

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Romana VIDERGAR

**ŠTUDIJA VLOGE KATEPSINA L PRI APOPTOZI
GLIOBLASTOMSKIH CELIC Z UPORABO
SINTEZNIH IREVERZIBILNIH INHIBITORJEV
KATEPSINA L**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Romana VIDERGAR

**ŠTUDIJA VLOGE KATEPSINA L PRI APOPTOZI
GLIOBLASTOMSKIH CELIC Z UPORABO SINTEZNIH
IREVERZIBILNIH INHIBITORJEV KATEPSINA L**

MAGISTRSKO DELO

**STUDY OF THE ROLE OF CATHEPSIN L IN APOPTOSIS OF
GLIOBLASTOMA CELLS USING IRREVERSIBLE SYNTHETIC
INHIBITORS OF CATHEPSIN L**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek študija molekulske biologije. Delo je bilo opravljeno na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Tamaro Lah Turnšek, za somentorico dr. Ano Torkar in za recenzenta prof. dr. Petra Mačka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Tamara LAH TURNŠEK
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo
in biologijo raka

Član: prof. dr. Peter MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Romana Vidergar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 577.15 (043.3)=163.6
- KG glioblastom/celična linija U87-MG/katepsin L/selektivna inhibicija/apoptoza
- AV VIDERGAR, Romana
- SA LAH TURNŠEK, Tamara (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, II. stopnja – magistrski študijski program Molekulska biologija
- LI 2014
- IN ŠTUDIJA VLOGE KATEPSINA L PRI APOPTOZI GLIOBLASTOMSKIH CELIC Z UPORABO IREVERZIBILNIH INHIBITORJEV KATEPSINA L
- TD magistrsko delo (magistrski študij – 2. stopnja)
- OP XIV, 65 str., 14 pregl., 5 sl., 106 vir.
- IJ sl
- JJ sl/en
- AI Lizosomske peptidaze oz proteaze (katepsini) imajo pomembno vlogo pri razgradnji celičnih proteinov v lizosomih, lahko pa delujejo pri razgradnji proteinov tudi v drugih celičnih predelih. Poleg tega so vpleteni v proteolizno procesiranje specifičnih substratov, kar je pomembno v fizioloških procesih. Spremembe v aktivnosti teh proteaz vodijo do različnih bolezenskih stanj, med drugim tudi raka, zaradi česar je raziskovanje katepsinov in njihovih inhibitorjev zelo pomembno. Z napredovanjem tumorjev najpogosteje povezujemo cisteinska katepsina B in L, ki se povečano izražata tudi pri glioblastomu (GBM), najbolj malignem astrocitomu. Katepsin B ima pomembno vlogo pri invaziji tumorja, uporablja pa se tudi kot kazalec napovedi preživetja bolnikov z GBM. V nasprotju s katepsinom B je vloga katepsina L pri napredovanju GBM manj jasna. Nasprotujoče si raziskave kažejo na njegovo vlogo pri invaziji, senescenci in apoptozi celic GBM. Nekatere študije celo nakazujejo na verjetno vpletenost katepsina L v odpornost celic na kemoterapevtike. Znano je, da se katepsin L nahaja v celičnem jedru GBM in tam posredno vpliva na izražanje kaspaz 3 in 7, ki imata pomembno vlogo pri cepitvi specifičnih substratov, le ti pa povzročijo fenotipske celične spremembe, značilne za apoptozo. V tej nalogi smo želeli dokazati proapoptotsko vlogo inhibicije katepsina L s triazolnim aciloksimetilketonskim (AOMK) inhibitorjem AT094 v celični liniji GBM U87-MG. Inhibitor AT094 smo izbrali kot bolj selektivni inhibitor katepsina L v primerjavi s katepsinom B. V celicah U87-MG z inhibiranim katepsinom L smo sprožili apoptozo po notranji poti s stavrosporinom (STS) ali zunanji poti z dejavnikom tumorske nekroze α (TNF α) in aktinomicinom D (AktD). Vendar z različnimi testi apoptoze, kot so označenje celic z aneksinom V-FITC in propidijevim jodidom, prepustnost mitohondrijske membrane ter določanjem aktivnosti kaspaz 3 in 7, nismo zaznali dodatnega vpliva inhibicije aktivnega katepsina L na apoptozo celic U87-MG. V celicah U87-MG z inhibiranim katepsinom L smo povečali apoptozo le v kombinaciji s kemoterapevtikom arzenovim trioksidom (As₂O₃), ki se sicer uporablja za zdravljenje akutne promielocitne levkemije. To opažanje je vzpodbudno za prihodnje raziskave in razvoj pri zdravljenju raka s tem zdravilom.

KEYWORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDK 577.15 (043.3)=163.6s
- CX glioblastoma/cell line U87-MG/cathepsin L/the selective inhibition of/apoptosis
- AU VIDERGAR, Romana
- AA LAH TURNŠEK, Tamara (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programmes-Molecular biology
- PY 2014
- TI STUDY OF THE ROLE OF CATHEPSIN L IN APOPTOSIS OF GLIOBLASTOMA CELLS USING IRREVERSIBLE SYNTHETIC INHIBITORS OF CATHEPSIN L
- DT M. SC. Thesis (Master Study Programmes)
- NO XIV, 65 p., 5 tab., 14 fig., 106 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Lysosomal peptidases or proteases (cathepsins) play an important role in degradation of proteins in cell lysosomes or other cell compartments. Moreover, they are involved in the proteolytic processing of specific substrates, which plays an important role in the physiological processes. Studying of cathepsins and their inhibitors is very important since the changes of their activity lead to a variety of diseases including cancer. Cysteine cathepsins which are most commonly associated with the tumour progression are cathepsins B and L. Both mentioned cathepsins are highly expressed also in glioblastoma (GBM), the most malignant astrocytoma. Cathepsin B plays an important role in tumor invasion, but is also used as an indicator for survival of patients with GBM. In contrast, the role of cathepsin L in GBM progression is less clear. Many studies suggest its role in invasion, senescence and apoptosis of GBM cells. Some studies even indicate possible involvement of cathepsin L in resistance of GBM cells to chemotherapeutic agents. It is known that cathepsin L is located in the cell nucleus where indirectly affects the expression of caspases 3 and 7 which both have an important role in the cleavage of specific substrates that could result in phenotypic apoptotic changes. The aim of our study was to show proapoptotic role of cathepsin L inhibition with triazole acyloxymethyl ketone (AOMK) inhibitor AT094 in GBM cell line U87-MG. Inhibitor AT094 was chosen as a more selective inhibitor of cathepsin L in comparison to cathepsin B. The intrinsic apoptosis pathway in the U87-MG cells with inhibited cathepsin L was triggered with staurosporin (STS), whereas the external apoptosis pathway was triggered with tumor necrosis factor α (TNF α) and aktinomycin D (AktD). However, the apoptotic assays used in our study, such as the labeling of cells with Annexin V-FITC and propidium iodide, the permeability of mitochondrial membrane, and measuring the activity of caspases 3 and 7, did not show increased inhibitory effect of the active cathepsin L. In the U87-MG cells with inhibited cathepsin L apoptosis was increased only in addition of chemotherapeutic agent arsenic trioxide (As₂O₃) which is used for the treatment of acute promyelocytic leukemia. This observation is encouraging for future research of novel treatment approaches in cancer with this chemotherapeutic agent.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEYWORDS DOCUMENTATION.....	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
1 UVOD	1
1.1. NAMEN DELA IN HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 INCIDENCA RAKA	3
2.2 GLIOBLASTOM	4
2.3 PROTEAZE.....	6
2.3.1 Cisteinske proteaze	7
2.3.1.1 Zgradba in delovanje	7
2.3.1.2 Endogeni inhibitorji katepsinov	9
2.3.1.3 Katepsin L	9
2.3.1.4 Katepsin L pri raku in njegova vloga v apoptozi	10
2.3.1.5 Sintetični inhibitorji katepsina L	12
2.4. APOPTOZA	13
2.4.1 Regulacija apoptoze.....	14
2.4.1.1 Proteini Bcl-2.....	16
2.4.1.2 Inhibitorji apoptotskih proteinov (IAP).....	16
2.4.1.3 Kaspaze.....	17
2.4.1.4 Tumor-zaviralni gen p53	17
2.4.2 Arzenov trioksid in apoptoza v celicah GBM	17
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 MATERIALI	19
3.1.1 Kemikalije	19
3.1.2 Celične kulture.....	21
3.1.2.1 Celice humanega glioblastoma U87-MG	21
3.1.2.2 Celice humanih astrocitov NHA.....	21
3.2 METODE	19
3.2.1 Gojenje celičnih linij.....	22
3.2.2 Citotoksičnost inhibitorja AT094.....	23

3.2.2.1	Test MTT	23
3.2.2.2	Test MTS	24
3.2.3	Ekstrakcija proteinov	24
3.2.3.1	Ekstrakcija celokupnih celičnih proteinov	24
3.2.3.2	Ekstrakcija jedrnih in citosolnih proteinov.....	25
3.2.3.3	Merjenje koncentracije proteinov	26
3.2.4	Merjenje aktivnosti katepsinov	26
3.2.5	Prenos western	27
3.2.6	Analiza izražanja genov na ravni mRNA.....	29
3.2.6.1	Izolacija mRNA iz celic s TRIzol® reagentom.....	29
3.2.6.2	Merjenje koncentracije mRNA.....	30
3.2.6.3	Reverzna transkripcija – prepis mRNA v cDNA	30
3.2.6.4	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qRT-PCR).....	30
3.2.6.5	Analiza rezultatov qRT-PCR.....	32
3.3	APOPTOZA	32
3.3.1	Merjenje aktivnosti kaspaz 3 in 7	32
3.3.2	Prepustnost mitohondrijske membrane	33
3.3.3	Pretočna citometrija	33
3.3.4	Vpliv inhibitorja AT094 in arzenovega trioksida.....	35
3.3.4.1	Proliferacija celic U87-MG	35
3.3.4.2	Delež apoptotskih celic U87-MG	35
4	REZULTATI.....	36
4.1	VPLIV INHIBITORJA AT094 NA PREŽIVELOST CELIC U87-MG IN NHA36	
4.2	VPLIV INHIBITORJA AT094 NA SPECIFIČNO AKTIVNOST KATEPSINOV B IN L.....	37
4.3	LOKALIZACIJA KATEPSINOV B IN L V CELICI IN DETEKCIJA AKTIVNEGA KATEPSINA L V JEDRU.....	37
4.4	VPLIV INHIBITORJA AT094 NA APOPTOZO.....	40
4.4.1	Določanje deleža apoptotskih celic.....	40
4.4.2	Prepustnost mitohondrijske membrane	41
4.4.3	Aktivnost kaspaz 3 in 7	42
4.4.4	Izražanje proapoptotskih in antiapoptotskih genov	43
4.5	SINERGISTIČNI VPLIV INHIBITORJA AT094 IN ARZENOVEGA TRIOKSIDA.....	45
4.5.1	Proliferacija celic U87-MG	45
4.5.2	Apoptoza celic U87-MG	46

5	RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI	48
5.1	PRISOTNOST IN LOKALIZACIJA KATEPSINOV B IN L V CELICAH U87-MG.....	48
5.2	CITOTOKSIČNOST INHIBITORJA AT094 NA HUMANIH CELIČNIH LINIJAH U87-MG IN NHA	50
5.3	SELEKTIVNOST INHIBITORJA AT094	51
5.4	DELOVANJE INHIBITORJA AT094 NA APOPTOZO	51
5.5	SINERGISTIČNO DELOVANJE ARZENOVEGA TRIOKSIDA IN INHIBITORJA AT094 – PRIHODNOST V PROTIRAKAVI TERAPIJI.....	51
6	SKLEPI	54
7	VIRI	55
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Sl. 1: Biosinteza katepsinov v celici	8
Sl. 2: Shematski prikaz vloge katepsina L pri raku	11
Sl. 3: Inhibitor AT094 s spremenjenim mestom P1	13
Sl. 4: Celični liniji NHA (A) in U87-MG (B)	22
Sl. 5: Citotoksičnost inhibitorja AT094 za celice U87-MG (levo) in NHA (desno).....	36
Sl. 6: Vpliv inhibitorja AT094 na specifične aktivnosti katepsinov B in L	37
Sl. 7: Določitev prisotnosti izražanja različnih oblik A) katepsina B in B) katepsina L v celicah U87-MG	38
Sl. 8: Izražanje aktivne oblike katepsina B in L označene s fluorescenčno sondo AT071Cy3	39
Sl. 9: Delež apoptotskih celic U87-MG po inhibiciji katepsina L z inhibitorjem AT094...	41
Sl. 10: Vpliv inhibitorja katepsina L, AT094, na prepustnost mitohondrijske membrane celic U87-MG	42
Sl. 11: Vpliv inhibitorja katepsina L, AT094, na aktivnost kaspaz 3 in 7 v celicah U87-MG	43
Sl. 12: Izražanje apoptotskih genov Bax (A.), Bcl-2 (B.) in p53 (C.) ter razmerje genov Bax/Bcl-2 (D.) v celicah U87-MG	44
Sl. 13: Vpliv inhibitorja katepsina L, AT094, in As ₂ O ₃ na viabilnost celic U87-MG.....	46
Sl. 14: Vpliv inhibitorja AT094 in As ₂ O ₃ na delež apoptotskih celic U87-MG	47

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Uporabljeni reagenti in njihovi proizvajalci	19
Pregl. 2: Sestava rastnih medijev za humani celični liniji.....	22
Pregl. 3: Sestava homogenizacijskega pufra	25
Pregl. 4: Sestava raztopine za homogenizacijo celic	25
Pregl. 5: Sestava gela NaDS PAGE za ločevanje proteinov	29

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

AIF	inducirajoč dejavnik apoptoze (ang. apoptosis inducing factor)
AktD	aktinomicin D (ang. actinomycin D)
AOMK	aciloksimetilketon (ang. acyloxymethyl ketone)
Apaf1	faktor aktivacije apoptotskih proteaz (ang. apoptotic protease activating factor 1)
As ₂ O ₃	arzenov trioksid (ang. arsenic trioxide)
ATCC	Ameriška zbirka celičnih kultur (ang. American type culture collection)
Bak	antagonist/ubijalec homologen Bcl-2 (ang. Bcl-2 homologous antagonist/killer)
Bax	z Bcl-2 povezan x protein (ang. Bcl-2-associated X protein)
Bcl-2	limfom 2 B-celic (ang. B-cell lymphoma-2)
Bcl-X _L	B-celična levkemija/limfom XL (ang. Bcl2-like L protein)
Bid	protein z domeno BH3 (anf. BH3-interacting domain death agonist)
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
Cat	katepsin (ang. cathepsin)
DIABLO	protein z direktno vezavo na IAP z nizko pI (ang. direct IAP-binding protein with low pI)
DMEM	Eaglov medij z Dulbeccovimi modifikacijami (ang. Dulbecco's modified Eagles medium)
DMSO	dimetilsulfoksid (ang. dimethylsulfoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleinic acis)
DTT	ditiotreitol (ang. dithiothreitol)
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
FADD	S Fas-proteinom-povezana domena smrti (ang. Fas associated death domain)
FBS	serum govejih zarodkov (ang. foetal bovine serum)

GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GDP	gvanozin-difosfat (guanosine diphosphate)
GTP	gvanozin-trifosfat (guanosine triphosphate)
HSP27	protein toplotnega šoka 27 (ang. heat shock protein 27)
HTRA	serinska proteaza, ki se inducira s toplotnim šokom (ang. heat shock induced serine protease)
IAP	celični inhibitor apoptoze (ang. cellular inhibitor of apoptosis)
MHC-II	poglavitni kompleks tkivne skladnosti II. razreda (ang. major histocompatibility complex II)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (ang. messenger ribonucleic acid)
MTT	13-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NF- κ B	jedrni faktor κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (ang. phosphate buffered saline)
PDVF	poliviniliden difluorid (ang. polyvinylidene difluoride)
PI	propidijev jodid (ang. propidium iodide)
PMS	fenazin metasulfat (ang. phenazine methosulfate)
PMSF	fenilmetilsulfonyl fluorid (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z dodatkom natrijevega dodecilsulfata (ang. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)
siRNA	majhna interferenčna ribonukleinska kislina (ang. small interfering ribonucleic acid)
Smac	sekundarni mitohondrijski aktivator kaspaz (ang. second mitochondrial activator of caspases)
STS	stavrosporin (ang. staurosporine)
TRAIL	TNF soroden apoptozo inducirajoč ligand (ang. TNF-related apoptosis inducing ligand)

WHO Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organisation)

XIAP inhibitor apoptoze (ang. X-linked inhibitor of apoptosis)

1 UVOD

Glioblastom je najbolj pogosta in smrtna oblika možganskega tumorja pri človeku, povprečna življenjska doba bolnikov po diagnozi je 12 mesecev. Zdravljenje se začne s kirurško odstranitvijo tkiva, nadaljuje pa se z radio- in kemoterapijo. Za GBM je značilno razraščanje v okoliško tkivo, kar preprečuje možnost popolne kirurške odstranitve tega tumorja. Pri proteolizni razgradnji zunajceličnega matriksa in agresivni invaziji glioblastomskih celic v okoliško tkivo, imajo zelo pomembno vlogo številne proteaze, tudi cisteinska katepsina B in L (Levičar in sod., 2003). Katepsin B ima pomembno vlogo pri invaziji tumorskih celic, medtem ko vloga katepsina L v tem procesu ni tako jasna (Strojnik in sod., 2005). Z znižanjem izražanja katepsina L s protismiselno siRNA so potrdili povečano občutljivost celic GBM na apoptozo. Nadaljne preučevanje vloge katepsina L je pokazalo, da se ta nahaja v jedru celic GBM in tam posredno regulira izražanje kaspaz 3 in 7 (Kenig in sod., 2013). Pokazano je bilo tudi, da je katepsin L vpleten pri odpornosti celic na zdravljenje s kemoterapevtiki (Zheng in sod., 2004). Povečan delež apoptotskih celic so zaznali tudi v primeru, ko so celicam GBM utišali katepsin L in jih hkrati tretirali z arzenovim trioksidom (Pucer in sod., 2010). Torej omenjene raziskave nakazujejo, da ima katepsin L v celicah GBM antiapoptotsko vlogo, hkrati pa je znano, da njegova vsebnost v rakavih celicah narašča s stopnjo malignosti. Torej bi lahko s selektivno inhibicijo katepsina L v pooperativni terapiji s citostatiki GBM uspešno zdravili.

1.1. NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen magistrskega dela je pokazati, da inhibicija katepsina L v celicah GBM deluje proapoptotsko, kar pomeni, da spodbuja prehod celic v apoptozo.

Katepsin L v celični liniji GBM U87-MG smo inhibirali z aciloksimetilketonskim (AOMK) inhibitorjem AT094, ki ima vgrajeno triazolno skupino na mestu P1` v molekuli. Selektivnost omenjenega inhibitorja smo preverili z uporabo rekombinantnih katepsinov B in L ter na celicah U87-MG, za katere je znano, da močno izražajo katepsin L. V obeh primerih se je opisani inhibitor izkazal kot bolj selektivni inhibitor katepsina L v primerjavi s katepsinom B (Torkar in sod., 2013).

V okviru magistrskega dela smo postavili naslednji hipotezi:

1. Predpostavljamo, da bomo s fluorescenčno sondo AT071Cy3 označili katepsin L, ki se nahaja v jedru celic GBM in z inhibitorjem AT094 inhibirali njegovo delovanje ter s tem potrdili njegovo aktivno obliko v jedru. Domnevamo, da katepsin L deluje antiapoptotsko preko procesiranja določenih transkripcijskih faktorjev v jedru, zato bi selektivna inhibicija katepsina L z inhibitorjem AT094 pripomogla k večji občutljivosti celic U87-MG na apoptozo.
2. Selektivna inhibicija katepsina L z inhibitorjem AT094 nam bo omogočila potrditev in proučevanje vloge katepsina L v GBM. Predpostavljamo tudi, da bi z sočasno uporabo kemoterapevtika arzenovega trioksida (As_2O_3), ki v tumorskih celicah sproži apoptozo preko predhodne avtofagije, in inhibitorja AT094, sinergistično povečali občutljivost celic GBM na apoptozo *in vitro*, kar bi lahko bila spodbudna strategija za nadaljne zdravljenje tega tumorja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 INCIDENCA RAKA

Raziskava v letu 2012 je pokazala, da v Evropi za rakom zbolijo približno 3-4 milijona ljudi na leto, od katerih jih kar polovica umre. Najbolj pogost je rak dojke (464,000 pojavov/leto) sledijo mu rak debelega črevesja in danke (447,000), prostate (417,000) in pljuč (410,000). Najbolj smrtonosen je rak pljuč (353,000 smrti/leto), sledijo mu rak debelega črevesja in danke (215,000), dojke (131,000) in želodca (107,000). V Evropski uniji za rakom zbolijo letno 1,2 milijona žensk in 1,4 milijona moških in letno umre okoli 707,000 moških in 555,000 žensk (Ferlay in sod., 2013). Razvoj raka poteka v večih fazah, ki so posledica kopičenja genetskih in epigenetskih sprememb v celici. Na genetski ravni v celici opazimo povečano izražanje onkogenov in znižano izražanje tumor zaviralnih genov. Zaradi teh sprememb celica izgubi možnost popravljanja napak DNA med celično delitvijo, celice ne gredo v programirano celično smrt (apoptozo) in nastopi faza nekontrolirane celične delitve (Lah in sod., 2006). Celični cikel normalne celice uravnavajo proteini, ki jih imenujemo protoonkogeni. Protoonkogeni so geni, ki nosijo zapis za rastne faktorje (*ras*, *src*) in transkripcijske faktorje (*myc*, *fos*). Omogočijo prehod celice skozi kontrolne točke celičnega cikla iz faze G1 v fazo S (sintezo DNA) in iz faze G2 v mitozo (celično delitev) le, če tekom podvajanja DNA ni prišlo do napak. Če pride do mutacij v protoonkogenih govorimo nadalje o onkogenih. Produkti onkogenov so v celici bolj aktivni in omogočijo prehod celice skozi kontrolne točke celičnega cikla kljub poškodovani DNA, kar vodi celico v nekontrolirano celično delitev in preprečuje prehajanje v apoptozo.

Duga vrsta mutacij, ki privedejo do nastanka onkogenov so kromosomske translokacije. Pri tem lahko nastanejo fuzijski proteini, ki vsebujejo na N-terminalnem delu en protein in na C-terminalnem delu drug protein ali pa mutacija vodi v spremenjeno izražanje proteina. Primer kromosomske translokacije je onkogen BCR/ABL, znan tudi kot kromosom Philadelphia in ga najdemo pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo.

Pri tretji vrsti mutacij ne pride direktno do spremembe protoonkogenov v onkogen, ampak število kopij protoonkogenov v celici močno naraste. Tak primer je transkripcijski faktor c-

MYC, ki zaradi povečanega izražanja v celici deluje na več transkripcijskih tarč, kar je verjetno vzrok za neprekinjeno celično delitev. Posledica te mutacije je izguba funkcije proteina in zelo redko spremenjen fenotip (Langauer in sod., 2002)

Različno od protoonkogenov in onkogenov v celici delujejo tumor-zaviralni geni. Ti geni določajo proteine, ki prekinajo celični cikel in nadaljno delitev celice ali izzovejo apoptozo. Primer tumor-zaviralnega gena je RB1, ki določa protein retinoblastoma (pRB) in prepreči vstop celice skozi S fazo v mitozo in s tem zavre nekontrolirano celično delitev. Če pride do mutacij v pRB, ki jih povzročijo spremembe bralnega okvirja ali delecije, se celična delitev ne more ustaviti in vodi do tvorbe tumorja (Burkhart in sod., 2008). Najbolj znan tumor-zaviralni gen je p53 in mutacije v tem genu so najpogostejši vzrok za nastanek raka. Protein p53 deluje kot transkripcijski faktor, ki pri poškodbah DNA aktivira proteine, ki zavirajo celično proliferacijo in spodbujajo apoptozo. Pri celičnem ciklu kontrolira prehod celice iz G1 v S fazo. Mutacije, ki inhibirajo p53 inhibirajo tudi odziv celice na poškodbe DNA, zato se celica, kljub poškodbam DNA, deli naprej (Chow in sod., 2010). Posledica celične delitve kljub genetskim napakam je prenos teh v naslednje generacije in upad v izražanju specifičnih genov, s tem pa izguba ali pridobitev različnih funkcij. Pridobljene celične funkcije lahko vplivajo na boljšo prilagoditev celice na okolje, s čimer se celici poveča možnost preživetja, lahko pa vodi pridobljena funkcija naprej v nekontrolirano proliferacijo in nastanek tumorja.

Poznamo več vrst mutacij, ki vodijo do nastanka rakavega tumorja. To so lahko že majhne spremembe v sekvenci nukleotidov (substitucije, delecije ali insercije nukleotidov), spremembe v številu kromosomov (aneuploidije), kromosomske translokacije (fuzije dveh/več različnih kromosomov ali premestitve na enem kromosomu) in podvojitve genov (genske amplifikacije) (Langauer in sod., 1998). Poznamo vsaj 5 večjih razvojnih faz tumorja, kot so proliferacija, apoptoza, nastanek novega žilja (angiogeneza), invazija in migracija celic. Razlika med zdravimi in rakavimi celicami je v tem, da v zdravih celicah obstaja ravnovesje med celično delitvijo in celično smrtjo (apoptozo), medtem ko je v rakavih celicah to ravnovesje porušeno v prid celični delitvi (Eichhorst in sod., 2002). Nekontrolirana proliferacija je značilna za vse vrste tumorskih celic in ni odvisna od signalov mikrookolja, ki nadzirajo celično delitev v normalnih celicah (Evan in sod., 2001). Ko tumor doseže določeno velikost, postane odvisen od oskrbe s kisikom in

nutrienti, kar zagotavlja angiogeneza. Posledica invazije in metastaziranja rakavih celic je v 90% smrt bolnika. Za metastaziranje je značilno več zaporednih stopenj. Prva stopnja metastaziranja nastopi, ko se rakave celice odcepijo od primarnega tumorja, sledi ji invazija v okoliško tkivo (ekstracelularni matriks) in invazija skozi bazalne membrane žil in limfnih kanalov. Iz njih se celice sprostijo v limfni ali krvni obtok. V limfnem ali krvnem obtoku tumorske celice pridejo v stik z drugimi celicami (trombociti, limfociti in endotelijskimi celicami sekundarnih organov) in lahko tvorijo skupke ob stenah žil v primeru, da pride do interakcije s trombociti. Sledi izstop tumorskih celic iz krvnega obtoka in invazija v sekundarno tkivo ter celična kolonizacija. V zadnji stopnji metastaziranja pride do angiogeneze (Cairns in sod., 2003).

2.2 GLIOBLASTOM

Glioblastom (GBM) uvrščamo med najbolj pogosto in smrtno obliko možganskega tumorja, ki na leto prizadane od 3 do 5 ljudi na 100000 prebivalcev. Možganske tumorje delimo glede na vrsto celic, iz katere se razvije tumor. Poznamo meningiome, astrocitome, oligodendrogliome in tumorje ependimskih ter nevronskih celic (Rodriguez-Mora in sod., 2003). Po klasifikaciji Svetovne zdravstvene organizacije (ang. World Health Organization, WHO) astrocitne tumorje delimo v 4 razrede, glede na stopnjo malignosti: pilocitni astroцитom (1. razred), difuzni astroцитom (2. razred), anaplastični astroцитom (3. razred) in glioblastom (4. razred), ki je med vsemi tudi najbolj malignen. Za 1. razred je značilen nizek proliferacijski potencial, tumorji so biološko benigni in kirurško popolnoma odstranljivi in ozdravljivi. Nizek proliferacijski potencial je značilen tudi za 2. razred, vendar so ti astroцитomi infiltrativni in se lahko razvijejo v višje stopnje malignosti. Za tumorje 3. razreda so značilne anaplastične spremembe (atipična jedra) in visoka mitotska aktivnost, medtem ko tumorji 4. razreda kažejo visoko mikrovaskularno proliferacijo, so najbolj invazivni in neozdravljivi (Louis in sod., 2007). GBM delimo na primarne in sekundarne. Primarni GBM nastanejo *de novo*, sekundarni GBM pa se razvijejo iz tumorjev nižje stopnje malignosti, običajno 5-10 let po določitvi osnovne diagnoze, ne glede na zdravljenje (Maher in sod., 2001). Sekundarni GBM so redkejši in se pogosteje pojavljajo pri ženskah ter mlajših bolnikih (Ohgaki in sod., 2012). Zanje so predvsem značilne mutacije v genu *p53* in genu za retinoblastom (*Rb*) ter kasneje v razvoju pride do

izgube heterozigotnosti na kromosomih 17p, 19q in 10q. Za agresivnejši primarni GBM je značilna pomnožitev EGFR, mutacija PTEN in delecija p16 INK4a (Tso in sod., 2006). Življenjska doba bolnikov z GBM po operaciji je običajno od 10 do 14 mesecev. Popolna kirurška odstranitev GBM je zaradi invazivnosti in infiltracije tumorskih celic v druge dele možganov nemogoča (Westermarck in sod., 2012). Zdravljenje GBM se začne s kirurško odstranitvijo tumorja, nadaljuje pa se s kombinacijo obsevanja in kemoterapije z alkilirajočim agensom temozolomidom. Poleg klasične kemo- in radioterapije, ki v tumorjih lahko izzove apoptozo, so v teku testiranja različnih proapoptotičnih agensov, ki so najbolj usmerjena proti dejavniku tumorske nekroze (TNF) (Bellail in sod., 2009). K neuspešnemu zdravljenju GBM prispeva tudi heterogenost te skupine tumorjev in njihova odpornost na zdravljenje (Lima in sod., 2012).

