celičnem inkubatorju. Vsake 3 dni smo zamenjali gojišče, pri čemer smo celice prilepljene na dno gojiščne posode, najprej sprali s PBS pufrom, dodali 0,02 % EDTA v PBS ter inkubirali približno 10 min pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Celice smo nato opazovali pod invertnim mikroskopom, ter jim po odlepljanju od podlage dodali sveže gojišče. Vsebino gojiščne platenke smo prenesli v centrifugirko, centrifugirali 5 min pri 2000 obr./min, odlili supernatant in celice resuspendirali v svežem kompletnem gojišču RPMI. Na tem mestu smo odvzeli količino celic, ki smo jo potrebovali za določen eksperiment (predhodno smo jih prešteli), ostale pa vrnili v gojiščno platenko, vse skupaj pa nazaj v inkubator. Pri nediferenciranih celicah spiranje s PBS ter dodajanje 0,02 % EDTA v PBS nista bila potrebna, saj prilepljanja na podlago ni bilo.

Diferenciacijo U937 smo izvedli s forbolnim estrom PMA, ki je povzročil diferenciacijo pro-monocitov U937 v makrofage. Diferenciacija je potekala tako, da smo gojišče s celicami U937 prenesli v centrifugirko, centrifugirali 10 min pri 2000 obr./min, odlili supernatant in dodali svež medij RPMI. Nato smo dodali še ustrezno količino 50 mM

PMA, potrebnega za diferenciacijo, premešali na vibrirajočem mešalniku, vsebino prenesli v gojiščno plastenko in inkubirali 24 h pri 37 °C v celičnem inkubatorju.

3.1.5.4 Štetje celic

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

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

N.....število celic na ml gojišča

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

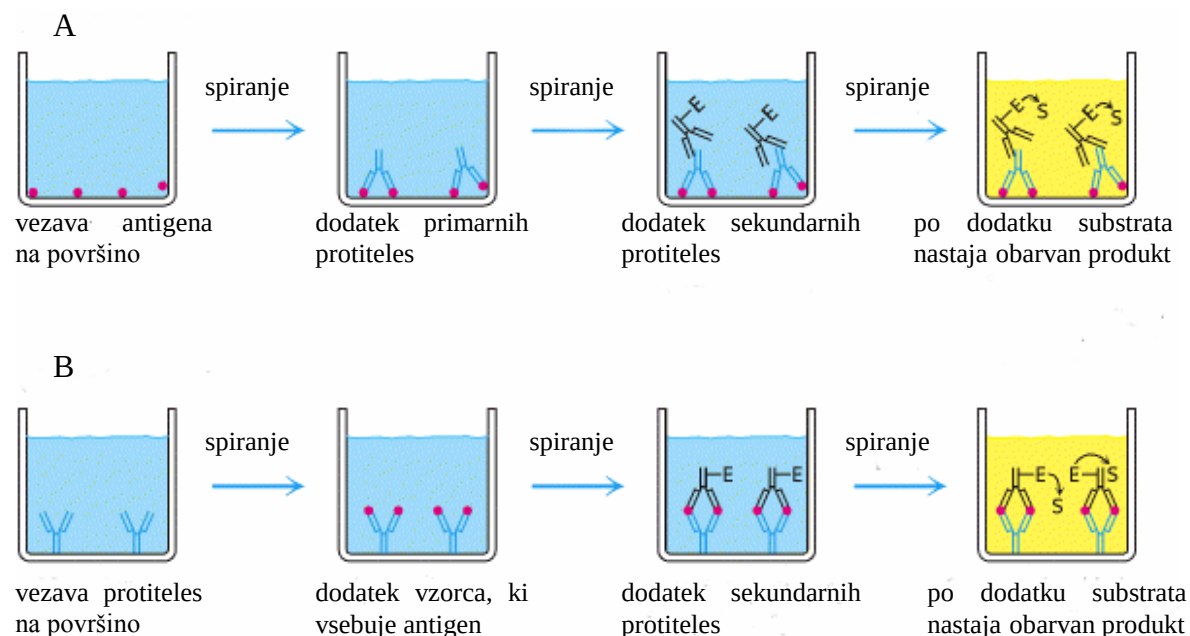
3.1.5.5 Zamrzovanje celic

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

3.2 METODE

3.2.1 Imunoencimski test na trdni podlagi (ELISA)

ELISA (angl. Enzyme-linked immunosorbent assay) je imunska tehnika, ki se uporablja za dokazovanje prisotnosti antigena ali protiteles v vzorcu. Eno izmed protiteles mora biti specifično za antigen, drugo pa reagira s kompleksom antigen-protitelo in ima vezan encim, ki povzroči nastanek kromogenega, luminiscenčnega ali fluorogenega produkta. Metoda je primerna za določanje koncentracije protiteles ali antigena ob uporabi standarda in umeritvene krivulje (43).



Slika 5: Indirektna (A) in direktna (B) ELISA. Na sliki je shematski potek indirektna ter direktne ELISA (43).

3.2.1.1 Direktna (Sendvič) ELISA

Pri testu direktna ELISA (slika 5B) na trdni nosilec najprej vežemo primarna protitelesa, katera nato izpostavimo preizkusnemu vzorcu, ki vsebuje tarčni antigen. Imunskemu kompleksu nato dodamo sekundarna protitelesa, ki so konjugirana z encimom hrenovo peroksidazo. Sledi dodatek kromogenega substrata, ki ob prisotnosti hrenove peroksidaze prehaja v obarvan produkt. Ta test smo uporabili za merjenje koncentracije katepsinov X in B v lizatih celične linije U937. Pri testu ELISA za katepsin X smo merili le koncentracijo aktivnega encima, ker smo uporabili primarna protitelesa, ki prepoznajo le aktivno obliko

katepsina X. S testom ELISA za katepsin B, smo ovrednotili celokupno koncentracijo katepsina B, vključno s pro-obliko (31).

3.2.1.2 Priprava vzorcev

Določeno število celic smo prenesli v centrifugirke in jih centrifugirali 5 min pri 2000 obr./min. Supernatant smo nato zavrgli, sedimentu pa dodali lizirni pufer, premešali na vibracijskem mešalu in vse skupaj zamrznili na -80 °C. Sledila je homogenizacija vzorcev z ultrazvočnim homogenizatorjem, nato pa smo vzorce centrifugirali 20 min na 4 °C pri 13200 obr./min. Supernatant smo po centrifugiranju prenesli v nove mikrocentrifugirke, usedlino pa zavrgli. Tako pripravljene celične lizate smo shranjevali na -20 °C.

3.2.1.3 Določanje celokupnih proteinov z metodo po Bradfordu

Metoda po Bradfordu temelji na merjenju absorbance modro obarvanega produkta, ki se razvije po dodatku barvila Coomassijevo briljantno modro (CBB) vzorcem, če le ti vsebujejo proteine. Absorbanco merimo pri valovni dolžini 595 nm, kjer je absorpcijski maksimum CBB. Za pripravo umeritvene krivulje uporabimo raztopino BSA v lizirnem pufru (pH 5,5).

Metodo smo izvajali v mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami. Pripravili smo standardne raztopine BSA v lizirnem pufru s koncentracijami 3, 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025 in 0 mg/ml. V vdolbinice smo nanесли po 10 µl vsakega standarda in ustrezno redčenega vzorca ter dodali 200 µl reagenta CBB. Po približno 10 min smo izmerili absorbanco na čitalcu mikrotitrskih plošč Tecan Safire. Iz izmerjenih vrednosti standardov smo določili umeritveno krivuljo. Na podlagi umeritvene krivulje in izmerjenih vrednosti absorbance posameznega vzorca, pa smo izračunali koncentracijo proteinov v vsakem vzorcu.

3.2.1.4 Izvedba ELISA testa

Najprej smo v vdolbinice mikrotitrške plošče odpipetirali po 100 µl raztopine primarnih protiteles in jih inkubirali čez noč pri 4 °C. Pri določanju katepsina X smo uporabili raztopino mišjih monoklonskih protiteles 2F12 proti katepsinu X v pufru A s koncentracijo 10 µg/ml. Pri določanju katepsina B smo uporabili raztopino kunčjih poliklonskih protiteles proti katepsinu B v pufru A s koncentracijo 5 µg/ml. Naslednji dan smo ploščo najprej sprali z avtomatskim spiralcem Tecan. V vdolbinice smo nato odpipetirali po 150 µL pufru C in inkubirali pri sobni temperaturi 30 min. V tem času smo vzorce s pufrom C

razredčili na enako koncentracijo celokupnih proteinov in pripravili standardne raztopine, za katere smo uporabili rekombinantna Katepsina X in B v pufru C. Sledilo je ponovno spiranje plošče, nato pa smo v vdolbinice odpipetirali po 100 µl standardov in vzorcev ter vse skupaj inkubirali 2 h pri 37 °C. Ploščo smo spet sprali, dodali po 100 µl sekundarnih protiteles in inkubirali 2 h pri 37 °C. Za Katepsin X smo kot sekundarna protitelesa uporabili protitelesa 3B10, označena s hrenovo peroksidazo, ki smo jih redčili v razmerju 1:1000 v pufru C. Za Katepsin B smo uporabili ovčja poliklonska protitelesa proti Katepsinu B, ki smo jih redčili v pufru C v razmerju 1:2500. Po ponovnem spiranju smo v vdolbinice odpipetirali po 200 µl raztopine TMB in substratnega pufra za TMB v razmerju 1:2, pustili nekaj minut, na koncu pa reakcijo prekinili s 50 µl 2M H₂SO₄. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 450 nm na aparatu Tecan Safire². Iz izmerjenih vrednosti standardov smo določili umeritveno krivuljo. Na podlagi umeritvene krivulje in izmerjenih vrednosti absorbance posameznega vzorca, pa smo izračunali koncentracijo Katepsinov X in B v posameznih vzorcih.