2.3 PROTEAZE

Proteaze (imenovane tudi peptidaze, proteinaze ali proteolizni encimi) so skupina encimov, ki katalizirajo cepitev peptidne vezi v procesu imenovanem proteoliza. Najnovejšo razvrstitev proteaz predstavlja klasifikacijski sistem MEROPS (dostopen na <http://merops.sanger.ac.uk/>) (Rawlings in sod., 2006). Ta sistem razvršča proteaze v klane na osnovi katalitskega mehanizma in v družine, na osnovi njihove evolucijske sorodnosti. Proteaze tako delimo na aspartatne, cisteinske, glutaminske, metalo-proteaze, asparaginske, proteaze mešanega katalitskega tipa, serinske, treoninske in proteaze z neznanim katalitskim mehanizmom (Rawlings in sod. 1993). Proteaze igrajo ključno vlogo v mnogih fizioloških procesih, kot so razvoj celičnega cikla, diferenciacija in migracija, morfogeneza in preoblikovanje tkiv, razvoj živčnih celic, ustavitve krvavitev in celjenje ran, predstavitev antigenov, migraciji monocitov, imunskem odzivu, angiogenezi in apoptozi (Lopez-Otin in sod., 2008). Proteaze so regulirane na nivoju transkripcije, translacije in s posttranslacijskimi spremembami. Običajno se proteaze sintetizirajo v neaktivni obliki, aktivirajo pa se avtokatalitsko v primernem pH-okolju ali preko proteolizne cepitve z drugimi proteazami (Turk in sod., 2000). Spremembe v aktivnosti proteaz vodijo do različnih bolezenskih stanj, kot so rast tumorjev in metastaziranje, vnetne, nevrodegenerativne in kardiovaskularne bolezni (Lopez-Otin in sod., 2008; Barret in sod., 2004). Delovanje proteaz uravnavajo tudi njihovi endogeni inhibitorji, pri čemer je

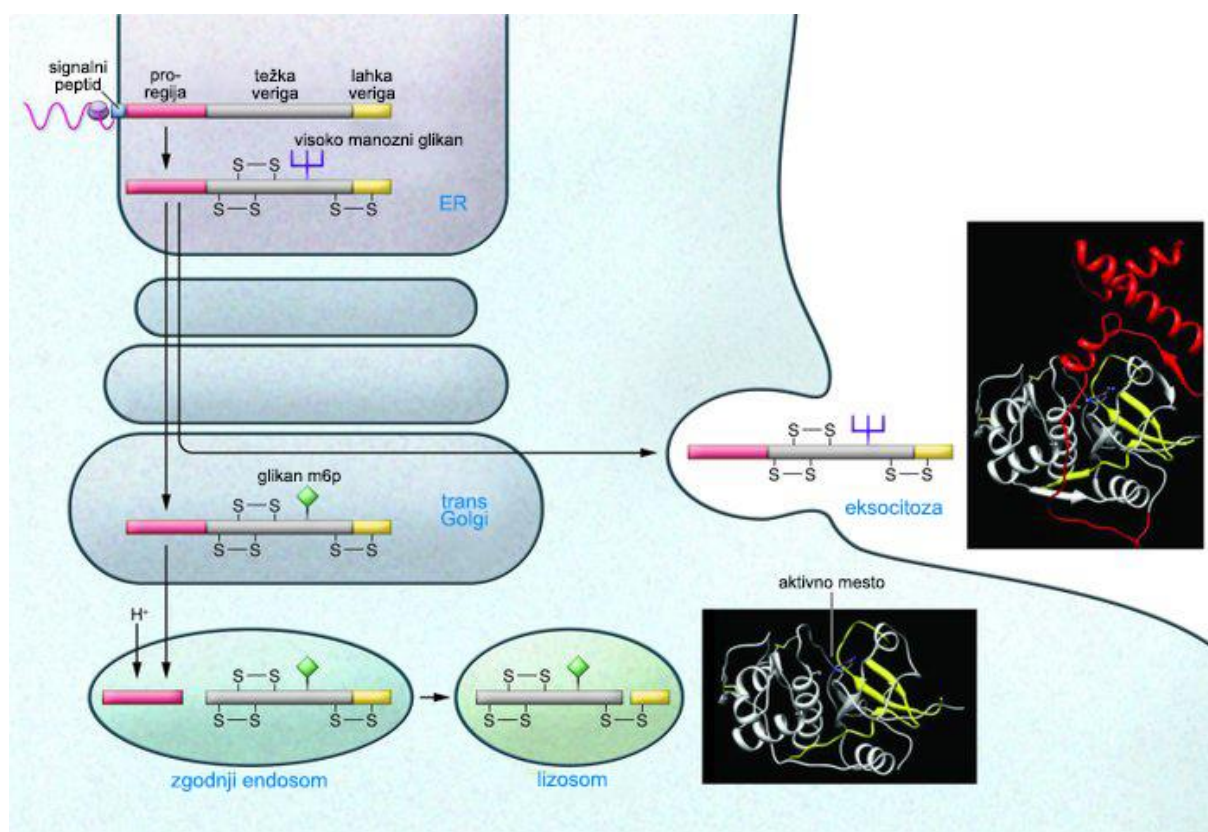
najbolj pomembno razmerje koncentracij proteaze in inhibitorja (Turk in sod., 2000). Proteaze zaradi svoje regulacijske vloge in udeležnosti pri bolezenskih procesih v medicini predstavljajo potencialne tarče za zdravljenje (Turk in sod., 2000; Willstätter in sod., 1929).

2.3.1 Cisteinske proteaze

2.3.1.1 Zgradba in delovanje

V našem delu smo se podrobno osredotočili na cisteinske proteaze, ki jih imenujemo tudi katepsini, kar v grščini pomeni »prebaviti«. Katepsini so aktivni v rahlo kislem okolju (Willstätter in sod., 1929). Glede na njihovo zgradbo in katalitsko aktivnost jih delimo na serinske (katepsin A in G), aspartatne (katepsin D in E) in cisteinske katepsine iz poddružine papainu podobnih proteaz. Cisteinski katepsini predstavljajo največjo katepsinsko družino C1A (klan CA), kjer pri človeku najdemo 11 proteaz (katepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W in X) (Rawlings in sod., 2008). V splošnem so cisteinski katepsini stabilni v kislih celičnih predelkih, kot so lizosomi in endosomi. V zadnjem desetletju pa so raziskave pokazale, da imajo katepsini pomembno vlogo tudi zunaj celice in v drugih organelih v celici, kot so izločalni (sekrecijski) vezikli (Wartmann in sod., 2010; Puri in sod., 2008), citosol (Sever in sod., 2007) in jedro (Goulet in sod., 2004).

Slika 1 prikazuje biosintezo cisteinskih katepsinov, ki se sintetizirajo kot preproencimi z N-terminalnim signalnim peptidom. Ta jih usmeri v lumen endoplazemskega retikuluma, kjer pride do odcepitve N-terminalnega signalnega peptida in N-glikozilacije. Propeptid zaradi domene na N-terminalnem koncu ni aktiven, ker se domena nekovalentno (razen pri katepsinu X) veže v aktivno mesto encima in deluje avtoinhibicijsko. Znotraj Golgijevega aparata se manozni ostanek fosforilira v manozo-6-fosfat. Katepsini se vežejo na manozo-6-fosfatne receptorje, ki jih iz Golgijevega aparata usmerijo v endosom/lizosom. Katepsini se sintetizirajo kot neaktivni prekurzorji in se aktivirajo s proteolitično odstranitvijo N-terminalnega propeptida v kislem okolju endosoma/lizosoma. Majhen delež (5%) katepsinov ne potuje do lizosomov, ampak se iz celice izloči v obliki proencima (sl. 1) (Carmona in sod., 1996; Reiser in sod., 2010).



Slika 1: Biosinteza katepsinov v celici
(prirejeno po Reiser in sod., 2010; 3426)

Katepsini imajo zelo podobno zaporedje aminokislin in terciarno strukturo. Strukturno se med seboj nekoliko razlikujejo, zato so specifični za različne substrate in inhibirani z različnimi inhibitorji. So razmeroma majhni proteini, z molekularno maso okoli 30 kDa in imajo aktivno mesto v obliki črke V, ki je sestavljeno iz dveh domen. Leva domena (L) je sestavljena iz treh α vijačnic, desna domena (R) pa iz sodčkov (McGrath in sod., 1999). Katalitična diada aktivnega mesta je sestavljena iz cisteina na L domeni in histidina na D domeni (Brocklehurst in sod., 1994). Večina cisteinskih katepsinov so endopeptidaze. Izjeme so eksopeptidazi katepsina C in X (Klemenčič in sod., 2000) ter katepsina H in B, ki imata tako ekso- kot endopeptidazno aktivnost (Shi in sod., 1999).

Glavna naloga katepsinov je celična razgradnja proteinov v lizosomih. V zadnjem času raziskave kažejo, da se nekatere proteaze nahajajo le v določenih tkivih (npr. katepsin S, V in K) in v različnih organelih v celici, ne le v lizosomih, kar pomeni, da imajo bolj specifične naloge pri patoloških in fizioloških procesih (Vasiljeva in sod., 2008). Cisteinski

katepsini sodelujejo pri razgradnji invariantne verige poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti II. razreda (MHC-II), kar jim daje pomembno vlogo pri imunskem odzivu. Sodelujejo tudi pri razvoju srčne mišice (Stypmann in sod., 2002), razgradnji kosti (Kakegawa in sod., 1993), procesiranju hormonov (Dunn in sod., 1991), aktivaciji proteinskih prekurzorjev (prohormonov) in diferenciaciji keratinocitov v procesu celjenja ran (zbrano v Vasiljeva in sod., 2007).

2.3.1.2 Endogeni inhibitorji katepsinov

Aktivirani katepsini so v celici lahko zelo škodljivi, zato so nujno potrebni tudi endogeni inhibitorji lizosomskih cisteinskih proteaz, ki kontrolirajo njihovo prekomerno delovanje. Ti inhibitorji se imenujejo cistatini in s proteinazami tvorijo tesne nekovalentne vezi (Turk in sod., 1993). V naddružino cistatinov uvrščamo stefine (stefin A, B), cistatine (cistatin C, S, D, E/M, F), kininogene in tiropine. Stefini (podružina I25A) so enoveržni proteini (približno 100 aminokislinskih ostankov) ter se sintetizirajo brez signalnega peptida. Poleg tega ne vsebujejo ogljikovih hidratov in disulfidnih vezi. Običajno se nahajajo znotraj celice in manj v telesnih tekočinah. Cistatini (podružina I25B) so enako kot stefini enoveržni proteini (približno 115 aminokislinskih ostankov) z ohranjenimi disulfidnimi vezmi, ki vsebujejo signalni peptid in se nahajajo zunaj celice. Pri sesalcih poznamo tudi dve skupini kininogenov, in sicer kininogene z visoko molekularno maso (HK) in kininogene z nizko molekularno maso (LK). So glikozilirane molekule, ki vsebujejo tri cistatinske domene na težkih verigah HK in LK, vendar sta le dve od njih inhibitorni za cisteinske katepsine. Najdemo jih v krvi, sklepnih tekočinah in drugih telesnih tekočinah. Cisteinske proteinaze inhibirajo tudi tiropini (družina I31); to so različni proteini (IGFBP, nidegen, testikan, p41 invariantna veriga MHC-II), ki vsebujejo tiroglobulinske domene tipa 1 in so bolj selektivni od cistatinov (zbrano v Turk in sod., 2012).

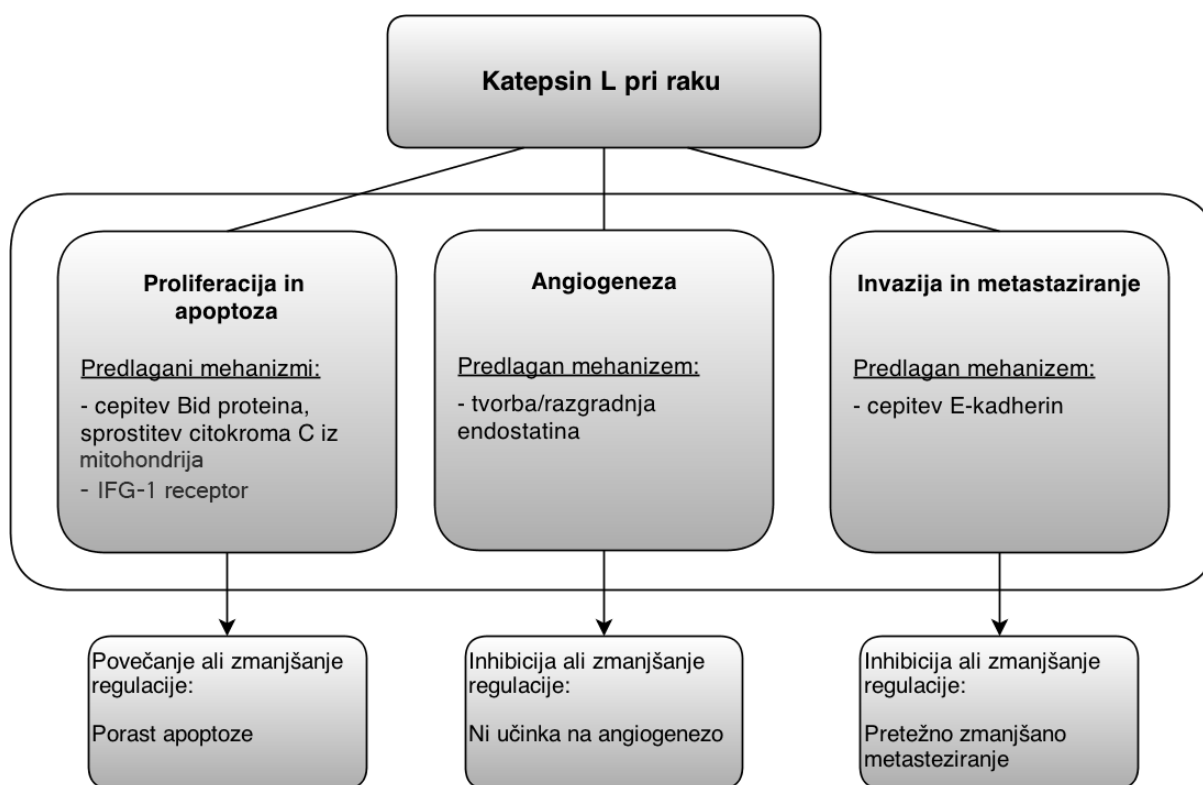
2.3.1.3 Katepsin L

Vloga katepsina L v celicah kljub temeljitemu preučevanju še ni v celoti pojasnjena (Katunuma in sod., 1989). Znotrajcelično proteolitsko delovanje katepsina L pomembno vpliva na številne celične procese. Domnevajo, da katepsin L vpliva na regulacijo celičnega cikla preko razgradnje jedrnih transkripcijskih faktorjev (Goulet in sod., 2004).

Sodeluje pri razgradnji invariantne verige na MHC-II kompleksu, kar mu daje pomembno vlogo pri imunskem odzivu (Nakagava in sod., 1998). Vpleta se tudi v razgradnjo komponent zunaj celičnega matriksa (ECM), kot so kolagen tipa I in IV, fibronektin in laminin, zato ima pomembno vlogo pri invaziji (Skrzydłewska in sod., 2005). Izražanje katepsina L v žlezah, kot je priželjc, se je izkazalo kot nujno potrebno za razvoj naravnih celic ubijalk (Nakagava in sod., 1998; Bylaite in sod., 2006). Pomembno vlogo ima tudi pri razvoju postnatalnega centralnega živčnega sistema, kjer sodeluje v verigi procesov, ki so ključni za nastanek in obnavljanje aksonov in sinaps (Stahl in sod., 2007). Katepsin L ima nezamenljivo vlogo pri epidermalni homeostazi in obnavljanju dlačnih mešičkov, kot so pokazali poskusi na miših z utišanim genom katepsina L. Poskusne miši so trpele za izgubo dlake, epidermalno hiperplazijo, akantozo, hiperkeratozo in nenormalno spermatogenezo, dodatno se je pri starejših miših razvila še kardiomiopatija (Roth in sod., 2000; Stypmann in sod., 2002). Pri miših z izraženo neaktivno obliko katepsina L, se je pojavil nenormalen razvoj spermijev (Wright in sod., 2003).