3.2.2 Fluorescenčna konfokalna mikroskopija

Fluorescenčna konfokalna mikroskopija je imunofluorescenčna tehnika, s pomočjo katere lahko zanesljivo določimo lokalizacijo antigena v vzorcu, saj je detekcija omejena na posamezno točko v vzorcu, omogočena pa je tudi kolokalizacija posameznih antigenov brez interference signalov (43). Konfokalna mikroskopija je nadgradnja klasične fluorescenčne mikroskopije. Pri fluorescenčni mikroskopiji se svetloba, ki jo oddajajo molekule v ravnini gledanja, pomeša s svetlobo, ki jo oddajajo molekule v drugih ravninah, zato na koncu dobimo nejasno sliko. Pri konfokalnem mikroskopu ne osvetljujemo celotnega preparata hkrati, pač pa ga z laserskim žarkom pregledujemo po točkah v določeni optični ravnini. Vzbujeno fluorescentno svetlobo iz posameznih točk sprejme detektor, ki informacijo s pomočjo računalnika pretvori v sliko. Skeniranje preparata v izbrani ravnini z nastavljivo globino omogočata dve zaslonki z zelo majhnima odprtinama. Nameščeni sta v gorišču za lečo objektiva, konfokalno. Prva zaslonka je nameščena za izvorom svetlobe in omogoča osvetljevanje preparata le v izbrani točki v nekem trenutku. Druga zaslonka je nameščena pred detektorjem in prepreči vstopanje fluorescentne svetlobe, ki izhaja iz območij preparata zunaj gorišča (44).

3.2.2.1 Priprava preparatov

Celice U937 smo nacepili na mikrotitrsko ploščo s 24 vdolbinicami, v katere smo pred tem položili krovna stekelca. Po diferenciaciji s PMA (24 h) smo odstranili gojišče in nadaljevali postopek priprave preparatov tako, da smo vse reagente dodajali v vdolbinice.

Nediferencirane celice U937 smo centrifugirali (7 min pri 13000 obr./min) s Cytospinom, kar je omogočilo pritrditev celic na objektno steklo. Objektno steklo smo predhodno obrobili s posebno hidrofobno snovjo (Dako Pen), da ni prišlo do razlitja reagentov, ki smo jih v tem primeru dodajali direktno na objektno steklo.

Vse postopek smo izvajali pri sobni temperaturi. Celice smo najprej sprali z 1 ml PBS (pH 7,4), nato pa smo dodali 500 µl 10 % raztopine formalina. Formalin je premrežil proteine in celice fiksiral na površino. Počakali smo približno 45 min in nato vse celice narahlo sprali z 1 ml PBS. V naslednjem koraku smo izvedli permeabilizacijo celic z dodatkom 500 µl 0,1 % Triton X-100 v PBS ter pustili stati točno 10 min. Permeabilizaciji je sledilo ponovno spiranje s PBS in blokada vseh prostih nespecifičnih vezavnih mest, ki smo jo izvedli tako, da smo celicam dodali 500 µl 3 % BSA v PBS, in inkubirali približno 30 min. Po blokadi smo izvedli barvanje s primarnimi protitelesi, ki smo jih pripravili z redčenjem v 3 % BSA v PBS do končne koncentracije 5 µg/ml (poliklonska) ali 10 µg/ml (monoklonska). Primarna protitelesa, ki smo jih uporabili, so bila: mišje monoklonsko protitelo 2F12 proti Katepsinu X ter mišje monoklonsko protitelo 3E1 proti Katepsinu X. Primarnim protitelesom smo dodali tudi celične označevalce, ki so specifični za določene predele celice. Celicam smo dodali po 250 µl primarnih protiteles in inkubirali 2 h pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo preparate 3-krat sprali z 1 ml PBS in pripravili sekundarna fluorescenčno označena protitelesa, ki smo jih redčili v raztopini 3 % BSA v PBS v razmerju 2:1000.

Na vsak preparat smo odpipetirali po 200 µl raztopine ustreznih sekundarnih protiteles in inkubirali na sobni temperaturi 2 h. Na koncu smo spet 3-krat spirali z 1 ml PBS in preparate posušili na zraku.

Pri preparatih nediferenciranih celic smo na objektna stekla kanili kapljico reagenta »antifade«, ki preprečuje razbarvanje fluorescenčnih barvil, nato pa nanj položili čisto krovno stekelce. Pri preparatih z diferenciranimi celicami, smo uporabili čisto objektno steklo, na katerega smo kanili kapljico »antifade« reagenta in nato nanj položili krovno stekelce s celicami tako, da so bile le-te med obema stekelcema. Na koncu smo krovna stekelca oblepili z lakom za nohte in tako dobili trajne preparate.

3.2.2.2 Analiza preparatov

Pri analizi preparatov smo vse lokalizacije/kolokalizacije posneli z invertnim konfokalnim mikroskopom Carl Zeiss LSM 510 na Inštitutu za patološko fiziologijo na Medicinski fakulteti. Vzorce, označene z barvilom Alexa Fluor⁴⁸⁸, smo obsevali s svetlobo argonskega laserja λ 488 nm, oddano svetlobo smo filtrirali v območju 505–530 nm. Vzorce, označene z barvilom Alexa Fluor⁵⁵⁵ in Alexa Fluor⁶³³, smo obsevali s svetlobo He/Ne laserja λ 546 nm in 633 nm, oddano svetlobo pa smo filtrirali z filtrom LP 560 nm in LP 650 nm. Dobljene podatke smo analizirali s programsko opremo Carl Zeiss LSM image software 3.0. Odstotek kolokalizacije smo izračunali tako, da smo primerjali % kolokaliziranega CTSX, glede na celokupni CTSX v preučevani celici. Za vsak vzorec smo analizirali 5 celic.

3.2.3 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je posebna imunofluorescenčna tehnika štetja in preučevanja mikroskopskih delcev, ki so suspendirani v toku tekočine, in eden za drugim potujejo v letem. Laserski žarek osvetljuje posamezno celico, ki potuje v ozkem toku tekočine. V primeru, da celica vsebuje fluorokrom, se ta vzbudi ter odda svetlobo specifične valovne dolžine, kar zazna fluorescenčni detektor. Obenem se začetni žarek zaradi prisotnosti celice odkloni in nam poda informacije o velikosti celice ter njeni granularnosti (informacije o notranji zgradbi celice). Detektorja, ki zaznata te spremembe sta FSC in SSC detektor. Podatke nato predstavimo v obliki frekvenčnega diagrama, ali pa dvodimenzionalnega grafičnega prikaza (43, 44). FACS pretočna citometrija se lahko uporablja za: natančno določanje deleža posamezne populacije celic v vzorcu (za majhne populacije); določanje ekspresije antigenov v populaciji celic, ki so označene s specifičnimi fluorescenčno označenimi protitelesi (fenotipizacija); omogoča sočasno označevanje več celičnih označevalcev z uporabo različno označenih specifičnih protiteles (43).

3.2.3.1 Izvedba

S pretočno citometrijo smo analizirali količino katapsinov X in B na površini celic U937. Vzorce smo pripravili tako, da smo celice prenesli v 50 ml centrifugirke, ter jih centrifugirali 5 min pri 3000 obr./min. Po centrifugiranju smo celice fiksirali z dodatkom 10 % raztopine formalina ter jih po 20 min sprali s pufrom PBS. Po spiranju smo celice ponovno centrifugirali 5 min pri 3000 obr./min ter odstranili PBS. Celicam smo dodali po

100 µl raztopine primarnih protiteles, označenih s fluorokromom. Za določanje Katepsina X smo uporabili mišja monoklonska protitelesa 3B10⁴⁸⁸ medtem, ko smo za določanje Katepsina B uporabili mišja monoklonska protitelesa 3E1⁴⁸⁸. Inkubacija s primarnimi protitelesi je trajala 1 h pri sobni temperaturi. Celice smo nato 2-krat sprali s PBS in vzorce analizirali s pretočnim citometrom FACSCalibur.

3.2.4 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS PAGE)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS) je analizna elektroforezna metoda za ločevanje proteinov in peptidov. NaDS je anionska površinsko aktivna molekula, ki se nespecifično veže na proteine in jih denaturira. Ker ima NaDS negativni naboj, bodo negativno nabiti tudi proteini, zato v električnem polju vse molekule potujejo proti pozitivno nabiti anodi. Razmerje med nabojem in dolžino verige v kompleksu z NaDS je za vse proteine enako, zato imajo enako elektroforetsko mobilnost. Ločba proteinov se vrši izključno zaradi premreženosti separacijskega gela, hitrost potovanja pa je obratno-sorazmerna velikosti proteinov. Večji bodo zaradi večjega upora nosilca potovali počasneje od manjših (43).

NaDS elektroforeza poteka v gelskem matriksu, ki nastane po polimerizaciji akrilamida in *N,N'*-metilenbisakrilamida. Polimerizacija običajno poteče v prisotnosti prostih radikalov, katerih vir je običajno APS, stabilizira pa jih TEMED. Poliakrilamidna elektroforeza poteka navpično in jo običajno izvajamo v diskontinuiranem sistemu, sestavljenem iz dveh različno koncentriranih gelov. Zgornji, koncentracijski gel je manj zamrežen od spodnjega, separacijskega in ne ovira gibanja molekul, zato v njem ne pride do ločevanja molekul. Tako dosežemo, da vsi proteini naenkrat vstopijo v separacijski gel, s čimer preprečimo razpotegnjenost in prekrivanje lis. Vzorce nanašamo v t.i. žepke na vrhu gela (45).

Detekcijo proteinov po ločitvi na poliakrilamidnem gelu lahko izvajamo na več načinov. Pri našem delu smo za detekcijo po elektroforezni ločbi izbrali prenos Western, ki mu je sledila inkubacija s primarnimi in sekundarnimi protitelesi. Po inkubaciji smo na našo PVDP membrano dodali kemilumniscenčni substrat ter opazovali spremembo kemilumniscence z G-Boxom.

3.2.4.1 Izvedba NaDS PAGE

3.2.4.2 Priprava gelov:

Najprej smo sestavili aparaturo za vlivanje gela. Okvir smo postavili na ravno površino in vanj vstavili stekelci z distančnikom med njima ter ga postavili na stojalo za polimerizacijo. Nato smo pripravili raztopino 15 % separacijskega gela. Takoj po dodatku 10 % amonijevega persulfata in TEMED-a smo 3,3 ml separacijskega gela vlili med stekelci ter dodali izopropanol za izravnavo gladine. Po strditvi gela smo izopropanol odlili ter dodali raztopino 5 % koncentracijskega gela ter vstavili glavniček za jamice. Po strditvi gela smo glavniček previdno odstranili, da ne bi poškodovali jamic za nanos vzorcev. Sestava gelov je opisana v preglednici IV.

Preglednica IV: Sestava gelov za izvedbo NaDS PAGE. V preglednici so našteje sestavine obeh gelov ter njihova količina.

15 % SEPARACIJSKI GEL		5 % KONCENTRACIJSKI GEL	
40 % akrilamid	37,5 ml	40 % akrilamid	1,88 ml
1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8)	25 ml	1,5 M Tris-HCl (pH = 6,8)	1,95 ml
destilirana voda	35 ml	destilirana voda	10 ml
10 % NaDS	1,25 ml	10 % NaDS	150 µl
10 % APS*	1,25 ml	10 % APS*	150 µl
TEMED*	21,3 µl	TEMED*	15 µl

*dodamo tik pred vlivanjem gela

3.2.4.3 Priprava vzorcev:

Vzorci smo predhodno pobarvali z označevalcem aktivnosti DCG-04, ki se kovalentno veže v aktivno mesto cisteinskih Katepsinov. Celične lizate (100 µg) in encime (1 µg) smo, v prisotnosti 10 µM DCG-04, inkubirali 1 h pri 37 °C. Pri nekaterih izvedbah smo vzorce pred dodatkom DCG-04 inkubirali (2 h pri 37 °C) s CA-074 (specifični inhibitor Katepsina B) ali AMS 36 (specifični inhibitor Katepsina X), ki naj bi preprečila vezavo DCG-04 v aktivna mesta inhibiranih encimov. Po inkubaciji z DCG-04 smo vzorcem dodali ustrezno količino nanašalnega pufra ter jih 10 min kuhali v vodni kopeli pri 100 °C, da je prišlo do denaturacije proteinov. Na vsak gel smo, poleg vzorcev, nanesti tudi označevalec velikosti proteinov.

3.2.4.4 Elektroforeza:

Strjen gel smo skupaj s stekelcema prenesli v aparaturu za NaDS elektroforezo ter notranji in zunanji rezervoar napolnili z elektroforeznim pufrom za NaDS PAGE (pH 8,3). V žepke smo nanесли ustrezno količino vzorca in označevalca velikosti proteinov. Elektroforezo v majhni elektroforezni aparaturi smo izvajali najprej pri električni napetosti 80 V, po prihodu vzorcev v separacijski gel, pa smo napetost povečali na 100 V. V veliki aparaturi je bila na začetku električna napetost 100 V, kasneje pa smo jo povišali na 300 V. Elektroforezo smo izvajali toliko časa, da je elektroforezna fronta pripotovala skoraj do konca gela. Nato smo aparaturu previdno razstavili ter izvedli prenos Western.

3.2.4.5 Prenos Western:

Prenos Western smo izvajali na posebni aparaturi med dvema elektrodama. Izrezali smo filter papir in membrano PVDF enakih dimenzij kot je bil naš elektroforezni gel. Gel in filter papirje smo namočili v pufer za prenos. Filter papirje, spužve, gel in PVDF membrano smo nato prenesli na anodo in jih pravilno ter previdno zložili enega na drugega, tako da vmes ni bilo zračnih mehurčkov, ter na koncu pokrili vse skupaj z katodo. Pomembno je, da smo pred začetkom prenosa dodali t.i. »coolerje«, ki so omogočili, da je gel ostal dovolj hladen ter se ni pregreval, saj bi to privedlo do neuspešnega prenosa. Zatēm smo aparaturu pokrili s pokrovom in jo priključili na električno napetost. Prenos je potekal 60 min pri napetosti 100 V za majhno aparaturu ter 60 min pri 300 V za veliko aparaturu.

Po prenosu smo membrano inkubirali v pufru za blokado (0,5 % Tween v PBS) in rahlo stresali na stresalniku pri 4 °C preko noči. Naslednji dan smo membrano spirali 3-krat po 10 min v 0,05 % Tween v PBS. Po spiranju smo membrano prenesli v raztopino protiteles proti biotinu (DCG-04 je označen z biotinom), označenih s streptavidin peroksidazo. Raztopino smo pripravili z redčenjem 1:1000 v 0,2 % Tweenu v PBS, dodali pa smo še 10 µl NaN₃. Inkubacija v protitelesih je potekala 2 h na stresalniku. Po inkubaciji smo membrano spirali 3-krat po 10 min z 0,05 % Tween v PBS.

Detekcijo smo izvedli z merjenjem kemilumniscence z napravo G-Box, po dodatku substratov iz kompleta SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate. Vsakega substrata smo dodali po 500 µl ter počakali nekaj minut, da se je razvila kemilumniscenca.

3.2.5 Določanje aktivnosti Katepsina B in Katepsina X z razgradnjo fluorogenih substratov

Aktivnost Katepsinov X in B smo določali s fluorescenčno spektrofotometrijo. Pri tej metodi aktivnost encima določamo z merjenjem sprememb v fluorescenci, ki nastane po razgradnji specifičnega fluorogenega substrata. Pri določanju aktivnosti encimov s to metodo je pomembna izbira optimalno specifičnega substrata, ki ga preučevan encim razgrajuje. Izbira ustreznega substrata nam omogoči, da določamo le preučevan encim.

3.2.5.1 Izvedba:

Aktivnost Katepsina X in Katepsina B smo določali v lizatih diferenciranih in nediferenciranih celic U937. Za določanje aktivnosti Katepsina X smo uporabili specifičen fluorogen substrat Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH, za Katepsin B pa z-Arg-Arg-pNa.2HCl. Celične lizate smo pripravili v lizirnem pufru ter jim določili vsebnost proteinov z metodo po Bradfordu. Celične lizate smo, v aktivacijskem pufru, umerili na enako vsebnost celokupnih proteinov. 100 µl tako pripravljenih vzorcev smo nanесли v vdolbinice na črni mikrotitrski ploščici in segreli na temperaturo 37 °C. Vzorcem smo dodali specifična substrata v končni koncentraciji 10 mM ter kvantitativno ovrednotili aktivnost z merjenjem fluorescence na čitalcu mikrotitrskih plošč Tecan Safire2.

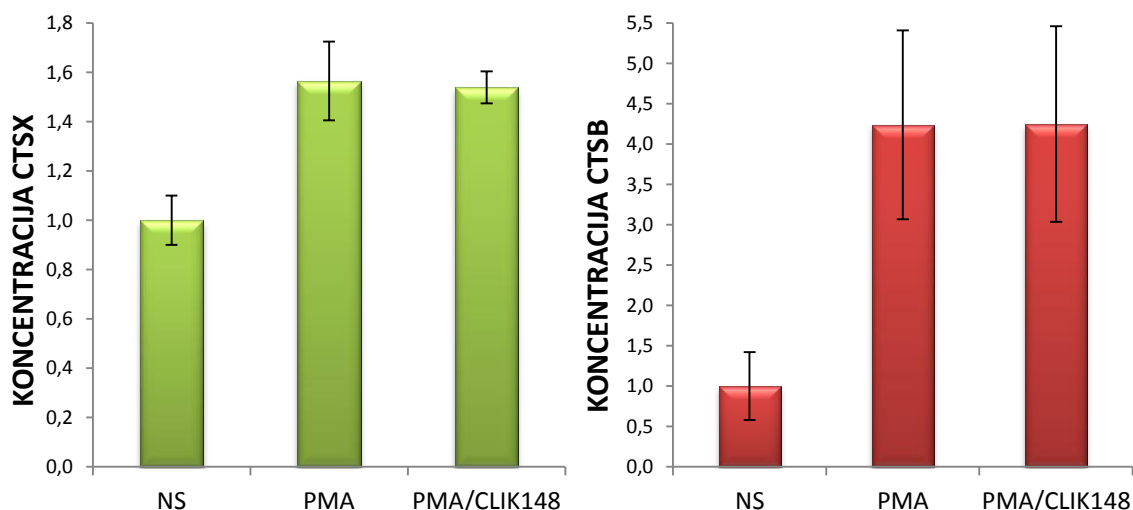
4 REZULTATI

Z imunoencimskim testom na trdni podlagi (ELISA), določanjem aktivnosti z razgradnjo fluorogenih substratov, s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS, pretočno citometrijo ter fluorescenčno konfokalno mikroskopijo smo ovrednotili vpliv diferenciacije monocitov v makrofage na količino, aktivnost in lokalizacijo Katepsinov. Za model smo uporabili pre-monocitno celično linijo U937. Pri vseh eksperimentih smo primerjali naslednje vzorce:

1. monociti (oznaka **NS**) - nestimulirane celice U937;
2. makrofagi (oznaka **PMA**) - celice, ki nastanejo po diferenciaciji celične linije U937 s PMA;
3. makrofagi, tretirani s CLIK148 (oznaka **PMA/CLIK148**) - celice diferencirane celične linije U937 z dodanim specifičnim inhibitorjem Katepsina L CLIK148.

4.1 Vpliv diferenciacije U937 na koncentracijo Katepsinov X in B

Vpliv diferenciacije monocitov v makrofage na koncentracijo Katepsinov X in B smo ovrednotili v lizatih celične linije U937 s testom ELISA. Dokazali smo, da se koncentracija aktivnega Katepsina X po diferenciaciji s PMA poveča za 1,56-krat, koncentracija Katepsina B pa za 4,24-krat. Inhibicija Katepsina L s CLIK148 ne vpliva na izražanje Katepsinov X in B v celicah U937 (Slika 6).