2.3.1.4 Katepsin L pri raku in njegova vloga v apoptozi

Povišano izražanje katepsina L je bilo dokazano pri raku dojke, pljuč, želodca, črevesja, karcinomu vratu, melanomu in gliomu (Gocheva in sod., 2007). Katepsin L pri raku nima napovedne vrednosti za dolžino preživetja bolnikov, vendar je njegovo izražanje povišano v najbolj malignih oblikah tumorjev, zato nekateri znanstveniki menijo, da naj bi bil katepsin L bolj kot ostale cisteinske proteaze dobra tarča v boju zoper raka (Skrzydłewska in sod., 2005). Učinek izražanja katepsina L na posamezne stopnje v razvoju malignega tumorja, preučujemo z genetskimi modifikacijami (npr. izbitje gena za katepsin L) in z uporabo inhibitorjev katepsina L. Pri inhibiciji je pomanjkanje katepsina L le delno in začasno, medtem ko je pri izbitju gena, izguba katepsina L popolna, stalna in neobnovljiva (Lankelma in sod., 2010).



Slika 2: Shematski prikaz vloge katepsina L pri raku
(prirejeno po Lankelma in sod., 2010; 227)

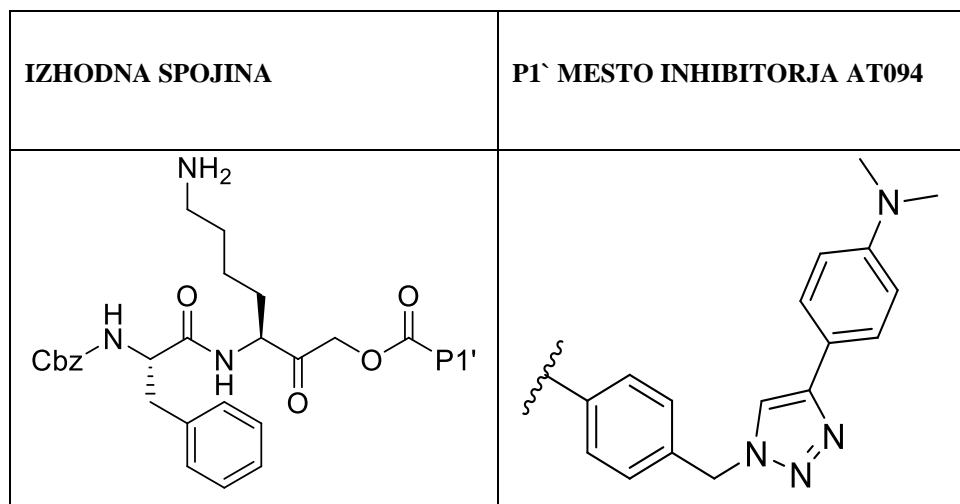
V razvoju raka ima katepsin L pomembno vlogo pri invaziji in metastaziranju tumorskih celic. V kislem okolju naraste njegova zunajcelična aktivnost, posledično pa se zmanjša tudi celična adhezija (Gocheva in sod., 2007). Celična adhezija se delno zmanjša ker katepsin L cepi adherentne molekule, kot je npr. E-kadherin (Gocheva in sod., 2006). Zaradi upada celične adhezije namreč naraste razgradnja zunajceličnega matriksa, pri čemer katepsin L cepi kolagen tipa I in IV, fibronektin in laminin (Gocheva in sod., 2007). Razgradnja zunajceličnega matriksa povzroči sproščanje rastnih dejavnikov na metastatska mesta, kar nakazuje, da z inhibicijo katepsina L lahko zmanjšamo nastanek metastaz (Lah in sod., 2006). Katepsin L sodeluje v procesu angiogeneze, tako da cepi kolagen tipa XVIII v endostatin. Endostatin pa je znan kot zaviralec angiogeneze *in vitro* ter *in vivo* (Dass in sod., 2007; Joyce in sod., 2004). Vpliv katepsina L na apoptozo je znan, vendar njegov mehanizem delovanja v procesu apoptoze ni pojasnjen. Poškodbe lizosomov, ki jih povzročijo razna zdravila, agensi in oksidativni stres, povzročijo sproščanje katepsinov iz lizosomov v citosol in to postopoma privede do apoptoze (Zhao in sod., 2001; Van Nierop in sod., 2006). Predlagan proapoptotski mehanizem, pri katerem sodeluje poleg drugih

cisteinskih proteaz tudi katepsin L, je cepitev proteina Bid (iz družine Bcl-2 proteinov), kar povzroči sprostitvev citokroma c iz mitohondrijev in posledično apoptozo (Stoka in sod., 2001). Proapoptotsko vlogo katepsina L so potrdili tudi po okužbi človeških celic GBM s parvovirusom H-1, kjer so izmerili porast apoptoze. Ugotovili so, da porast celične smrti v celicah GBM sovпада s kopičenjem katepsinov B in L v citosolu in upadom ravni cistatinov B in C, ki sta njuna endogena inhibitorja (Di Piazza in sod., 2007). Nasprotno nekatere raziskave potrjujejo antiapoptotsko vlogo katepsina L. Poskusi na transgenih miših RIP1-Tag2 z utišanim genom za katepsin L, so namreč pokazali povečano stopnjo apoptoze, kar bi lahko bila posledica vpliva katepsina L v celicah na zmanjšanje receptorja za inzulinu-podoben rastni dejavnik 1 (IGF-1) in s tem pospešitev apoptoze *in vivo* (Gocheva in sod., 2007; Gocheva in sod., 2006; Navab in sod., 2008). Dokazano je bilo tudi, da zmanjšano izražanje katepsina L poveča odziv tumorskih celic *in vitro* na apoptozo, sproženo po notranji ali zunanji poti (Zajc in sod., 2006; Levičar in sod., 2003; Pucer in sod., 2010; Kenig in sod., 2011). Celice GBM z zmanjšanim izražanjem katepsina L so bile bolj občutljive na apoptozo, sproženo po notranji ali zunanji poti, kar kaže na to, da je antiapoptozno delovanje katepsina L zgodnji dogodek v apoptoznih kaskadah (Zajc in sod., 2006; Kenig in sod., 2011). Pri nadaljnjem proučevanju lokacije katepsina L so ugotovili, da se ta nahaja v jedru, kjer posredno regulira izražanje kaspaz 3 in 7 (Kenig in sod., 2011). Prav tako so študije pokazale, da je zmanjšanje aktivnosti katepsina L v celicah U87-MG značilno povečalo aktivnost kaspaz 3 in 7 ter celično smrt, ki jo sproži arzenov trioksid (As_2O_3). Za zmanjšanje aktivnosti katepsina L so uporabili specifično utišanje na genskem nivoju s protismiselno siRNA ali inhibicijo s sintetičnim inhibitorjem (Clik 148), ki je specifičen za katepsin L. Zvišana raven katepsina L v tumorskih celicah je povečala odpornost malignih celic na apoptozo (Pucer in sod., 2010).

2.3.1.5 Sintetični inhibitorji katepsina L

Selektivni inhibitor katepsina L, imenovan AT094, spada med aciloksimetilketonske (AOMK) ireverzibilne inhibitorje in je bil sintetiziran po protokolu (Kato in sod., 2005) z manjšimi spremembami. Pri načrtovanju ireverzibilnega inhibitorja za katepsin L so se osredotočili na mesto P1` v tej izhodni molekuli, kamor so vgradili triazolno substituento. P1` mesto je substrat-vezavno mesto, s katerim se inhibitor AT094 specifično veže v S1

mesto na katepsinu L in ga inhibira (sl. 3). Selektivnost inhibitorja AT094 za katepsin L so preverili najprej na rekombinantnih katepsinih, kjer je inhibiral katepsin L v enem koraku in pri 10-krat nižji koncentraciji, kot je bila potrebna za inaktivacijo katepsina B (Torkar in sod., 2013).



Slika 3: Inhibitor AT094 s spremenjenim mestom P1
(prirejeno po Torkar in sod., 2013)

Poleg inhibitorja AT094 poznamo tudi druge sintetične katepsinske inhibitorje, ki so pomembni za preučevanje vloge katepsina L pri različnih celičnih procesih. Izmed teh so pomembni naslednji:

1) **E-64**, ki je prvi naravni ireverzibilni epoksidni neselektivni katepsinski inhibitor, izoliran leta 1978 iz glive *Aspergillus japonicus* (Hanada in sod., 1978). Ta inhibitor je bil preučevan na več različnih celičnih linijah melanoma. Po tretiranju z E64 se je celicam zmanjšala invazivnost *in vitro* in metastaze *in vivo* (Rofstad in sod., 2006). Gre za mikrobn inhibitor, ki služi kot diagnostično sredstvo za identifikacijo večine cisteinskih proteaz, razen npr. cisteinske peptidaze legumaina in kaspaz (Buttle in sod., 1992).

2) Na podlagi strukture E64 so raziskovalci razvili številne inhibitorne spojine, specifične za katepsina B in L, npr. CA074 in Klik148 (Katunuma in sod., 2002). **Klik-148** je selektivni ireverzibilni epoksidni inhibitor katepsina L. Uporaba Klik-148 je pokazala *in vivo* učinke na zmanjšanje absorbcije kalcija iz kosti in zmanjšanje nastanka metastaz pri kostnem raku (Katunuma in sod., 2002). Vpliv Klik-148 na celicah U87-MG s povečanim,

zmanjšanim ali običajnim izražanjem katepsina L, je pokazala le minimalno, čeprav statistično značilno znižanje invazije tumorskih celic (Zajc in sod., 2006).

3) **Z-FF-FMK** (Z-Phe-Phe-fluorometilketon) je ireverzibilni selektivni inhibitor katepsina L, ki v visokih koncentracija inhibira tudi katepsin B. Izolirane celice iz primarnega človeškega ustnega karcinoma (686Tu in 101A) so tretirali s spojino, izolirano iz cigaretnega dima, ki sproži invazijo celic človeškega ustnega karcinoma, preko povečanja ekspresije in aktivacije cisteinskih proteaz. Za tem so celice tretirali z Z-FF-FMK in izmerili znižano stopnjo celične invazije v primerjavi s celicami, kjer Z-FF-FMK niso uporabili (Nagaraj in sod., 2007).

4) **RKLLW-NH₂** (peptidni inhibitor) spada med nekovalentne reverzibilne in selektivne inhibitorje za katepsin L z visoko afiniteto do aktivnega mesta. Izbran je bil z rešetanjem knjižnice pentapeptidov s proteinogenimi in neproteinogenimi aminokislinami, ki se vežejo v S1-Sn-vezavna mesta za substrat. Pri 0,9 μ M zmanjša aktivnost katepsina L za 34 % (Brinker in sod., 2000).

5) Med inhibitorje katepsina L uvrščamo tudi kovalentne reverzibilne **inhibitorje z tiosemikarbazonsko strukturo**; ti so priljubljeni v zadnjih letih. Kot najbolj selektiven inhibitor katepsina L se je izkazal tiosemikarbazonski derivat z bromom na tretjem mestu prvega arilnega obroča in fluorom na drugem mestu drugega arilnega obroča (IC₅₀ CatL = 30,5 nM). Izkazal se je tudi kot učinkovit inhibitor invazije in metastaziranja na celični liniji DU-145 (Kishore Kumar in sod., 2010).

2.4. APOPTOZA

Programirana celična smrt ali apoptoza je normalen fiziološki proces, ki igra ključno vlogo v embrionalnem razvoju in vzdrževanju odraslega tkiva. Pri odraslem osebkju je programirana celična smrt odgovorna za vzdrževanje razmerja med celično delitvijo in konstantnim številom celic v določenem tkivu. Celična smrt je tudi ključna naravna obramba organizma v primeru poškodb DNA. Za razliko od naključne celične smrti, ki običajno povzroči akutno vnetje, je apoptoza kontroliran celični proces z značilnimi morfološki spremembami. Med apoptozo se kromosomska DNA fragmentira. Nadalje se

kondenzira kromatin, razpada jedro, brsti citoplazma in celica razpade na majhne zaprte fragmente, imenovane apoptotska telesca. Ta telesca nato fagocitirajo makrofagi in okoliške celice ter jih popolnoma odstranijo iz tkiva, kar prepreči vnetni proces (Cooper in sod., 2004). Genetske nepravilnosti, kot so mutacije in delecije običajno vodijo celice v apoptozo in jih tako zaščitijo pred genetskimi poškodbami. Nepravilna regulacija apoptoze je povezana s številnimi bolezenskimi stanji, kot so avtoimunske in degenerativne bolezni ter rak. Sposobnost izoginitve apoptozi je ena izmed glavnih značilnosti rakavih celic (Hanahan in sod., 2000).

Poznamo dve poti apoptoze. Apoptozo v sesalskih celicah lahko sproži več različnih signalov. Pri **notranji poti** so sprožitveni signali lahko sevanje, prosti radikali, virusne infekcije, stavrosporin (STS) in drugi, ki vodijo do izgube mitohondrijskega transmembranskega potenciala. Posledica je sprostitvev citokroma c iz mitohondrija ali drugih proapoptotskih molekul, kot so Smac/Diablo, iz intermembranskega prostora. Proteini iz družine Bcl-2 se nahajajo na notranji mitohondrijski membrani in regulirajo njeno celovitost. Sprostitev citokroma c iz mitohondrija povzroči nastanek apoptosoma Apaf1/kaspaza, v katerem se kaspaza 9 aktivira. S proteoliznim cepljenjem nato kaspaza 9 aktivira nadaljnjo kaskado, kjer sodeluje tudi kaspaza 3 in povzroči fragmentacijo jedra in apoptozo. Smac/DIABLO se nato veže na proteine IAP (ang. *Inhibitor of apoptosis proteins*) in jih inaktivira, kar omogoči napredovanje apoptoze (Cooper in sod., 2004). Med proapoptotske faktorje spada še AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) in endonukleaza G, ki delujeta neodvisno od kaspaz in se sproščata v poznejši fazi apoptoze, tik preden celica umre. AIF se translocira v jedro, kjer pospeši fragmentacijo jedra (Susin in sod., 1999).

Pri aktivaciji **zunanje poti** apoptoze sodelujejo membranski ligand Fas, s kompleksom Fas-povezana smrtne domena s kaspazami 8 in 10, ki sprožita kaspazno kaskado, kar privede do celične smrti. Aktivacija zunanje poti se začne z aktivacijo t.i. receptorjev smrti. Fas (tudi CD95) je predstavnik superdružine receptorjev za tumor-nekrotične faktorje (TNFR), kamor spadajo še proteini TNF R1, DR3 (Apo 2), DR4 (TRAIL R1), DR5 (TRAIL R2) in DR6 (Cooper in sod., 2004; Zapata in sod., 2001). Signaliziranje s pomočjo proteinov Fas ima pomembno vlogo pri imunskem odzivu na transformacije ali virusne infekcije celice, zato se motnje v tej poti izražajo tako pri malignih tvorbah kot pri

avtoimunskih obolenjih (Landowski in sod., 2001). Apoptotski signal se sproži, ko Fas-ligand reagira z Fas-kompleksom in aktivira signalni kompleks, ki vsebuje adaptorski protein, ki je povezan s Fas in kaspazama 8 in 10, kar vodi v aktivacijo kaspaze 8, ki je glavni sprožilec aktivacije kaskade izvršilnih kaspaz 3 in 7 in posledično sprožitev apoptoze (Wajant in sod., 2002).