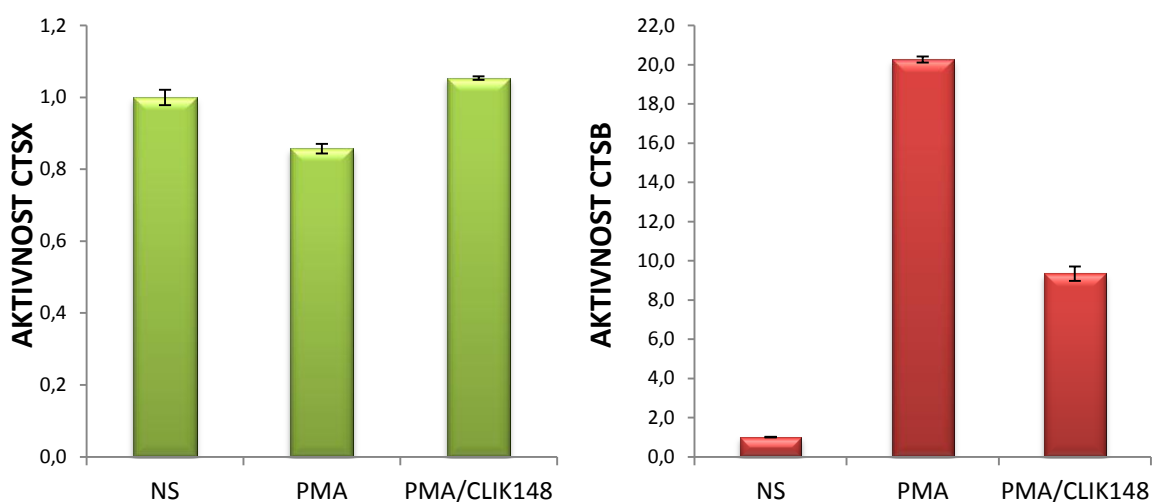
Slika 6: Primerjava koncentracij aktivnega Katepsina X (levo) ter Katepsina B v celicah U937. Rezultati so prikazani kot povprečje dveh bioloških ponovitev $\pm$ SD in so normalizirani na kontrolo brez modulatorjev (NS).

4.2 Vpliv diferenciacije U937 na aktivnost Katepsinov X in B

Vpliv diferenciacije monocitov v makrofage na aktivnost Katepsinov X in B smo ovrednotili z dvema različnima metodama.

4.2.1 Določanje aktivnosti z razgradnjo fluorogenih substratov

Aktivnost Katepsina X smo ovrednotili z razgradnjo specifičnega fluorogenega substrata Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH, aktivnost Katepsina B pa z razgradnjo specifičnega substrata z-Arg-Arg-pNa.2HCl. Dokazali smo, da ima diferenciacija monocitov v makrofage le manjši vpliv na aktivnost Katepsina X, izrazito pa se poveča aktivnost Katepsina B, in sicer za 20,27-krat. Dokazali smo tudi, da dodatek inhibitorja Katepsina B CLIK148, ne vpliva na aktivnost Katepsina X, pri Katepsinu B pa privede do zmanjšanja aktivnosti za 2,17-krat v primerjavi z diferenciranimi celicami (PMA) (Slika 7).



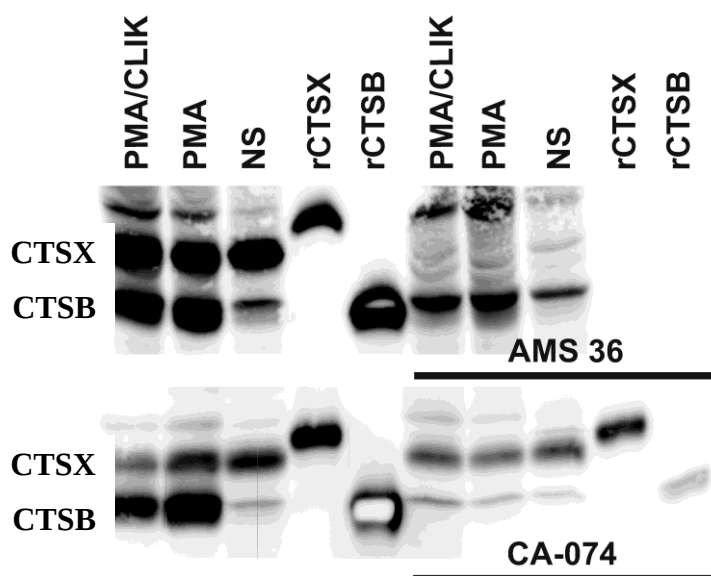
Slika 7: Rezultati določanja aktivnosti z razgradnjo fluorogenih substratov za Katepsin X (levo) in Katepsin B v celicah U937. Rezultati so predstavljeni kot povprečje dveh bioloških ponovitev $\pm$ SD in so normalizirani na kontrolo brez modulatorjev (NS).

4.2.2 Določanje aktivnosti s specifičnim označevalnim inhibitorjem cisteinskih Katepsinov DCG-04 z metodo NaDS PAGE

Vpliv diferenciacije na aktivnost Katepsinov X in B smo ovrednotili z uporabo DCG-04, ki je z biotinom označen specifični inhibitor Katepsinov. DCG-04 se kovalentno veže v aktivno mesto, in tako označi le delujoče Katepsine. Ker DCG-04 prepozna vse cisteinske Katepsine, smo Katepsina X in B identificirali s pomočjo rekombinantnih Katepsinov

rCTSX in rCTSB ter z uporabo specifičnih inhibitorjev AMS 36 (za Katepsin X) in CA-074 (za Katepsin B).

Dokazali smo, da se aktivnost Katepsina X po diferenciaciji monocitov v makrofage bistveno ne spremeni, saj je intenziteta lis za Katepsin X podobna za vse vzorce brez dodanih inhibitorjev. Za identifikacijo Katepsina X smo uporabili rCTSX (rekombinantni Katepsin X). Počasnejše potovanje rCTSX je posledica razlik v glikozilaciji pri človeku in bakteriji *E.coli*, ki je bila uporabljena za proizvodnjo rCTSX. Istovetnost smo potrdili še z dodatkom inhibitorja AMS36, ki močno zmanjša aktivnost Katepsina X, kar opazimo kot občutno zmanjšanje intenzitete lis, ki predstavljajo Katepsin X. Za Katepsin B smo dokazali, da se aktivnost po diferenciaciji s PMA močno poveča, saj so lise, ki označujejo aktivnost Katepsina B v diferenciranih celicah, mnogo intenzivnejše kot pri nediferenciranih celicah. Istovetnost Katepsina B smo dokazali z rCTSB ter CA-074, ki je zmanjšal intenziteto ustreznih lis. Pri vzorcih z dodanim specifičnim inhibitorjem Katepsina X AMS 36 smo ugotovili, da je le-ta deloma inhibiral tudi Katepsin B, pri vzorcih z dodanim CA-074, pa smo opazili šibko inhibicijo Katepsina X. Inhibitorja torej nista povsem specifična za izbrana Katepsina, kar pa ni vplivalo na naše rezultate. Določanje aktivnosti z dodatkom DCG-04 z metodo NaDS PAGE je prikazano na sliki 8.

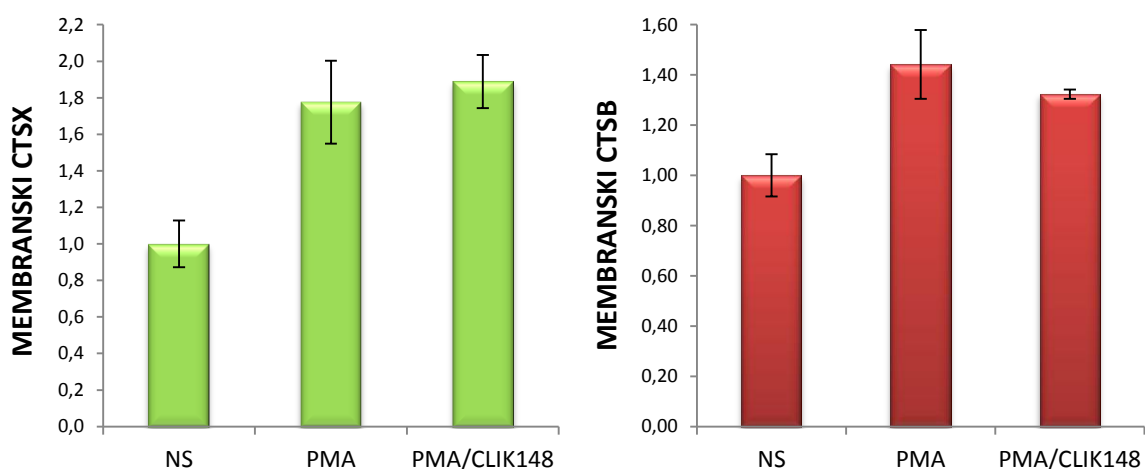


Slika 8: Določanje aktivnosti Katepsinov X in B z DCG-04 z metodo NaDS PAGE v celicah U937. Aktivnost Katepsina X smo ovrednotili v vzorcih brez dodanih inhibitorjev (leva stran slike) ter ugotovili, da je aktivnost Katepsina X v celicah NS, PMA in PMA/CLIK148 približno enaka, medtem, ko pri Katepsinu B opazimo izrazito povečanje aktivnosti pri celicah PMA in PMA/CLIK148. Istovetnost Katepsinov smo potrdili z rCTSX za Katepsin X in rCTSB za Katepsin B ter dodatkom specifičnih inhibitorjev. Pri vzorcih z

dodanim AMS36 (desno zgoraj) in Ca-074 (desno spodaj) smo opazili izrazito zmanjšanje intenzitete lis ustreznih Katepsinov.

4.3 Vpliv diferenciacije U937 na prenos Katepsinov X in B na plazemsko membrano.

Vpliv diferenciacije monocitov v makrofage na prenos Katepsinov X in B na plazemsko membrano smo ovrednotili s pretočno citometrijo. Dokazali smo, da se koncentracija membranskega Katepsina X po diferenciaciji s PMA poveča za 78 %, koncentracija membranskega Katepsina B, pa za 44 %. Inhibicija Katepsina L ne vpliva bistveno na prenos Katepsinov X in B na plazemsko membrano (Slika 9).