2.4.1 Regulacija apoptoze

2.4.1.1 Proteini Bcl-2

Pomembni regulatorji apoptoze so proteini iz družine Bcl-2. Povečano izražanje proteinov Bcl-2 je možno zaznati pri večini malignih tvorbo. Posledica povečanega izražanja Bcl-2, je odpornost celic na kemoterapevtike in obsevanje, zaradi akumulacije celic v G0 fazi, medtem ko zmanjšana stopnja izražanja Bcl-2 lahko poveča dovzetnost celic na apoptozo, po tretiranju s kemoterapevtiki (Tsujimoto in sod., 1984). Družino Bcl-2 delimo na dve funkcionalno različni skupini proteinov. V prvi so proapoptotski proteini Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim in Hrk, medtem ko druga skupina vključuje antiapoptotske proteine Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 in Mcl-1 (Reed in sod., 1997). Antiapoptotski Bcl-2 zavirajo prepustnost mitohondrijske membrane za citokrom c in apoptotski iniciacijski faktor, medtem ko jo proapoptotski proteini, kot sta Bax in Bak, povečajo (Tsujimoto in sod., 1984).

2.4.1.2 Inhibitorji apoptotskih proteinov (IAP)

IAP proteini (ang. inhibitor of apoptosis proteins) zavirajo apoptozo preko inhibicije efektorskih kaspaz in regulacije celičnega cikla. V IAP družino spadajo proteini cIAP1 in 2, ILP2 in MLIAP, NAIP ter survivin. Natančna vloga survivina, ki se izraža v astrocitomih tudi pri GBM, še ni pojasnjena, vendar naj bi preprečeval apoptozo preko inhibicije kaspaz, na katere se veže direktno ali indirektno. X-IAP je najbolj povezan s kaspazami, saj se je edini zmožen direktno vezati na kaspazo-9 (iniciacijska kaspaza) in kaspazi 3 in 7 (efektorski kaspazi) (Cooper in sod., 2004; Altieri in sod., 2003).

2.4.1.3 Kaspaze

Kaspaze so ključne v zadnji stopnji apoptotskih signalov celične smrti. Pri apoptozi sodelujejo kaspaze-3, 6, 7, 8 in 9. Kaspaza 3 zaključi notranjo in zunanjo pot apoptoze preko kaspaz 9 in 8, ko cepi inhibitor deoksiribonukleaze, s čimer povzroči apoptozo. Kaspaza 3 združi notranjo in zunanjo pot. Kaspaze povzročijo tudi cepitev proteinskih kinaz, citoskeletnih proteinov, DNA popravljalnih proteinov, inhibitornih podenot endonukleaz (CIDE družina) in na koncu porušijo varovalno (*ang. housekeeping*) funkcijo celice. Kaspaze vplivajo tudi na citoskeletne elemente, regulacijo celičnega cikla in signalne poti, kar vodi v morfološke spremembe celice, ki so značilne za apoptozo (kondenzacija in fragmentacija DNA ter krčenje membrane) (Thornberry in sod., 1998; Mancini in sod., 1998).

2.4.1.4 Tumor-zaviralni gen p53

Protein p53 deluje kot transkripcijski faktor in regulira gene, ki so pomembni pri ustavitvi celičnega cikla, DNA poškodbah in apoptozi. Osnovna funkcija p53 je varovanje genoma in ustavitev celičnega cikla, če pride do poškodbe DNA, dokler poškodba ni popravljena. Izguba ali mutacija p53 vodi v genomsko nestabilnost, nepravilno regulacijo celičnega cikla, inhibicijo apoptoze in posledično nastanek številnih rakavih tvorbo. Od transkripcije neodvisni mehanizem, ki je odgovoren za povišanje apoptoze preko p53 še vedno ni pojasnen; verjetno pride do direktne interakcije p53 s proteini iz družine Bcl-2, ki se nahajajo v citosolu mitohondrija (Haupt in sod., 2003).

2.4.2 Arzenov trioksid in apoptoza v celicah GBM

Arzenov trioksid (As_2O_3) se že dolgo časa uporablja kot kemoterapevtik pri nekaterih rakavih obolenjih, kot je npr. akutna promielocitna levkemija (Emadi in sod., 2010). Navadno so As_2O_3 povezovali z vlogo prožilca avtofagije, vendar vemo, da v rakavih celicah v kombinaciji z inhibiranim ali utišanim katepsinom L, poleg avtofagije sproži tudi apoptozo in inhibira celično proliferacijo ter angiogenezo (Ghaffari in sod., 2012). Toksični učinek As_2O_3 je bil na GBM večkrat dokazan pri različnih celičnih linijah (Ghaffari in sod., 2012; Haga in sod., 2005). Ko so celicam U87-MG v monosloju utišali

katepsin L in jih tretirali z As_2O_3 , se je celicam delež apoptoze celic U87-MG statistično značilno povečal (Ghaffari in sod., 2012; Pucer in sod., 2010; Primon in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Vse kemikalije in njihovi proizvajalci, raztopine ter topila so navedeni v pregl. 1 ali sproti v besedilu opisa metod. V primerih, ko topilo ni posebej navedeno, smo uporabili destilirano vodo.

Preglednica 1: Uporabljeni reagenti in njihovi proizvajalci

Kemikalija	Proizvajalec
Akrilamid:bisakrilamid, 40%	Bio-Rad Labs, Nemčija
AT094	Sintetizirali Torkar in sodelavci (Torkar in sod., 2013)
CA074	Peptide Institute, Japonska
Alexa Fluor 488 kozja anti-mišja IgG protitelesa	Molecular Probes, Invitrogen, Združeno kraljestvo
Alexa Fluor 488 kozja anti-zajčja IgG protitelesa	Molecular Probes, Invitrogen, Zdrženo kraljstvo
ApoONE Homogeneous Caspase 3/7 Assay	Promega
APS (amonijev persulfat)	Sigma-Aldrich, Nemčija
Aktinomicin D (Act D)	Sigma-Aldrich, ZDA
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II	BD Pharmingen, ZDA
Benziloksikarbonil-fenilalanil-arginil-7-amino-4-metilkumarin (Z-FR-AMC)	Bachem, Švica
Bradford reagent (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)	Bio-Rad Labs, Nemčija
Brij 35	Sigma-Aldrich, Nemčija
BSA (goveji serumski albumin)	Sigma-Aldrich, Nemčija
Clik 148	darilo prof. dr. N. Katunuma, Tokushima Bunri University, Japonska

se nadaljuje

Nadaljevanje **Preglednica 1: Uporabljeni reagenti in njihovi proizvajalci.**

Kemikalija	Proizvajalec
DTT (ditiotreitol)	Fermentas, Kanada ¹
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose)	Sigma-Aldrich, Nemčija
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Mediu)	Sigma-Aldrich, Nemčija
DMSO (dimetilsulfoksid)	Sigma-Aldrich, Nemčija
EDTA (Ethylenediamine tetracetic acid disodium salt dihydrate 99%)	Sigma-Aldrich, Nemčija
FBS (serum govejega zarodka)	Sigma-Aldrich, Nemčija
GAPDH začetni oligonukleotid	Applied Biosystems, ZDA
Glicin	Sigma-Aldrich, Nemčija
HEPES $\geq 99,5\%$	Sigma-Aldrich, Nemčija
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, ZDA
HRP konjugirana proti-mišja IgG protitelesa	Promega, ZDA
HRP konjugirana proti-zajčja IgG protitelesa	Promega, ZDA
L-glutamin	PAA, Avstrija
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)	Sigma-Aldrich, Nemčija
MTS (5-(karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetiltiazol)-3-(4-sulfenil) tetrazolijeva sol)	Promega, ZDA
PMS (fenazin metosulfat)	Promega, ZDA
MB (kolorimetrični reagent)	Biolog, ZDA
Nuclear/Cytosol Fractionation Kit	Biovision, ZDA
Nanašalni pufer (Loading buffer)	Fermentas, Kanada
PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline 10x)	PAA, Avstrija
PCR- TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, ZDA
Penicilin/streptomycin	PAA, Avstrija
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Nemčija
PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid)	Sigma-Aldrich, Nemčija
NaDS	Promega, ZDA
Stavrosporin (STS)	Sigma-Aldrich, ZDA
TCA (trikloroocetna kislina)	Merck, ZDA
Temed	Sigma-Aldrich, Nemčija

se nadaljuje

Nadaljevanje **Preglednica 1: Uporabljeni reagenti in njihovi proizvajalci.**

Kemikalija	Proizvajalec
Trypsin 0.25% -EDTA (1x), fenol rdeče	Gibco, Invitrogen, ZDA
Tris	Merck, Nemčija
Triton X-100	Fluka, Švica ²
TRIzol®	Gibco, Invitrogen, ZDA
Tween 20	Merck, ZDA
Tumor nekrotični faktor α (TNF α)	darilo dr. Viktorja Menarta, Kemijski inštitut, Ljubljana

3.1.2 Celične kulture

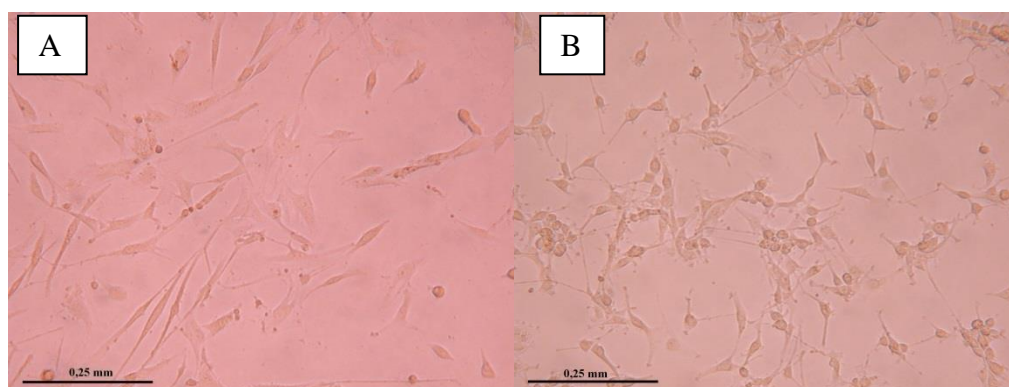
V magistrskem delu smo uporabili dve humani celični liniji, ki smo jih pridobili iz banke American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, Virginija, ZDA).

3.1.2.1 Celice humanega glioblastoma U87-MG

Celična linija humanega glioblastoma U87-MG je bila vzpostavljena leta 1968 iz kirurško odstranjenega malignega tumorja 44-letne bolnice (Ponten in sod., 1986), ki je po WHO klasificiran kot GBM 4. razreda (sl. 4, B).

3.1.2.2 Celice humanih astrocitov NHA

Celična linija normalnih humanih astrocitov (NHA) raste v mono sloju, je podolgovate oblike in se množi počasneje kot humane celice U87-MG (sl. 4, A).



Slika 4: Celični liniji NHA (A) in U87-MG (B)

Sliki prikazujeta celični liniji, uporabljeni v raziskovalni nalogi. Levo podolgovate in vretenaste celice NHA in desno celice U87-MG, posnete s svetlobnim mikroskopom (40x povečava) (foto: Anja Bubik).

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje celičnih linij

Celice U87-MG in NHA smo gojili v monosloju v mediju DMEM z visoko vsebnostjo glukoze, ki je vseboval 10% FBS, 2,5 mM L-glutamin in z 1% antibiotikom penicilin/streptomycin (pregl. 2). Celice smo gojili v inkubatorju v razmerah 37 °C, 5 % CO₂ in 95% relativni vlažnosti. Celicam smo menjali medij na 2-3 dni in jih presajali pri 70 – 80 % gostoti. Pri presajanju celic U87-MG in NHA, smo celično kulturo najprej sprali z 1x fosfatnim pufrom (PBS). Sprane celice smo odlepili s podlage z 0,25% Trypsin/2 mM EDTA. Trypsin smo nato inaktivirali s svežim gojiščem in ga odstranili s centrifugiranjem ter dobljeno celično usedlino ponovno resuspendirali v svežem gojišču. Število preživelih celic smo določili z Bürker - Türkovo števno komoro, tako da smo celice predhodno obarvali s Tripan modrim v razmerju 1:5. Tripan modro je barvilo, ki prosto prehaja skozi membrane celic in modro obarva poškodovane celice, medtem ko ga nepoškodovane celice aktivno izločijo. Preštete celice smo na novo gojitveno ploščo nasadili z gostoto 10000 - 15000 celic na cm². Celični liniji U87-MG in NHA smo hranili za krajši čas v 10% dimetilsulfoksidu (DMSO) pri -80 °C, v primeru daljše hrambe pa v tekočem dušiku.

Preglednica 2: Sestava rastnih medijev za humani celični liniji

Celična linija U87		Celična linija NHA	
Sestavina	Koncentracija	Sestavina	Koncentracija
DMEM – visoka vsebnost glukoze:		DMEM – visoka vsebnost glukoze:	
FBS	10 % (V/V)	FBS	10 % (V/V)
Penicilin/streptomycin	1 % (V/V)	Penicilin/streptomycin	1% (V/V)
L – glutamin	2 mM	L - glutamin	2 mM
		Hepes	20 mM

3.2.2 Citotoksičnost inhibitorja AT094

3.2.2.1 Test MTT

Z reagentom MTT (13-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) smo merili vpliv inhibitorja AT094 na celično metabolno aktivnost. Reagent MTT je rumena vodotopna snov, ki jo mitohondrijska sukcinat-dehidrogenaza (SDH; E.C. 1.3.99.1.) metabolno aktivnih celic reducira v vijoličaste kristale formazana, ki so netopni v vodi. SDH je encim, ki se nahaja na notranji mitohondrijski membrani in sodeluje v Krepsovem ciklu, kjer katalizira oksidacijo sukcinata do fumarata, pri čemer FAD (ang. Flavin adenin dinucleotide) odcepi dva vodikova atoma, ki se preneseta na SDH. Pri tem se dva elektrona preneseta na koencim Q (ang. UbiQuinone), ki je del elektronskega prenašalnega sistema v mitohondriju, imenovanega tudi Kompleks II. Ker je SDH pritrjen na notranjo mitohondrijsko membrano, se ob poškodbi mitohondrija najlažje izloči iz mitohondrija v citosol (Huang in sod., 2013). Nastali kristali formazana so topni v organskih topilih, kot sta npr. DMSO ali izopropanol. Količina nastalega formazana je premosorazmerna s številom živih celic.