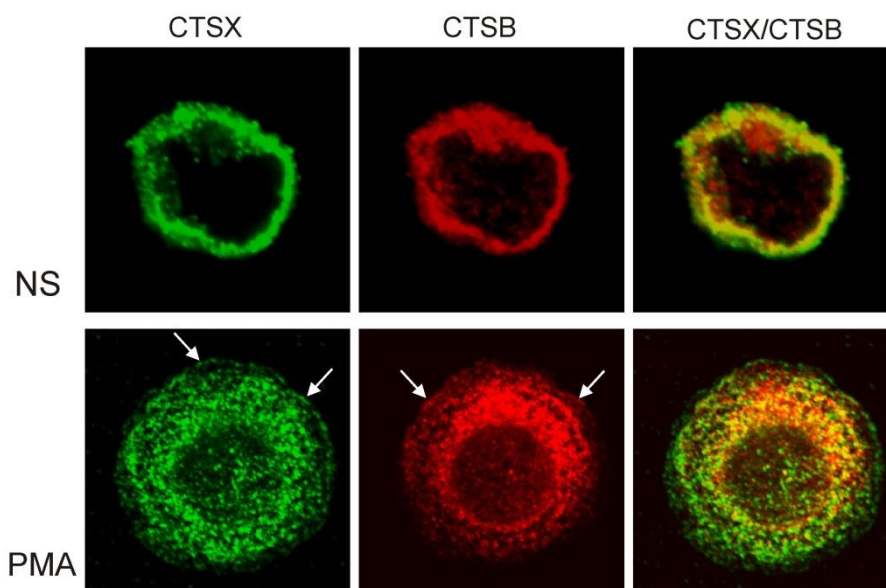
Slika 9: Rezultati pretočne citometrije za Katepsin X (levo) in Katepsin B v celicah U937. Rezultati so povprečja dveh bioloških meritev $\pm$ SD in so normalizirani na kontrolno brez modulatorjev (NS).

4.4 Vpliv diferenciacije U937 na lokalizacijo Katepsinov

Vpliv diferenciacije U937 na lokalizacijo Katepsinov smo preučevali s fluorescenčno konfokalno mikroskopijo.

4.4.1 Vpliv diferenciacije U937 na lokalizacijo Katepsinov X in B

Ugotovili smo, da se v nediferenciranih celicah U937 Katepsina X in B nahajata predvsem perinuklearno, v lizosomih. Diferenciacija U937 iz monocitov v makrofage privede do premeščanja Katepsinov X in B v bližino celične membrane (Slika 10). Katepsina sta kolokalizirana predvsem v perinuklearnih lizosomih.

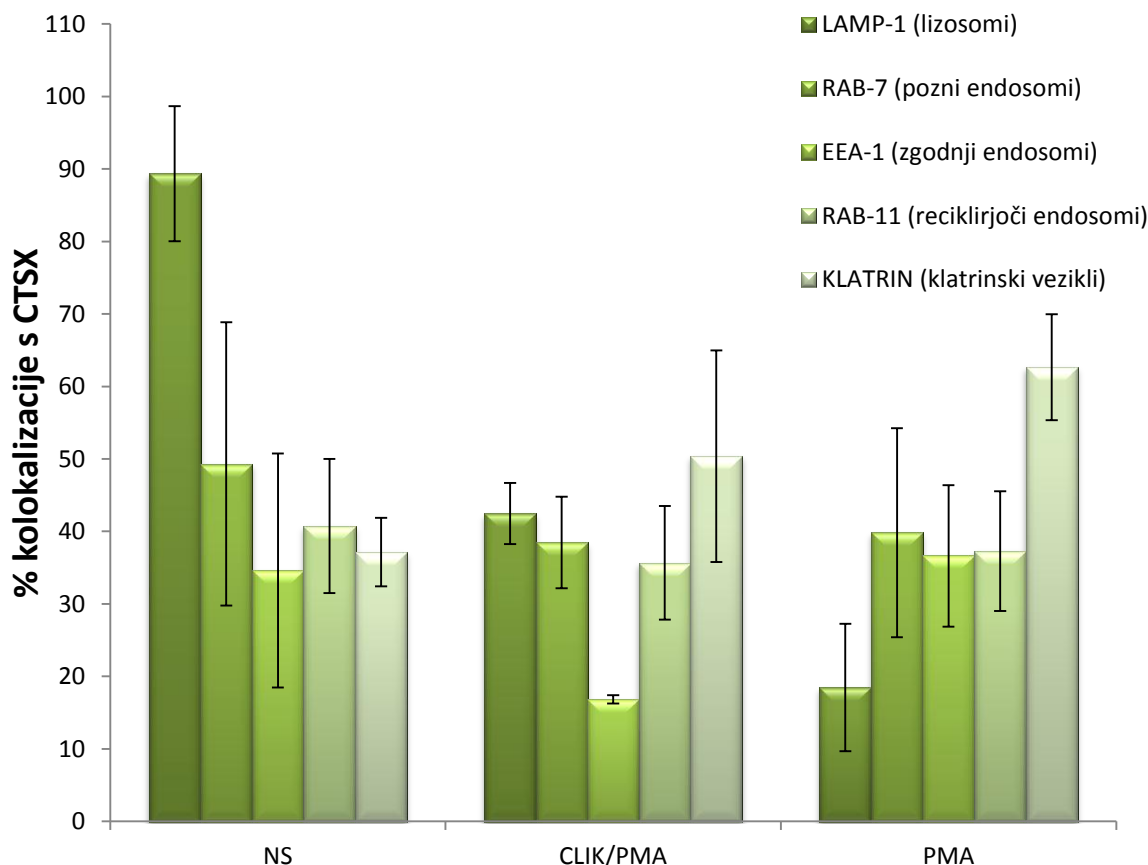


Slika 10: Lokalizacija Katepsina X (zelen) in Katepsina B (rdeč) ter njuna kolokalizacija v celicah U937. Slike v zgornji vrsti prikazujejo lokalizacijo Katepsinov X in B ter njuno kolokalizacijo v nediferenciranih celicah, slike v spodnji vrsti pa lokalizacijo Katepsinov X in B ter njuno kolokalizacijo v diferenciranih celicah. Področja, kjer pride do kolokalizacije, so rumena. Bele puščice označujejo Katepsine ob/na membrani.

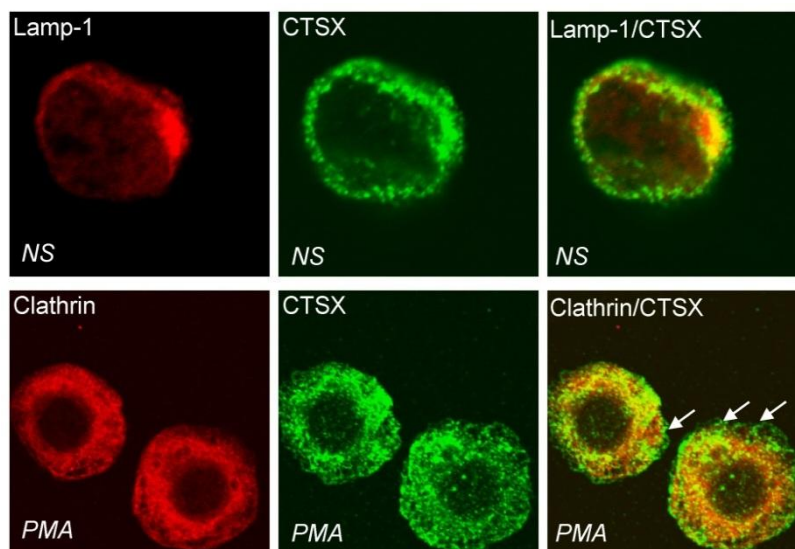
4.4.2 Vpliv diferenciacije U937 na kolokalizacijo Katepsina X s celičnimi vezikli

Zanimalo nas je znotrajcelično premeščanje Katepsina X pri procesu diferenciacije v makrofage. V ta namen smo Katepsin X kolokalizirali z označevalci za različne vrste celičnih veziklov: LAMP-1 (lizosomi), RAB-7 (pozni endosomi), RAB-11 (reciklirajoči endosomi), EEA-1 (zgodnji endosomi) in klatrin (klatrinski vezikli). Prisotnost Katepsina X v izbranih veziklih smo prikazali kot odstotek kolokalizacije, ki predstavlja delež Katepsina X, kolokaliziranega s celičnim označevalcem, glede na celokupni Katepsin X v celici.

Dokazali smo, da pri diferenciaciji monocitov v makrofage pride do prerazporeditve Katepsina X v celicah. Proces diferenciacije značilno zmanjša delež Katepsina X v LAMP-1-pozitivnih lizosomih. Inhibicija Katepsina L s CLIK148 zavira premeščanje Katepsina X iz lizosomov. Poleg tega je opazna tudi prerazporeditev Katepsina X v klatrinske vezikle. Rezultati kolokalizacij Katepsina X s celičnimi označevalci so prikazani na slikah 11. in 12. Pri analizi kolokalizacije smo ugotovili, da se Katepsin X in Lamp-1 v monocitih U937 dobro kolokalizirata v perinuklearnih lizosomskih veziklih. Pri diferenciranih U937 se kolokalizacija Katepsina X s klatrinom neurejeno razprostira po notranjosti celic.

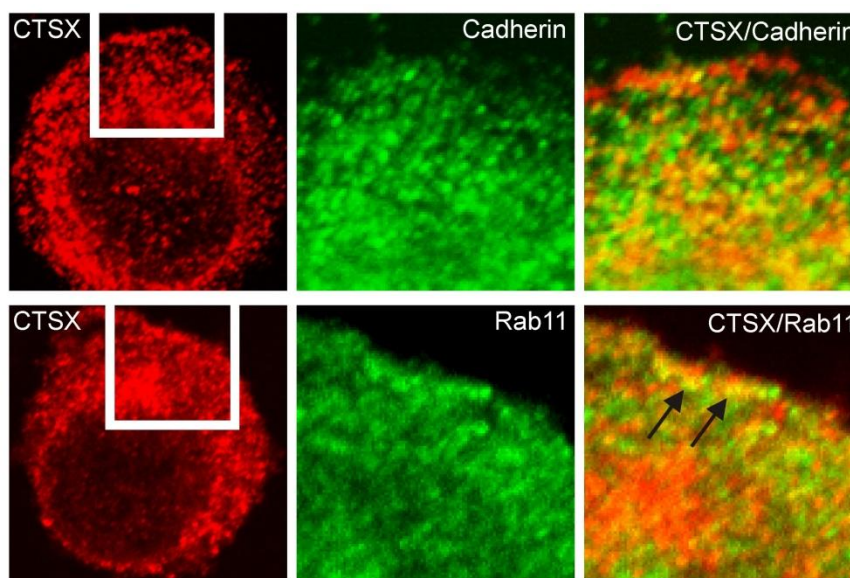


Slika 11: Kolokalizacija Katepsina X z različnimi celičnimi označevalci v celicah U937. Diagram prikazuje odstotek (%) kolokalizacije Katepsina X s celičnimi označevalci, glede na celokupni Katepsin X v celici. Rezultati so povprečja petih slikanih celic $\pm$ SD.



Slika 12: Kolokalizacija Katepsina X s celičnimi označevalci v celicah U937. V zgornji vrsti je prikazana lokalizacija Katepsina X (zelen) in LAMP-1 (rdeč) v nediferenciranih celicah U937, kjer opazimo zelo dobro kolokalizacijo (rumeno) v perinuklearnih lizosomih. V spodnji vrsti je prikazana lokalizacija Katepsina X (zelen) in klatrina (rdeč) v diferenciranih celicah U937. Bele puščice označujejo Katepsin X ob/na membrani.

Analiza slik je pokazala, da se nobeden od uporabljenih celičnih označevalcev v diferenciranih celicah U937 ne kolokalizira s perifernim Katepsinom X, ki je prisoten ob ali na membrani. Da bi potrdili lokalizacijo Katepsina X ob/na membrani, smo Katepsin X dodatno kolokalizirali še z membranskim celičnim označevalcem kadherinom ter celičnim označevalcem reciklirajočih endosomov Rab-11 (slika 13). Membranske lokalizacije Katepsina X s kadherinom nismo uspeli potrditi, ker je bilo barvanje kadherina v diferenciranih celicah U937 nespecifično in se membrana ni obarvala. Nasprotno smo dokazali prisotnost Katepsina X v Rab-11 pozitivnih reciklirajočih endosomih ob membrani.

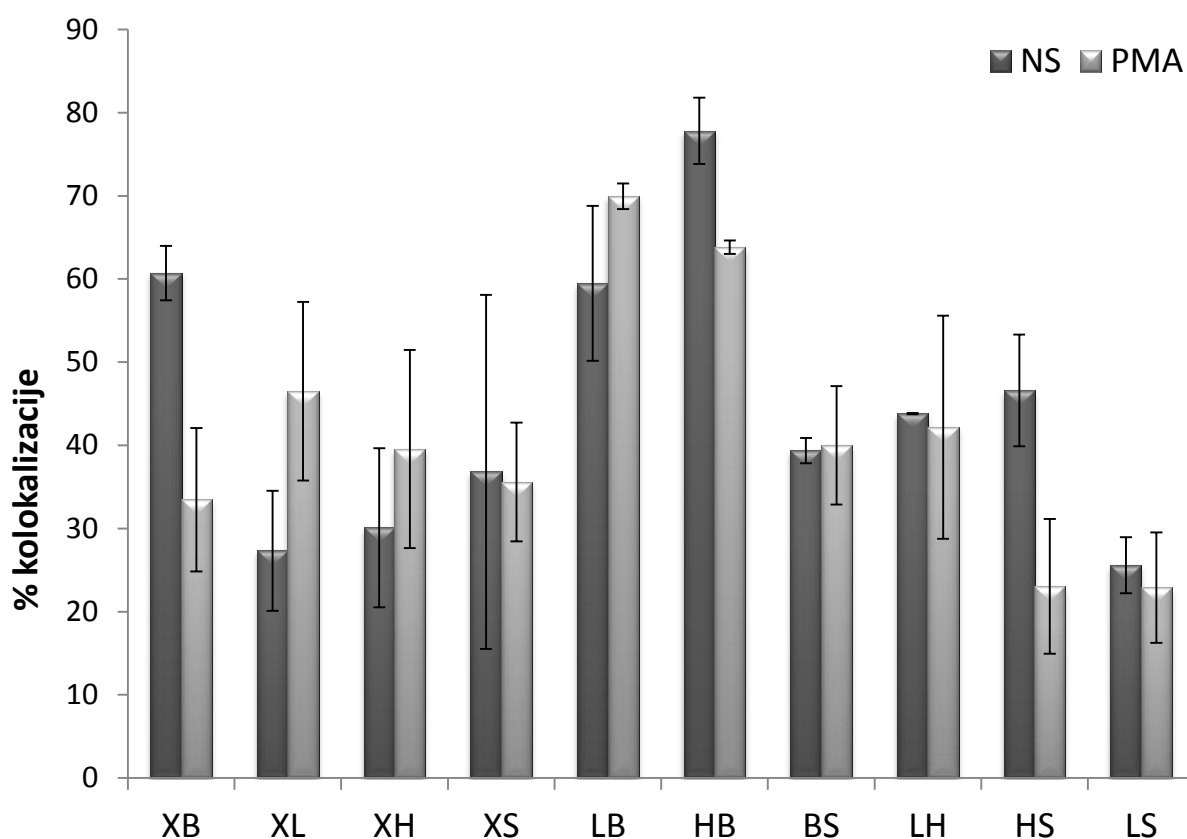


Slika 13: Kolokalizacija Katepsina X s celičnimi označevalci na membrani celic v diferenciranih celicah U937. V zgornji vrsti je prikazana kolokalizacija Katepsina X (rdeč) in membranskega označevalca kadherina (zelen). V spodnji vrsti je prikazana kolokalizacija Katepsina X (rdeč) in označevalca reciklirajočih endosomov Rab-11 (zelen). Črne puščice označujejo Katepsin X v reciklirajočih endosomih ob membrani.

4.4.3 Vpliv diferenciacije U937 na kolokalizacijo cisteinskih Katepsinov

Zanimalo nas je, ali se izbrani cisteinski Katepsini v celicah U937 nahajajo v istih veziklih, in ali diferenciacija celic s PMA vpliva na kolokalizacijo cisteinskih Katepsinov. Naši rezultati so pokazali, da se Katepsin B zelo dobro kolokalizira (nad 50 %) s Katepsini H, L in X, kar nakazuje, da se ti Katepsini večinoma nahajajo v istih veziklih. Ugotovili smo, da diferenciacija iz monocitov v makrofage ne povzroči večjih sprememb medsebojne kolokalizacije cisteinskih Katepsinov. Izjemoma je diferenciacija značilno vplivala na

kolokalizacijo Katepsinov X in B, ter X in L. Zmanjšanje kolokalizacije Katepsinov X in B je najverjetneje posledica intenzivnejše premestitve Katepsina X, iz lizosomov v periferne področja celice, v primerjavi s Katepsinom B. Vzrok za povečanje kolokalizacije Katepsinov X in L, je lahko z diferenciacijo posredovana premestitev Katepsinov na skupna področja celice.



Slika 14: Kolokalizacija cisteinskih Katepsinov v celicah U937, pred in po diferenciaciji s PMA.

Diagram prikazuje % kolokalizacije različnih parov cisteinskih Katepsinov. Rezultati so povprečja petih slikanih celic $\pm$ SD.

5 RAZPRAVA

Proteolitično delovanje cisteinskih Katepsinov je nujno za vzdrževanje homeostaze v organizmu, in je močno odvisno od pravilnega razvrščanja ter potovanja Katepsinov znotraj celice. Katepsine celica sintetizira kot neaktivne preproencime in jih usmeri v lizosome, kjer po aktivaciji vršijo večino svoje proteolitične aktivnosti (16). Za to vrsto proteaz so dolgo mislili, da je njihova vloga omejena na končno nespecifično razgradnjo proteinov v lizosomih, vendar se je kasneje izkazalo, da so vpleteni v več zelo pomembnih celičnih procesov in tudi v razvoj bolezni, kot so ateroskleroza, Alzheimerjeva bolezen in rak (13). Del Katepsinov se v določenih fizioloških ali bolezenskih procesih prestavi iz endo-lizosomskih veziklov na druge lokacije, kot so celična membrana, mitohondriji, jedro ter citoplazma, kjer opravljajo bolj specifične funkcije (16).

Katepsin X je udeležen pri regulaciji imunskega odziva, saj preko interakcij z β_2 integrini omogoča adhezijo ter migracijo imunskih celic (26, 34). Najbolj raziskane vloge Katepsina B so povezane s tumorsko invazijo, kjer sodeluje pri znotraj- in zunajcelični razgradnji ECM, angiogenezi in apoptozi (33). Znotrajcelično sta Katepsina X in B običajno lokalizirana v perinuklearnih endo-lizosomskih veziklih. Pri obeh Katepsinih je znana premestitev v bližino celične membrane, ali celo na zunanjo stran celične membrane. Za tumorske celice je dokazano, da prenos Katepsina B na površino celice posreduje zunajcelično razgradnjo ECM (17). Premestitev Katepsina X v bližino celične membrane je dobro preučena pri levkocitih, kjer je nujna za interakcijo z integrini, ter posledično omogoča adhezijo ter migracijo imunskih celic (23, 26).

Makrofagi so bele krvne celice, ki jih uvrščamo med fagocite ter nastanejo v procesu diferenciacije iz monocitov, po prehodu iz krvnega obtoka v tkiva (35). Njihova vloga v telesu je predvsem v aktivnem sodelovanju v imunskem odzivu telesa ter obnavljanju poškodovanih tkiv, s svojim vdorom v tkiva pa se pomembno vpletajo tudi v številne patološke procese, med katerimi so najpomembnejši: ateroskleroza, nevrodegenerativne motnje, sladkorna bolezen, kronično vnetje in razvoj raka, ter so zaradi tega tarča številnih raziskav (38). Različne vloge in lastnosti cisteinskih Katepsinov v makrofagih še niso dobro raziskane. V zadnjem času se omenja predvsem njihova vloga pri invaziji makrofagov v tkiva (40,41).

V okviru diplomskega dela smo spremljali Katepsina X in B po diferenciaciji monocitov v makrofage. Naša hipoteza je bila, da proces diferenciacije povzroči spremembe v

koncentraciji, aktivnosti in znotrajcelični lokalizaciji Katepsinov. Vse poskuse smo izvajali na človeški limfomski pro-monocitni celični liniji U937, ki izkazuje številne monocitne lastnosti ter je primerna za študije diferenciacije monocitov v makrofage *in vitro*. V naših raziskavah smo primerjali monocite z makrofagi po diferenciaciji s PMA. Poleg tega smo določenim vzorcem pri procesu diferenciacije s PMA dodali inhibitor Katepsina L CLIK148.