S testom MTT smo določali citotoksičnost selektivnega inhibitorja katepsina L AT094. Celice NHA smo nasadili na mikrotitrne plošče s 96-jamicami (3500 celic/jamico) in jih inkubirali čez noč pri 37 °C, da so se pritrdile na podlago. Naslednji dan smo jih za 24 h izpostavili inhibitorju. Po 21 h od izpostavitve celic smo dodali reagent MTT v končni koncentraciji 0,5 mg/ml ter inkubirali še dodatne 3 h. Celicam smo odstranili gojišče z

inhibitorjem in nastale kristale formazana raztopili v DMSO ter na spektrofotometru izmerili absorbanco pri valovni dolžini 570 nm (z referenčno valovno dolžino 690 nm). Relativno preživelost celic smo določili tako, da smo primerjali absorbanco med tretiranimi celicami in kontrolo (netretirane celice). Vsak poskus smo izvedli v petih paralelkah in ga ponovili 3-krat.

3.2.2.2 Test MTS

Citotoksičnost inhibitorja AT094 na celicah U87-MG smo merili tudi s kolorimetričnim preizkusom MTS ((4,5-dimetiltiazol)-3-(4-sulfenil) tetrazolijeva sol). Podobno kot pri MTT, ta test temelji na prevzemu tetrazolijeve soli iz celičnega medija in nato analizira zreduciran produkt, ki se je tekom poskusa akumuliral znotraj celic. Znotrajcelična redukcija je posledica delovanja mitohondrijske dehidrogenaze (Liu in sod., 1997).

Celice U87-MG smo nasadili na mikrotitrne plošče s 96-jamicami (7000 celic/jamico) in jih pustili čez noč v inkubatorju pri 37°C, da so se pritrdile na podlago. Naslednji dan smo celice 24 h inkubirali z 0,5 in 5 µM AT094. Kontrolni vzorci so vsebovali le osnovni medij brez inhibitorja. Po 21 h od začetka inkubacije celic smo celicam dodali mešanico MTS/PMS (v razmerju 1:20) in celice inkubirali nadaljne 3 h v inkubatorju. Absorbanco smo izmerili pri valovni dolžini 490 nm. Relativno preživelost celic smo določili s primerjanjem absorbance tretiranih celic in kontrole. Vsak poskus smo izvedli v petih paralelkah in ga ponovili 3-krat.

3.2.3 Ekstrakcija proteinov

3.2.3.1 Ekstrakcija celokupnih celičnih proteinov

Celice U87-MG smo neposredno postrgali v homogenizacijski pufer (pregl. 3) z raztopino za homogenizacijo celic (pregl. 4). Membrane celic smo lizirali z 2-min sonificiranjem in odstranili s 30-min centrifugiranjem pri 12000 g in 4 °C. Supernatant s proteini smo razdelili in shranili pri -20°C.

Preglednica 3: Sestava homogenizacijskega pufra

Sestavina	Koncentracija
Tris	50 mM pH 6,9
Brij 35	0.05 %
DTE	0.5 mM
EDTA	5 mM

Preglednica 4: Sestava raztopine za homogenizacijo celic

Sestavina	Koncentracija
homogenizacijski pufer z	
Inhibitor PMSF	0.5 mM
Inhibitor Pepstatin A	10 μ M

3.2.3.2 Ekstrakcija jedrnih in citosolnih proteinov

Celice U87-MG smo nasadili na T25-ploščo (2×10^6 celic/ploščo), jih sprali in postrgali v 1x-ledeno hladnem PBS. Za izolacijo celic smo uporabili komplet Nuclear/Cytosol Fractionation Kit, ki vsebuje popoln sistem za ločevanje jedrne in citoplazemske frakcije proteinov. Postrgane celice v 1x PBS-u smo centrifugirali ($600 \times g$, $4^{\circ}C$, 5 min) in nato odstranili supernatant ter jih resuspendirali v citosolnem ekstrakcijskem pufru A (ang. cytosol extraction buffer A, CEB-A), ki smo mu predhodno dodali 1M DTT in mešanico proteaznih inhibitorjev. Celične usedline smo razbili s 15-s krožnim mešanjem in jih inkubirali 10 min na ledu. Nato smo jim dodali citosolni ekstrakcijski pufer B (ang. Cytosol extraction buffer B, CEB-B), krožno mešali in ponovno inkubirali 1 min na ledu. Po koncu inkubacije smo celične usedline 5 s krožno mešali in ponovno centrifugirali ($16,000 \times g$, $4^{\circ}C$, 5 min). Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, ki je predstavljal citosolno frakcijo proteinov. Supernatant smo do uporabe hranili pri $-20^{\circ}C$. Ostale usedline z jedri smo resuspendirali v jedrnem ekstrakcijskem pufru (ang nuclear extraction buffer, NEB), ki smo mu predhodno dodali 1M DTT in mešanico proteaznih inhibitorjev. Vsebino smo krožno mešali 15 s in jo vrnili za 10 min na led (zadnji korak smo ponovili 4-krat). Po končani inkubaciji na ledu smo vsebino ponovno centrifugirali ($16000 \times g$, $4^{\circ}C$,

10 min) in ji odstranili supernatant, ki je predstavljal jedrno frakcijo proteinov, ki smo jo do uporabe hranili pri -20°C .

3.2.3.3 Merjenje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo izmerili s testom Bradford, tako da smo ustrezno redčenemu vzorcu dodali reagent Bio-Rad protein assay, ki se ob vezavi proteina obarva modro. Intenziteta modre barve je sorazmerna s koncentracijo proteinov. Izmerili smo absorbanco vzorcev pri valovni dolžini 595 nm na spektrofotometru in koncentracije proteinov v vzorcih izračunali iz umeritvene krivulje. Umeritveno krivuljo smo dobili iz redčin govejega serumskega albumina (BSA) znanih koncentracij, in sicer med 50 in 900 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.4 Merjenje aktivnosti katepsinov

Aktivnost katepsinov B in L smo merili po metodi, kot so jo opisali Zajc in sod. (2006) z manjšimi spremembami. Pri tem smo uporabili optimalne pufre za katepsin B (aktivacijski pufer in pufer za merjenje aktivnosti: 0,4 M fosfatni pufer pH 6,0; sveže dodan 2,5 mM DTE) in katepsin L (aktivacijski pufer: 0,34 M acetatni pufer, pH 4,2; sveže dodan 2,0 mM DTE in pufer za merjenje aktivnosti: 0,34 M acetatni pufer pH 5,5; sveže dodan 2,5 mM DTE) in selektivni sintetični inhibitor ter substrat. Izolirane celične proteine smo primerno redčili. Spremljali smo potek hidrolize sintetičnega dipeptida z vezanim AMC (7-amino-4-metilkumarinom). Za vsak vzorec smo izvedli po dve meritvi, eno z inhibitorjem in eno brez specifičnega inhibitorja (za katepsin B: CA074; za katepsin L: Clk 148). Po 10 μL vzorca smo nanесли na mikrotitrne plošče v dveh paralelkah ter jih 30 min inkubirali pri 37°C v aktivacijskem pufru, da smo omogočili polno aktivacijo tega encima. Nato smo eni od paralel dodali destilirano vodo, drugi pa specifičen inhibitor – 60 μM CA074 za katepsin B ter 2 μM Clk 148 za katepsin L. Obema smo nato dodali pufer za merjenje aktivnosti in sprožili reakcijo z dodatkom specifičnega substrata, 100 μM ZRRAMC za katepsin B ter ZFRAMC za katepsin L. Reakcijo smo pustili teči 90 min pri 37°C , nato pa smo jo ustavili z dodatkom 1 mM jodocetne kisline. Na spektrofotometru smo izmerili količino sproščenega fluorescentnega 7-AMC ter izračunali aktivnost katepsinov B in L po enačbah (1), (2) in (3).

Specifične aktivnosti katepsinov smo izmerili v encimskih enotah (E.U.) na količino vzorca, pri čemer pomeni ena E.U. količino encima, ki iz določenega substrata sprosti 1nM 7-AMC/min.

$$F_{Cat B} = F_{vzorca\ brez\ inhibitorja} - F_{vzorca\ s\ CA074} \quad \dots(1)$$

$$F_{Cat L} = F_{vzorca\ brez\ inhibitorja} - F_{vzorca\ s\ Clk\ 148} \quad \dots(2)$$

$$As = \frac{(r \times \Delta F \times Vr)}{(t \times c \times k \times Vv)} \quad \dots(3)$$

- r: redčitev osnovnega vzorca
- A_s : specifična aktivnost katepsina
- ΔF : izračun količine sproščenega 7-AMC
- V_r : prostornina reakcijske mešanice
- t: čas poteka reakcije
- c: koncentracija proteinov v vzorcu
- k: naklon obratne umeritvene krivulje
- V_v : prostornina dodanega redčenega vzorca

3.2.5 Prenos western

Prenos western je metoda za detekcijo proteinov v bioloških vzorcih z zelo visoko občutljivostjo in temelji na ločevanju proteinov po velikosti na poliakrilamidnem gelu z dodatkom natrijevega dodecilsulfata (NaDS-PAGE) in prenosu na poliviniliden difluoridno (PVDF) membrano. Na izbrani protein nato vežemo primarna protitelesa, usmerjena proti specifičnemu proteinu, v nadaljevanju pa na primarno protitelo vežemo sekundarna protitelesa, s katerimi željeni protein označimo. Ker primarno protitelo specifično prepozna protein glede na značilnost membrane, nespecifična vezavna mesta na membrani zapolnimo z BSA (goveji serumski albumin) ali suhim mlekom brez maščob. Sekundarna protitelesa prepoznajo primarno protitelo in so običajno konjugirana z encimom, ki katalizira reakcijo in razgradi dani substrat (Dennis-Sykes in sod., 1985).

Na 12% gel za NaDS-PAGE (pregl. 5) smo nanašali približno 20 μ g celokupnih proteinov iz celičnega ekstrakta U87-MG, ki smo jim dodali 5 μ l nanašalnega pufru z DTT in dopolnili do končnega volumna 20 μ L z destilirano vodo. Tako pripravljene vzorce smo

inkubirali 5 min pri 100 °C in jih do nanosa na gel hranili na ledu. Na poliakrilamidni gel smo nanесли 5 µl proteinskega standarda z znanimi molekulskimi masami in 15 µl denaturiranega vzorca. Elektroforeza je potekala 1,5 h v pufu za elektroforezo (Tris-glicin, 1 % NaDS, pH 8,3) pri napetosti 15 mA. Ko so proteinski vzorci in standard prepotovali koncentracijski gel smo električni tok pojačali na 30 mA za nadaljne 2-3 h. Ločene proteine in proteinski standard smo prenesli iz gela na PVDF membrano s pomočjo sistema BioRad za moker prenos v pufu za prenos (Tris-glicin, 10% metanol, pH 8,3) pri napetosti 18 V in temperaturi 4 °C čez noč. Naslednji dan smo membrano prenesli v raztopino z mlečnimi proteini (5% blocking reagent; 0,1 Tween 20 in 1xPBS) na stresalnik za 90 min na sobni T. Z membrane smo odstranili mlečno raztopino in jo prenesli v raztopino s primarnimi protitelesi. Primarna protitelesa proti katepsinoma B in L smo redčili v mlečni raztopini v razmerju 1:200 ter 1:5000 za protitelesa proti GAPDH. Po celonočni inkubaciji primarnih protiteles na stresalniku pri 4 °C, smo membrano sprali 5-krat po 5 min v raztopini za spiranje (1x PBS, 0.1 % Tween20) in membrano ponovno inkubirali v mlečni raztopini s sekundarnimi protitelesi. Uporabili smo 2000-krat redčena sekundarna protimišja protitelesa za detekcijo katepsina L in katepsina B ter 2000-krat redčena sekundarna proti-zajčja protitelesa za detekcijo GAPDH. GAPDH nam služi kot kontrola nanašanja in primerjava izraženega katepsina L in katepsina B. S sekundarnimi protitelesi smo membrano 2 h inkubirali na stresalniku pri sobni temperaturi. Spiranje sekundarnih protiteles z raztopino za spiranje je potekalo 4-krat po 10 min. Po končanem spiranju, smo prestavili membrano v destilirano vodo. Za zaznavanje označenih proteinov smo uporabili komplet reagentov za kemiluminiscenco (ECL) in avtoradiografski film. Reakcija na membrani je potekala 5 min v temi, nato smo filme izpostavljali reakciji od 30 s do 3 min. Čas smo določili glede na željeno intenziteto označenih proteinov. Film smo razvili v temnici v razvijalcu, nato smo ga fiksirali v fiksirni raztopini, sprali z vodo in posušili na zraku. Zaznavanje označenih proteinov smo izvedli po navodilih proizvajalca kompleta za kemiluminiscenco.

Preglednica 5: Sestava gela NaDS PAGE za ločevanje proteinov

Sestavina	Koncentracija
Separacijski gel	
Tris (Merck, Nemčija)	1.5M pH 8.8
Akrilamid:bisakrilamid (BioRad, Nemčija)	(29:1) 40 %
NaDS (Pomega, ZDA)	10 %
Temed (Sigma-Aldrich, Nemčija)	1 %
APS (amonijev persulfat) (Sigma-Aldrich, Nemčija)	10 %
Koncentracijski gel	
Tris	0.5 M pH 6.8
Akrilmid:bisakrilamid	(29:1) 40%
NaDS	10 %
Temed	1 %
APS	10%

3.2.6 Analiza izražanja genov na ravni mRNA

3.2.6.1 Izolacija mRNA iz celic s TRIzol® reagentom

mRNA smo izolirali iz celičnih vzorcev s pomočjo TRIzol® reagenta. To je monofazna raztopina fenola in gvanidin izotiocianata, ki med homogenizacijo razbije celice in razgradi celične komponente, pri tem pa mRNA ostane nepoškodovna. Z dodatkom kloroforma dosežemo, da se ločita organska in vodna faza. V organski fazi so proteini in ostale celične komponente, mRNA pa se nahaja v vodni fazi, iz katere jo precipitiramo z dodatkom izopropanola. mRNA nazadnje očistimo nečistoč s spiranjem v 75% etanolu.

Za izvedbo poskusa smo celice nasadili na plošče z 12-jamicami (250,000 celic/jamico) in jih pustili čez noč, da so se pritrdile na podlago. Nato smo celicam dodali medij z 1 μ M AT094 in jih inkubirali 5 h v inkubatorju pri običajnih pogojih. Po 5 h smo celice za 3 h izpostavili mediju z 2 μ M STS ali za 12 h 5 ng/ml TNF α in 1 μ M AktD. Po izteku inkubacije smo plavajoče celice v mediju združili s pritrjenimi celicami na jamici in jih resuspendirali v ustrezni količini TRIzol® reagenta. Izolacijo mRNA smo nadaljevali po navodilih proizvajalca. Vzorcem smo dodali še glikogen in kloroform, s čimer smo ločili organsko in vodno fazo. S precipitacijo mRNA v izopropanolu in spiranjem v 75% etanolu,

smo očistili mRNA nečistoč. mRNA smo po čiščenju posušili na zraku v laminariju in raztopili v DEPC - vodi (brez RNaz in DNaz). Vzorce smo do uporabe hranili na -80°C .

3.2.6.2 Merjenje koncentracije mRNA

Koncentracijo mRNA smo merili na spektrofotometru NanoDrop NT-1000. Pri tej metodi porabimo zelo majhno količino vzorca (1 μL). Spektrofotometer NanoDrop NT-1000 izračuna vsebnost mRNA iz absorbance pri valovni dolžini 260 nm, iz podanega razmerja absorbanc pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm pa lahko ocenimo čistost mRNA v vzorcu, pri čemer mora biti omenjeno razmerje med 1,8 in 2,0.