V predhodnih študijah je že bilo dokazano, da se količina Katepsina X po diferenciaciji celic U937 s forbolnim estrom PMA poveča (46). Podobno je za Katepsin B znano, da pride do povečanja v koncentraciji encima po diferenciaciji celic U937 z rastnim faktorjem GM-CSF (47). Te ugotovitve smo potrdili v naših raziskavah, kjer smo s specifičnim testom ELISA dokazali, da se koncentracija Katepsinov X in B v makrofagih značilno poveča v primerjavi z nediferenciranimi celicami. Katepsin L naj bi procesiral proKatepsin X v aktivno obliko, zato smo pričakovali, da se bo inhibicija s CLIK148 izrazila v manjši koncentraciji aktivnega Katepsina X, vendar do tega ni prišlo.

Z metodo razgradnje fluorogenih substratov ter s specifičnim označevalnim inhibitorjem cisteinskih Katepsinov DCG-04 smo analizirali vpliv diferenciacije celic U937 na aktivnost Katepsinov X in B. Z obema metodama smo potrdili, da diferenciacija U937 ne vpliva bistveno na aktivnost Katepsina X. Podobno je bilo z označevalcem DCG-04 že dokazano za mišjo monocitno/makrofagno celično linijo RAW267.7 (48). Nasprotno smo za Katepsin B ugotovili izrazito povečanje aktivnosti v makrofagih. Rezultati za Katepsin B se ujemajo z rezultati na človeški monocitni celični liniji Thp-1, kjer se aktivnost Katepsina B povečuje s količino dodanega PMA ter časom inkubacije (49). Aktivnost Katepsina X v diferenciranih celicah U937 ni bila povezana z aktivnostjo Katepsina L, saj po dodatku inhibitorja Katepsina L CLIK148 ni bilo sprememb. Nasprotno, je inhibicija Katepsina L izrazito zmanjšala aktivnost Katepsina B, kar je v nasprotju z našimi pričakovanji. Pri miših z izbitim genom za Katepsin B oz. L so namreč dokazali, da se v primeru izbitja gena za en Katepsin, ekspresija drugega Katepsina izrazito poveča (50).

Nedavno je bilo dokazano, da se Katepsin X pri diferenciaciji in zorenju imunskih celic prenese v bližino celične membrane (24, 26, 51). S pretočno citometrijo smo potrdili, da diferenciacija U937 spodbudi prenos Katepsina X na celično membrano. Podobno smo dokazali tudi za Katepsin B, za katerega je znano, da se nahaja v membranskih kaveolah na površini tumorskih celic (50). Inhibicija Katepsina L ni imela značilnega vpliva na prenos Katepsinov X in B na membrano. Ker celic med postopkom nismo permeabilizirali, smo s

to metodo zaznali predvsem Katepsine, ki so vezani na zunanji strani celične membrane. V prihodnosti bi bilo smiselno pokazati, ali sta Katepsina X in B pri makrofagih prisotna v kaveolah.

Vpliv diferenciacije celic U937 na lokalizacijo Katepsinov X in B smo analizirali s fluorescenčno konfokalno mikroskopijo. Dokazali smo, da se Katepsina X in B v nediferenciranih celicah izražata predvsem v perinuklearnih endo-lizosomskih veziklih. Takšno lokalizacijo obeh Katepsinov so potrdili v številnih dosedanjih študijah (26, 31). Po diferenciaciji se Katepsina X in B izražata v endo-lizosomskih veziklih perinuklearnega območja, v veziklih perimembranskega področja ter na/ob celični membrani, pri čemer je izražanje v membranskih veziklih ter na membrani mnogo izrazitejše za Katepsin X, kar sovпада z rezultati pretočne citometrije. Takšne rezultate lokalizacije Katepsina X po diferenciaciji U937 s PMA smo pričakovali, in se zelo dobro ujemajo z rezultati nekaterih dosedanjih študij, ki so potrdile intenzivno lokaliziranje Katepsina X ob celični membrani (26). Tudi za Katepsin B je v tumorskih celicah dobro znan prenos iz perinuklearnih veziklov v vezikle perimembranska področja ter na/ob membrano, pri makrofagih pa ta prenos še ni bil dokazan (17). Konfokalna mikroskopija nam žal ne omogoča, da bi ločili, ali so označene molekule prisotne na zunanji ali notranji strani celične membrane. Za to bi potrebovali občutljivejšo metodo, npr. elektronsko mikroskopijo.

V sklopu določanja lokalizacij Katepsinov s fluorescenčno mikroskopijo smo opravili študije kolokalizacij Katepsina X s celičnimi označevalci, specifičnimi za posamezne celične vezikle. V dosedanjih raziskavah so dokazali kolokalizacijo Katepsina X s celičnim označevalcem lizosomov/endosomov LAMP-2 v nediferenciranih celicah U937 (31). Na podlagi naših rezultatov pretočne citometrije ter določanja lokalizacije Katepsina X s konfokalno mikroskopijo smo pričakovali, da bo diferenciacija U937 vodila do premestitve Katepsina X iz perinuklearnih lizosomov v vezikle membranskega področja ter na plazemsko membrano diferenciranih celic. Rezultati potrjujejo naše domneve, saj se Katepsin X prestavi v bližino celične membrane. CLIK148 je zmanjšal obseg premestitve Katepsina X v perimembranska področja glede na diferencirane celice, kar kaže na to, da se na alternativne lokacije premešča predvsem aktivni Katepsin X. V nediferenciranih celicah U937 smo dokazali najboljšo kolokalizacijo Katepsina X z lizosomskim označevalcem LAMP-1, kar nam potrjuje lokalizacijo Katepsina X v perinuklearnih lizosomih. Po procesu diferenciacije se je Katepsin X najboljše kolokaliziral s klatrinom. Klatrin je celični protein, ki ima ključno vlogo v procesu nastanka klatrinskih veziklov, le-ti pa so zelo pomembni za

endocitotski transport snovi iz plazemske membrane v endosome ter sekretorni transport iz trans Golgijevega omrežja v endosome (52). Zanimivo je, da se je Katepsin X s klatrinom dobro kolokaliziral povsod v celici, razen ob celični membrani.

Izrazito membranski Katepsin X se ni kolokaliziral z nobenim od uporabljenih celičnih označevalcev. Da bi dokazali lokalizacijo Katepsina X na/ob celični membrani, smo izvedli kolokalizacijo Katepsina X z membranskim celičnim označevalcem kadherinom ter označevalcem reciklirajočih endosomov Rab-11. S kadherinom nismo uspeli dokazati lokalizacije Katepsina X na membrani, saj je bilo barvanje z njim nespecifično ter se je razprostiralo po celotni celici. Z Rab-11 smo uspešno dokazali lokalizacijo Katepsina X v reciklirajočih lizosomih. V sklopu kolokalizacij z različnimi celičnimi označevalci smo poskusili dokazati še lokalizacijo Katepsina X v lipidnih raftih. Lipidni rafti so dinamična mikromembranska področja, bogata z glikosfingolipidi, glikoproteini in holesterolom, ki so pomembni kot organizacijski centri za združevanje signalnih molekul, pomembno vplivajo na fluidnost membrane ter uravnavajo nekatere celične procese, kot je npr. prenos živčnih signalov (53). Iz raziskovalnega vidika so nas zanimali predvsem zato, ker so lipidni rafti bogati z integrini, ki so tarča Katepsina X. Kot označevalec lipidnih raftov smo uporabili kolera toksin (CTOX), vendar so celice, katerim smo dodali CTOX, postale apoptotične ter poskusa nismo uspeli izvesti (rezultati niso prikazani).

S konfokalno mikroskopijo smo ovrednotili še vpliv diferenciacije U937 na kolokalizacijo Katepsinov X, B, S, H in L z namenom, da bi odkrili, ali se posamezni Katepsini nahajajo na istih lokacijah. Ugotovili smo zelo dobro kolokalizacijo Katepsina B z Katepsini H, L in X, kar nam nakazuje, da se ti Katepsini večinoma nahajajo v enakih celičnih veziklih. Rezultati kažejo na to, da diferenciacija U937 ne vpliva bistveno na kolokalizacijo Katepsinov med sabo, saj se le-ta po diferenciaciji pri večini ne spremeni. Značilne razlike smo opazili le v kolokalizaciji med Katepsinoma X in B, ter X in L. Katepsina X in B se zelo dobro kolokalizirata v nediferenciranih celicah, kjer se oba običajno nahajata v perinuklearnih lizosomih. Po diferenciaciji se njuna kolokalizacija močno zmanjša, razlog pa je najverjetneje v tem, da se pri procesu diferenciacije premestita na različna področja v celici. Pri Katepsinih X in L opazimo slabo kolokalizacijo v nediferenciranih celicah, po diferenciaciji pa se njuna kolokalizacija izrazito poveča, kar nam nakazuje, da po diferenciaciji potujeta na enake lokacije v celici. Rezultati so deloma pričakovani, saj smo pri Katepsinu X že dokazali premeščanje v vezikle membranskega področja oz na/ob

membrano, tudi za Katepsin L pa je znano, da se v makrofagih in celicah glie premesti v membranska področja celice (54).

V diplomskem delu smo dokazali, da diferenciacija U937 iz monocitov v makrofage privede do sprememb v izražanju, aktivnosti ter znotrajcelični lokalizaciji cisteinskih Katepsinov. V bodoče bi bilo smiselno bolj natančno določiti lokalizacijo cisteinskih karboksipeptidaz v diferenciranih makrofagih z metodami, kot sta elektronska mikroskopija in celično frakcioniranje z ultracentrifugiranjem. Dobljeni rezultati so pomembni za nadaljevanje študij vloge cisteinskih Katepsinov pri infiltraciji makrofagov v tkiva. Prenos Katepsina X iz lizosomov na celično membrano in v reciklirajoče vezikle poveča zmožnost interakcije Katepsina X z integrinskimi receptorji, kar omogoči regulacijo celične migracije. Poleg tega, je proces diferenciacije makrofagov zaznamovan s povečanjem aktivnosti Katepsina B in njegovim prenosom na membrano, podobno kot pri migraciji invazivnih tumorskih celic.

6 SKLEPI

Za cisteinske Katepsine je znano, da se pri določenih fizioloških in bolezenskih procesih premestijo iz perinuklearnih lizosomov na različne znotrajcelične lokacije, in da se spremeni njihova encimska aktivnost. V okviru diplomskega dela smo spremljali znotrajcelično premeščanje in aktivnost Katepsinov X in B po diferenciaciji monocitne celične linije U937 v makrofage.

- Z ELISA testom smo ugotovili, da se po diferenciaciji U937 povečata koncentracija aktivnega Katepsina X ter celokupna koncentracija Katepsina B.
- S specifičnimi fluorogenimi substrati ter z označevalnim inhibitorjem cisteinskih Katepsinov DCG-04 smo dokazali izrazito povečanje aktivnosti Katepsina B po diferenciaciji celic U937, aktivnost Katepsina X pa se ni bistveno spremenila.
- S pretočno citometrijo smo ugotovili, da diferenciacija U937 spodbudi prenos Katepsinov X in B na/ob plazemsko membrano.
- S konfokalno fluorescenčno mikroskopijo smo potrdili znotrajcelično lokalizacijo Katepsinov X in B v perinuklearnih endo-lizosomskih veziklih nediferenciranih celic U937 ter dokazali njuno premestitev v perimembranska področja po diferenciaciji celic U937. S specifičnim celičnim označevalcem Rab-11 smo dokazali prisotnost Katepsina X v reciklirajočih endosomih. Pri vrednotenju kolokalizacij cisteinskih Katepsinov smo ugotovili dobro kolokalizacijo Katepsina B s Katepsini X, L in H, kar nakazuje na to, da se ti Katepsini nahajajo na skupnih področjih v celici.

Rezultati diplomskega dela potrjujejo hipotezo, da proces diferenciacije celične linije U937 iz monocitov v makrofage povzroči spremembe v izražanju, aktivnosti in znotrajcelični lokalizaciji cisteinskih Katepsinov. Povečanje koncentracije in translokacija Katepsinov X in B v bližino celične membrane ter hiperaktivacija Katepsina B kažejo na pomembno vlogo teh cisteinskih karboksipeptidaz za fiziologijo makrofagov v tkivih.

7 LITERATURA

1. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF: Handbook of Proteolytic Enzymes, Elsevier, Academic Press, London. 2004.
2. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res. 2010; 38: 227-33
3. Bird PI, Trapani JA, Villadangos JA: Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity. Nat. Rev. Immunol. 2009; 9(12): 871-82.
4. Jedinak A, Maliar T: Inhibitors of proteases as anticancer drugs. Neoplasma. 2005; 52(3): 185-92.
5. Turk B: Targeting proteases: successes, failures and future prospects. Nat. Rev. Drug Discov. 2006; 5(9): 785-99.
6. Lah TT, Kos J, Blejec A, Frkovic-Georgio S, Golouh R, Vrhovec I, Turk V: The Expression of Lysosomal Proteinases and Their Inhibitors in Breast Cancer: Possible Relationship to Prognosis of the Disease. Pathol. Oncol. Res. 1997; 3(2): 89-99.
7. Conus S, Simon HU: Cathepsins: Key modulators of cell death and inflammatory responses. Biochemical Pharmacology. 2008; 76: 1374-82
8. Kos J, Lah TT: Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer. Oncol. Rep. 1998; 5(6): 1349-61.
9. Turk V, Turk B, Turk D: Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. EMBO J. 2001; 20(17): 4629-33.
10. Vozelj S, Obermajer N, Kos J: Proteaze in njihovih inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci, Farm.Vestn. 2007; 58: 133-38
11. Roberts R: Introduction to cathepsins, http://bioquest.org/bedrock/oklahoma_city_01_05/cathepsin_background_information.pdf , povzeto decembra 2010
12. Obermajer N, Doljak B, Kos J: Cysteine cathepsins: regulators of antitumour immune response. Exp. Opin. Biol. Ther. 2006; 6(12): 1295-309.
13. Colbert JD, Matthews SP, Miller G, Watts C: Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response. Eur. J. Immunol. 2009; 39(11): 2955-65.

14. Mohamed MM, Sloane BF: Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6(10): 764-75.
15. Zavašnik-Bergant T, Turk B: Cysteine proteases: destruction ability versus immunomodulation capacity in immune cells. *Bio. Chem.* 2007; 388: 1141-49.
16. Brix C, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S: Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions. *Biochimie* 2008; 90: 194-207
17. Premzl A, Zavasnik-Bergant V, Turk V, Kos J: Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp. Cell Res.* 2003; 283(2): 206-14.
18. Santamaria A, Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Lopez-Otin C: Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 16816–23.
19. Nägler D, Menard R: Human cathepsin X, a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions, *FEBS Lett.* 1998; 434: 135-39.
20. Klemenčič I, Carmona AK, Cezari MHS, Juliano MA, Juliano L, Gunčar G, Turk D, Križaj I, Turk V, Turk B: Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 5404-12.
21. Gunčar G, Klemenčič I, Turk B, Turk V, Karaoglanović-Carmona A, Juliano L, Turk D: Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure Fold. Des.* 2000; 8: 305-13.
22. Nägler D, Krüger S, Kellner A, Ziomek E, Menard R, Buhtz P, Krams M, Rössner A, Kellner U: Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate.* 2004; 60: 109-19.
23. Krüger S, Kalinski T, Hundertmark T, Wex T, Kuster D, Peitz U, Ebert M, Nägler D, Kellner U, Malfertheiner P, Naumann M, Rocken C, Rössner A: Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J. Pathol.* 2005; 207: 32–42.
24. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonović UP, Kos J: Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009; 41(8-9): 1685-96.

25. Wendt W, Zhu XR, Lübbert H, Stichel CC: Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Exp. Neurol.* 2007; 204(2): 525-40.
26. Obermajer N, Premzl A, Zavasnik T, Turk B, Kos J: Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Exp. Cell Res.* 2006; 312: 2515-27.
27. Fong D, Chan MM-Y, Hsieh W-T, Menninger JC, Ward DC: Confirmation of human cathepsin B gene (CTSB) assignment to chromosome 8. *Hum.Genet.*1992; 89: 10-12
28. Rozman J, Stojan J, Kuhelj R, Turk V, Turk B: Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin is a bimolecular process. *FEBS Letters.* 1999; 459: 358-62
29. Fox T, Miguel E, Mort J, Storer A: Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry.* 1992; 31: 12571-76
30. Podatkovna baza MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk/>, povzeto novembra 2010
31. Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Zavašnik-Bergant V, Langerholc T, Štefe I, Turk B, Werle B, Golouh R, Repnik U, Jeras M, Turk V: Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp. Cell Res.* 2005; 306: 103-13.
32. Podgorski I, Sloane BF: Cathepsin B and its roles in cancer progression. *Biochem. Soc. Symp.* 2003; 70: 263-76
33. Kos J, Premzl A: Cysteine and aspartic proteases cathepsins B and D determine the invasiveness of MCF10A neoT cells. *Radiol. Oncol.* 2003; 37(4): 241-48
34. Jevnikar Z, Obermajer N, Boggyo M, Kos J: The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *J. of Cell Science* 2008; 121: 2652-61
35. Vozelj M.: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000; 9, 32-34
36. Chomarat P., Banchereau J., Davoust J., Palucka A.K: IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* 2000; 1: 510-14
37. http://www.uni-marburg.de/fb20/anatomie/immunbiologie/index_html-en?language_sync=1, povzeto novembra 2010

38. Van Goethem E, Guet R, Balor S, Charierre G.-M, Poincloux R, Labrousse A, Marridonneau-Parini I, La Cabec V: Macrophage podosomes go 3D. *Eur.J.Cell Biol.* 2010; doi:10.1016/j.ejcb.2010.07.011
39. Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J. Cell Biol.* 2009; 185: 11–19
40. Van Goethem E, Poincloux R, Gauffre F, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V: Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J. Immunol.* 2010; 184: 1049-61.
41. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 2010; 24: 241-55
42. Ha S-D, Martins A, Khazaie K, Han J, Chan BMC, Kim S.O: Cathepsin B is Involved in the trafficking of TNF- α Containing Vesicles to the Plasma Membrane in Macrophages. *J. Immunol.* 2008; 181: 690-97
43. Kos J, Štrukelj B: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 144-145, 177, 178-180, 182
44. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscherr A, Ploegh H, Matsudaira P: Molecular cell biology, W. H. Freeman and Company, New York, 2008: 178-180, 189, 380-86
45. Kuhelj R: Biokemija v praksi: načela in tehnike, 3. izdaja, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2003: 67-74
46. Obermajer N, Repnik U, Jevnikar Z, Turk B, Kreft M, Kos J: Cysteine protease cathepsin X modulates immune response via activation of β 2 integrins. *Immunol.* 2008; 124: 76-88
47. Ward CJ, Crocker J, Chan SJ, Stockley RA, Burnett D: Changes in the expression of elastase and cathepsin B with differentiation of U937 promonocytes by GMCSF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 167: 659-64
48. Lennon-Dumenill AM, Bakker AH, Maehr R, Fiebiger E, Overkleeft HS, Roseblatt M, Ploegh HL, Lagaudriere-Gesbert: Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J. Exp. Med.* 2002; 196 (4): 529-40

49. Li Q, Bever CT: Interferon- γ induced increases in intracellular cathepsin B activity in THP-1 cells are dependent on RNA transcription. *J. Neuroimmunol.* 1997; 74: 77-84
50. Roshy S, Sloane BF, Moin K: Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Canc. Met. Rev.* 2003; 22: 271-86
51. Jevnikar Z, Obermajer N, Pečar-Fonović U, Karaoglanovic-Carmona, Kos J: Cathepsin X cleaves $\beta 2$ cytoplasmic tail of LFA-1 inducing the intermediate affinity form of LFA-1 and α -actinin-1 binding. *Eur.J.Immunol.* 2009; 39: 1-11
52. Cheng Y, Boll W, Kirchhausen T, Harrison SC, Walz Z: Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: Structural implications for coat assembly. *J. Mol. Biol.* 2007; 365: 892-99
53. Korade Z, Kenworthy AK: Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacol.* 2008; 55: 1265-73
54. Banati RB, Rothe G, Valet G, Kreutzberg WG: Detection of lysosomal cysteine proteases in microglia: Flow cytometric measurement and histochemical localization of cathepsin B and L. *Glia.* 1993; 7: 183-191