3.2.6.3 Reverzna transkripcija – prepis mRNA v cDNA

Za prepis mRNA v cDNA smo uporabili komplet High Capacity cDNA Archive in izvedli poskus po navodilih proizvajalca. Komplet vsebuje naključne začetne oligonukleotide, ki se najprej povežejo z mRNA (10 min, 25°C), v nadaljevanju reakcije pa ob matrični mRNA z encimom reverzna transkriptaza (2 h, 37°C), poteče reverzna transkripcija. Za prepis smo uporabili aparat Gene AMP PCR System 9700. Prepisali smo 1 μg posameznega vzorca, ki smo ga kasneje uporabili za analizo s kvantitativnim PCR (qPCR). Vzorce cDNA smo hranili pri -20°C .

3.2.6.4 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qRT-PCR)

Za analizo izražanja genov uporabljamo kvantitativno reakcijo s polimerazo v realnem času (qRT-PCR), pri kateri je ključnega pomena uporaba nerazgrajene in očiščene RNA (Schroeder in sod., 1995).

Metoda je zelo natančna in občutljiva ter nam omogoča določanje relativne količine tarčne mRNA v vzorcu. S tem načinom merimo izražanje posameznega gena na transkripcijski ravni. Pri qRT-PCR poteka hkrati s pomnoževanjem tudi merjenje količine nastalega produkta PCR. Po vsakem ciklu pomnoževanja aparat zazna fluorescentni signal, intenziteta fluorescence pa je sorazmerna količini nastalega produkta v vsakem ciklu. Uporabili smo sondo TaqMan Real Time PCR, ki je na svojem 5' koncu označena z barvilom 6-karboksi-fluorescinom (FAM), ki fluorescira, na 3' koncu pa z 6-karboksi-tetrametil-rodamin (TAMRA), ki je zaviralec signala. Slednji polovi vso izsevano svetlobo

iz fluorescentnega barvila dokler sta obe molekuli vezani na sondo. Reakcija poteka tako, da encim polimeraza Taq pri prepisovanju cDNA spozna in cepi sporočilno molekulo TaqMan (FAM za tarčni gen in VIC za notranjo kontrolo), ki se odcepi in detektor zazna signal, pri določeni valovni dolžini (Schroeder in sod., 2005).

Moč fluorescentnega signala je odvisna od začetne količine tarčne molekule in števila ciklov reakcije PCR. Zaporedna številka cikla podvajanja, pri katerem moč preseže določeni prag detekcije (Ct), je sorazmerna s količino tarčne cDNA v vzorcu in tako merilo za relativno količino mRNA posameznega gena, oziroma za stopnjo njegovega izražanja. Količino mRNA za določen gen vedno izražamo relativno glede na notranjo kontrolo (v našem primeru GAPDH). Notranja kontrola je označena s fluorescenčnim barvilom, ki seva pri drugi valovni dolžini kot sporočilna molekula na sondi za tarčni gen.

Vse reakcije qPCR smo izvajali v aparatu ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System. Za izvedbo poskusa smo poleg vzorčne cDNA v reakcijah uporabili še univerzalno mešanico za PCR - TaqMan Universal PCR Master Mix, začetna oligonukleotida in sondo za preiskovani gen. Reakcijska mešanica vsebuje polimerazo Taq in kofaktorje ter 0,2x 5'- FAM, 3'-TAMRA označeno sondo TaqMan za preiskovani gen (Bax, Bcl-2 in p53). Poskus smo izvajali v ploščicah s 384-jamicami. V vsako jamico smo dali ustrezno količino reakcijske mešanice in 1 μ g cDNA našega vzorca ter do končnega volumna dopolnili z vodo DEPC. Za normalizacijo in endogeno kontrolo izražanja genov smo v vzorcih preverili izražanje GAPDH.

Temperaturna shema reakcije za qRT-PCR:

2 min, 50 °C (encim UNG-AmpERase razgradi kontaminacijske produkte reakcije PCR)

10 min, 95 °C (aktivacija DNA polimeraze)

15 s, 95 °C (denaturacija DNA enojnih verig)

1 min, 60 °C (pripenjanje začetnih oligonukleotidov in sinteza nove verige ob matrični verigi)

Zadnji dve stopnji imenujemo cikel podvajanja in smo ga pri poskusu ponovili 45-krat.

3.2.6.5 Analiza rezultatov qRT-PCR

Za vsak vzorec in notranjo kontrolo smo najprej izračunali povprečen prag detekcije (4). Relativno izražanje gena smo določili tako, da smo od povprečnega praga detekcije za posamezen gen odšteli povprečen prag detekcije kontrolnega gena (5) in končno vrednost izražanja gena določili po pravilu navedenem v enačbi (6).

$$\Delta Ct = Ct_{\text{tarčni gen}} - Ct_{\text{GPD}} \quad \dots(4)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{vzorec})} - \Delta Ct_{(\text{kontrolni vzorec})} \quad \dots(5)$$

$$F = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \dots(6)$$

Kontrolnemu vzorcu pripada vrednost okoli 1, rezultat za ostale vzorce pa je relativno več ali manj glede na kontrolo. Vsak vzorec smo nanegli v dveh paralelkah in poskus ponovili trikrat na neodvisnih vzorcih. Za določanje razlik med celicami tretiranimi z inhibitorjem AT094 in kontrolnimi celicami smo izvedli Studentov t-test ($p < 0,05$).

3.3 APOPTOZA

3.3.1 Merjenje aktivnosti kaspaz 3 in 7

Aktivnost kaspaz 3 in 7 smo merili s kompletom ApoONE Homogeneous Caspase 3/7 Assay, ki vsebuje fluorogen substrat Z-DEVD-R110 in pufer za lizo celic. Poskus smo izvedli tako, da smo celice U87-MG z inhibiranim katepsinom L in kontrole (celice U87-MG) nasadili na plošči s 384-jamicami (2000 celic/jamico). Celice smo inkubirali v inkubatorju čez noč, da so se pritrdile na podlago. Naslednji dan smo celice najprej za 5 h izpostavili mediju z 1 μM inhibitorjem AT094, nato pa še za 12 h mediju s 5 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ in 1 μM ActD ali za 3 h mediju z 1 μM STS. Po izteku inkubacije smo v jamice prve plošče dodali reagent Apo-ONE po navodilih proizvajalca, v jamice druge plošče pa reagent MTT. 2 h po dodatku reagenta MTT smo določili viabilnost celic, kot je opisano v točki 3.2.2.1. Fluorescenco na prvi plošči smo izmerili 2 h po dodatku reagenta Apo-ONE pri valovni dolžini 485 nm (ekscitacija) in 535 nm (emisija). Fluorescenco smo

normalizirali glede na preživetje celic, določeno z vzporednim testom MTT. Rezultate smo določili kot aktivnost kaspaz 3 in 7 na živo celico. Poskus smo izvedli v petih paralelnih in treh neodvisnih bioloških poskusih.

3.3.2 Prepustnost mitohondrijske membrane

Za apoptozo je značilno povečanje prepustnosti mitohondrijske membrane. Spremembo mitohondrijskega membranskega potenciala v živih celicah smo določali s pomočjo fluorescenčnega kationskega barvila 5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolkarbocianin jodid (JC-1). JC-1 je kationsko barvilo, ki v celicah selektivno prehaja v mitohondrije in se tam kopiči v visokih koncentracijah. Pri takih koncentracijah barvilo v mitohondrijih tvori rdeče fluorescentne J-agregate, pri nizkem membranskem potencialu oziroma nizkih koncentracijah pa je barvilo v obliki zelenega fluorescenčnega monomera. Pri sprožitvi apoptoze postane mitohondrijska membrana prepustnejša, zato se JC-1 sprošča iz mitohondrijev v citosol, pri čemer se rdeča fluorescenca zmanjšuje, povečuje pa se zelena.

Na mikrotitrne plošče s 96-jamicami smo nasadili 25000 celic/jamico. Celice smo čez noč inkubirali, da so se pritrdele na podlago. Naslednji dan smo celice 5 h inkubirali v mediju z 1 μM AT094. Po izteku inkubacije z inhibitorjem, smo celice inkubirali 2 h v mediju z 2 μM STS ali 12 h v mediju z 5 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ in 1 μM ActD. Po končani prvi inkubaciji smo celice nato inkubirali še 15 min v prisotnosti sonde JC-1 resuspendirane v 1x PBS do končne koncentracije 10 μM . Na spektrofotometru smo pomerili zeleno fluorescenco pri valovni dolžini vzbujanja 485 nm in sevanja 535 nm ter rdečo fluorescenco pri valovni dolžini vzbujanja 540 nm in sevanja 570 nm. Vse poskuse smo naredili v petih paralelnih in treh neodvisnih poskusih.

3.3.3 Pretočna citometrija

Izguba asimetrije plazmaleme je ena od zgodnjih morfoloških sprememb apoptotskih celic. Pri tem se membranski fosfolipid fosfatidilserin prenese iz notranjega sloja v zunanji sloj plazemske membrane in se tu izpostavi zunajceličnemu okolju. Aneksin V je protein, ki se z visoko afiniteto veže na fosfatidilserin, in sicer na tistih celicah, kjer je fosfatidilserin

izpostavljen na površini celice. To nam omogoča, da z fluorescentno označenim aneksinom V (v našem primeru Aneksin V-FITC) določimo delež zgodnje apoptotskih celic. Propidijev jodid (PI) je fluorescentno barvilo, ki označi DNA in ne more prehajati nepoškodovanih membran, zato vstopa le v mrtve celice ter celice v pozni apoptozi, ki imajo močno poškodovano plazemsko membrano, ki je posledično prepustnejša za prehajanje tega barvila. PI tako omogoča ločevanje med zgodnje in pozno apoptotskimi celicami ter med nekrotičnimi celicami. Pozno apoptotske celice so dvojno označene (s PI in Aneksinom V-FITC), nekrotične pa le s PI.

Delež apoptotskih celic U87-MG smo določali z reagentoma Annexin V-FITC in PI. Na plošče s 6-jamicami, smo nasadili po 400,000 celic/jamico in inkubirali čez noč v inkubatorju v običajnih razmerah, da so se celice pritrdele na podlago. Nato smo celice 5 h tretirali z inhibitorjem AT094 v končni koncentraciji 1 μM . Apoptozo smo nato sprožili s 3 h inkubacijo celic z 2 μM STS ali 12 h inkubacijo s 5 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ in 1 μM ActD. Po izteku inkubacijskega časa smo pritrjene in plavajoče (mrtve) celice sprali z ledeno hladnim 1x PBS ter centrifugirali. Celične usedline smo resuspendirali v 1x vezavnem pufu (pripravili smo ga iz 10x vezavnega pufra: 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl_2 ; 0,1 M HEPES, pH 7,4) in označili z Aneksinom V-FITC ter PI po navodilih proizvajalca. Označeno celično suspenzijo smo inkubirali 15 min v temi pri sobni temperaturi. Po izteku inkubacije, smo v vsak vzorec dodali 1x-vezavni pufer in analizirali vzorce s pomočjo pretočnega citometra. Absorpcijski spekter barvila FITC ima vrh pri valovni dolžini 495 nm, emitira pa pri valovni dolžini 520 nm. Barvilo PI ima absorpcijski spekter pri vrhovih 287 in 488 nm, emitirana svetloba ima valovno dolžino 630 nm. Fluorescentni signal PI merimo na FL2 kanalu in je sorazmeren vsebnosti DNA. Merili smo število celic, ki so oddajale fluorescenco na kanalih FL1-H (AneksinV-FITC) in FL2-H (PI). Nastavitve napetosti FL1-H in FL2-H ter kompenzacijo FL1-FL2 ter FL2-FL2 smo optimizirali z uporabo pozitivne in negativne kontrole, kot je navedeno spodaj:

- Negativna kontrola (NK) je vsebovala netretirane in neoznačene celice
- Pozitivna kontrola 1 (PK1) je vsebovala celice tretirane le s STS ali $\text{TNF}\alpha$ + 1 μM AktD in označene samo s Aneksinom V-FITC
- Pozitivna kontrola 2 (PK2) je vsebovala celice tretirane s STS ali $\text{TNF}\alpha$ + 1 μM AktD in označene le s PI

- Pozitivna kontrola 3 (PK3) je vsebovala celice tretirane s STS ali TNF α + 1 μ M AktD in označene z Aneksinom V-FITC ter PI

PK1 je omogočila optimizacijo kompenzacije FL2-FL1, PK2 pa optimizacijo kompenzacije FL1-FL2. Z negativno kontrolo smo določili osnovni nivo apoptotskih in mrtvih celic (Vermees in sod., 1995). Rezultate smo analizirali s programom CellQuest Pro, verzija 6.0 (BD Biosciences, ZDA).

3.3.4 Vpliv inhibitorja AT094 in arzenovega trioksida

3.3.4.1 Proliferacija celic U87-MG

S testom MTT smo določili vpliv As₂O₃ v kombinaciji z inhibitorjem AT094 na celično proliferacijo oz. metabolno aktivnost celic U87-MG. Celice U87-MG smo nasadili na plošče s 96-jamicami (4000 celic/jamico) in jih inkubirali čez noč pri 37 °C, da so se pritrdile na podlago. Naslednji dan smo celice za 24 ali 72 h izpostavili mediju z inhibitorjem AT094 (1 μ M in 3 μ M) ter As₂O₃ (2 μ M in 20 μ M). Inkubiranim celicam smo v medij z As₂O₃ in AT094 po 3 h pred iztekom inkubacije dodali MTT reagent v končni koncentraciji 0,5 mg/ml. Nastale kristale formazana smo nato raztopili v DMSO ter s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri valovni dolžini 570 nm (z referenčno valovno dolžino 690 nm). Celično viabilnost smo določili tako, da smo primerjali absorbanco med tretiranimi celicami in kontrolo (netretiranimi celicami).

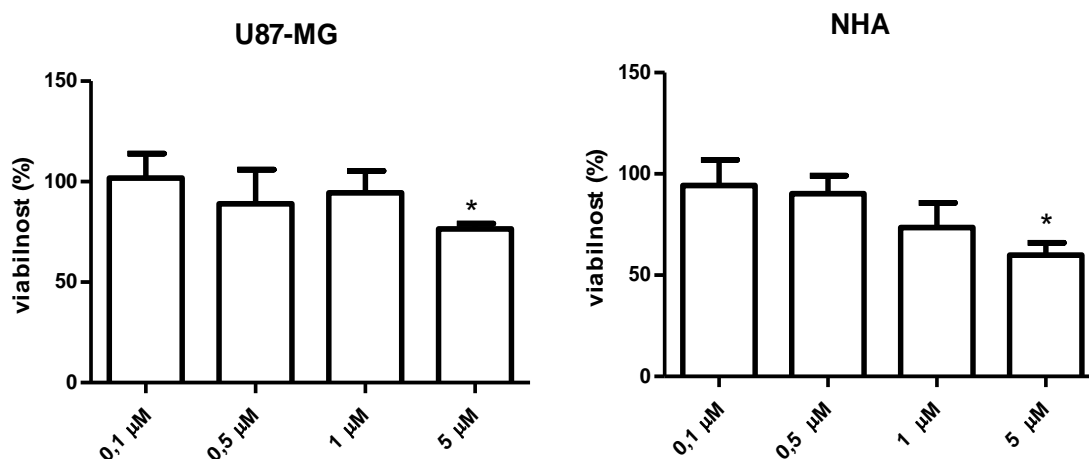
3.3.4.2 Delež apoptotskih celic U87-MG

Delež apoptotskih celic U87-MG smo določali z reagentoma Annexin V-FITC in PI. Uporabili smo ploščice s 6-jamicami in nanje nasadili po 400,000 celic/jamico ter jih inkubirali čez noč pri 37 °C, da so se pritrdile na podlago. Celice smo nato 5 h inkubirali v mediju z inhibitorjem AT094 (1 μ M). Po končani prvi inkubaciji smo celice za 24 h izpostavili še mediju, ki je vseboval As₂O₃ (2 μ M ali 20 μ M). Poskus smo izvedli na enak način, kot je opisano v točki 3.3.3.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV INHIBITORJA AT094 NA PREŽIVELOST CELIC U87-MG IN NHA

Za določitev vpliva inhibitorja katepsina L, AT094, na apoptozo celic U87-MG, smo s testom MTT oz. MTS preverili v kolikšni koncentraciji inhibitor vpliva na preživelost celic GBM (U87-MG) in normalnih človeških astrocitov (NHA) (sl. 5).



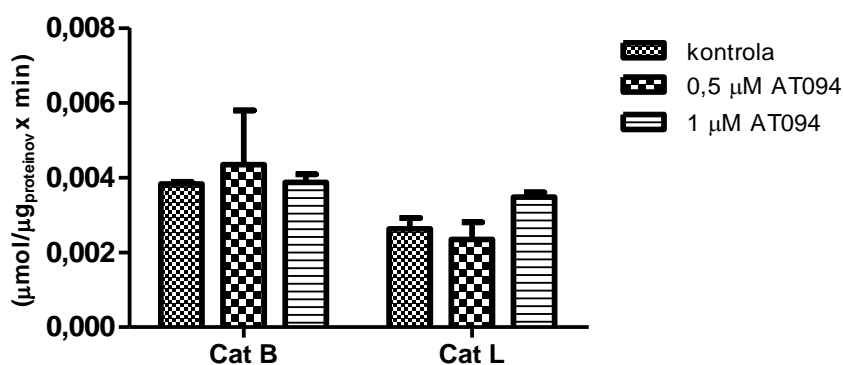
Slika 5: Citotoksičnost inhibitorja AT094 za celice U87-MG (levo) in NHA (desno).

Vpliv inhibitorja AT094 na viabilnost celičnih linij smo določili s kolorimetričnima testoma MTT/MTS po 24 h tretiranju celic. Inhibitor je značilno zmanjšal viabilnost obeh celičnih linij šele pri koncentraciji 5 µM, pri nižjih koncentracijah ni deloval toksično. Podani so rezultati treh neodvisnih bioloških poskusov ± SD. (* $p < 0,05$)

Inhibitor v koncentracijah manjših od 1 µM ni imel statistično značilno toksičnega vpliva na nobeno od obeh humanih celičnih linij, saj preživelost celic ni bila značilno manjša od 100 %. Statistično značilno manjšo preživelost celic NHA in U87-MG smo izmerili le pri koncentraciji 5 µM. Pri celicah U87-MG je preživelost celic pri tej koncentraciji 76 %, pri celicah NHA pa le še 56 %. To pomeni, da smo pri NHA izmerili 18% manj živih celic kot pri U87-MG, kar nakazuje, da inhibitor AT094 bolj toksično deluje na normalne astrocite kot na tumorske celice. Glede na te rezultate smo za nadaljne poskuse izbrali inhibitor v koncentraciji 1µM, saj tako ni vplival na viabilnost samih celic.

4.2 VPLIV INHIBITORJA AT094 NA SPECIFIČNO AKTIVNOST KATEPSINOV B IN L

Z merjenjem aktivnosti katepsinov B in L v celičnem ekstraktu smo preverjali, če je inhibitor AT094 selektiven za katepsin L v primerjavi s katepsinom B. Aktivnost katepsinov smo merili v ekstraktu celic, ki smo jih predhodno inkubirali z inhibitorjem AT094 (0,5 μ M in 1 μ M, 5 h). Pri tem smo uporabili specifična fluorescenčna substrata za katepsina B in L. Zaradi predhodno dokazane večje selektivnosti inhibitorja za katepsin L s fluorescenčno sondo AT071Cy3 (Torkar in sod., 2013), smo pričakovali statistično značilno znižanje aktivnosti katepsina L v primerjavi s katepsinom B v celicah, ki smo jih predhodno tretirali z inhibitorjem AT094 (sl. 6).



Slika 6: Vpliv inhibitorja AT094 na specifične aktivnosti katepsinov B in L

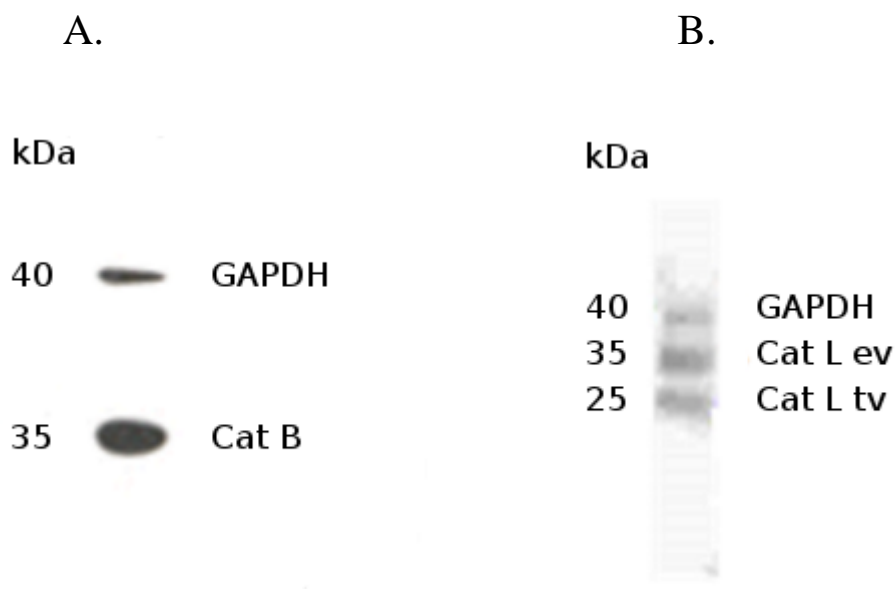
Celice smo 5h inhibirali z 0,5 μ M in 1 μ M AT094. Aktivnost katepsina L v primerjavi s katepsinom B se v celicah U87-MG z inhibiranim katepsinom L ni statistično značilno zmanjšala. Podano je povprečje treh neodvisnih bioloških poskusov \pm SD.

Pri celicah tretiranih z AT094 je prišlo do manjšega zmanjšanja aktivnosti katepsina L v primerjavi s kontrolo in katepsinom B, vendar razlike niso bile statistično značilne.

4.3 LOKALIZACIJA KATEPSINOV B IN L V CELICI IN DETEKCIJA AKTIVNEGA KATEPSINA L V JEDRU

S prenosom western smo določili izražanje katepsinov B in L v celičnem ekstraktu ter prisotnost aktivne oblike katepsina L v jedrni in citosolni frakciji celic U87-MG. Kot

kontrolno enakega nanosa vseh proteinskih vzorcev smo preverili tudi izražanje GAPDH (sl. 7).

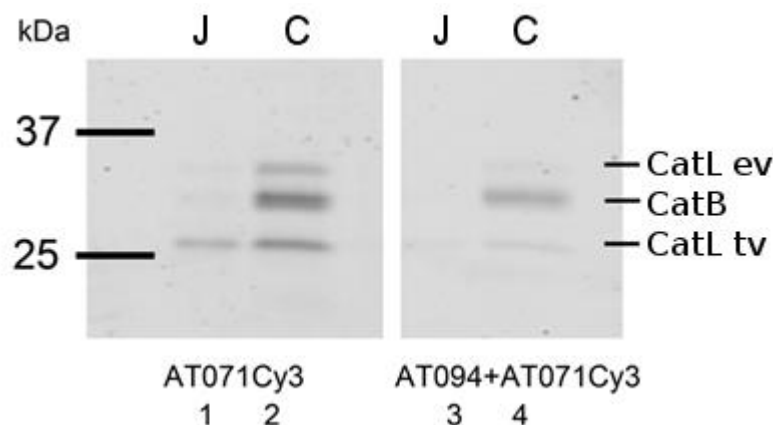


Slika 7: Določitev prisotnosti izražanja različnih oblik A) katepsina B in B) katepsina L v celicah U87-MG

A) S prenosom western smo potrdili izražanje oblike katepsina B v velikosti 35 kDa (± 2000 kDa)
B) V celicah U87-MG je katepsin L prisoten v enoverižni obliki (ev) pri 25 kDa (± 2000 kDa), zaznali pa smo tudi njegovo težko verigo (tv) pri 35 kDa (± 2000 kDa)

S prenosom western smo določili molekulsko maso za enoverižni katepsin L pri 35 kDa (± 2000 kDa) in njegovo težko verigo pri 25 kDa (± 2000 kDa). Izražanje katepsina B pa smo določili pri molekulski masi 35 kDa (± 2000 kDa).

Za učinkovito inhibicijo katepsina L mora inhibitor AT094 le-tega inhibirati v jedru celic U87-MG. Zato so najprej preverili ali je v jedru celic U87-MG prisotna aktivna oblika katepsina L, nato pa analizirali ali inhibitor lahko prehaja v jedro celic, pri čemer so uporabili frakcije citosolnih (C) in jedrnih (J) proteinov. Pri tem se je sonda AT071Cy3 vezala v nezasedena vezavna mesta na katepsinih B in L, kamor se inhibitor ni vezal (sl. 8) (Torkar in sod. 2013).



Slika 8: Izražanje aktivne oblike katepsina B in L označene s fluorescenčno sondo AT071Cy3

Celice U87-MG so bile izpostavljene 0,5 μ M inhibitorju AT094 za 22 h in nato inkubirane z neselektivno sondo AT071Cy3 za 20 h. Prva kolona prikazuje s sondo označen aktiven katepsin L v jedru (J), katerega lisa izgine (stolpec 1), če celice predhodno izpostavimo inhibitorju AT094 (stolpec 3). Selektivnost AT094 za katepsin L smo izračunali iz razlik intenzitete lis v citosolni frakciji (C) z (stolpec 4) in brez (stolpec 2) predhodne inkubacije z inhibitorjem.

Proteine so z uporabo kompleta Nuclear/Cytosol Fractionation Kit (metoda opisana v točki 3.2.3.2) ločili na jedrno (J) in citosolno (C) frakcijo. Delež vezave inhibitorja v aktivno mesto katepsinov B in L so določili iz intenzitete lis na gelu NaDS PAGE (sl. 8) s programom Image J.

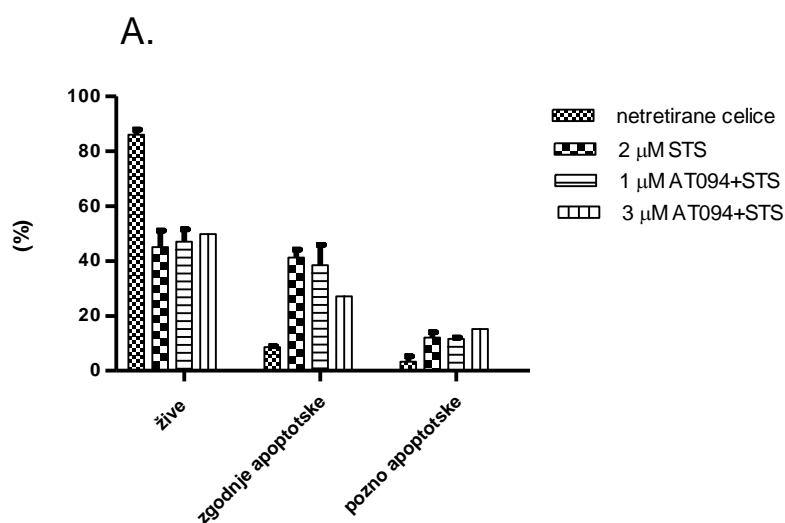
Prvi in drugi stolpec prikazujeta neinhibiran ter s fluorescenčno sondo AT071Cy3 označen aktiven katepsin L v jedru (stolpec 1) in citosolu (stolpec 2) celic U87-MG. Tako v citosolni kot jedrni frakciji, smo zaznali aktivno obliko katepsina L, kar pomeni, da je aktiven katepsin L prisoten tudi v jedru. V jedrni frakciji smo opazili šibkejše izražanje težke verige (tv) katepsina L (stolpec 1), v citosolni pa močnejše izražanje težke in lahke verige (lv) katepsina L ter močno izražen katepsin B (stolpec 2). Ko smo celice predhodno izpostavili inhibitorju AT094, v jedrni frakciji katepsina L nismo več zaznali (stolpec 3), medtem ko je bilo izražanje aktivnega katepsina L v citosolu zelo šibko. Izražanje katepsina B se je sicer nekoliko zmanjšalo (stolpec 4), vendar rezultati kažejo na večjo selektivnost inhibitorja AT094 za katepsin L kot za katepsin B. V primeru skoraj popolne inhibicije katepsina L (87 – 100 %) smo opazili močno povečano izražanje aktivnega katepsina B v citosolu. S fluorescenčno sondo AT071Cy3 smo torej dokazali, da je katepsin L prisoten v jedru v aktivni obliki. Dokazali smo tudi, da fluorescenčna sonda z AOMK ogrođjem in inhibitor AT094 prehajata v jedro celice (Torkar in sod., 2013).

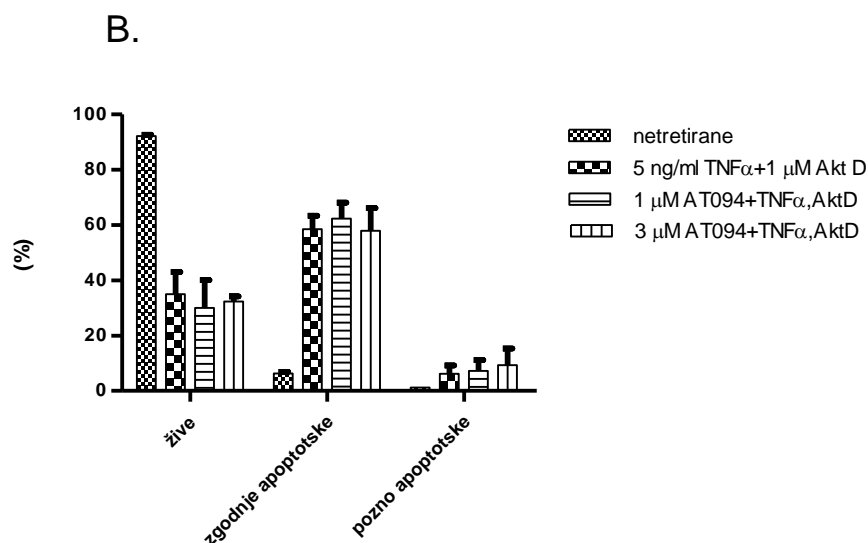
4.4 VPLIV INHIBITORJA AT094 NA APOPTOZO

Glavni cilj raziskave je bil ugotoviti, kako inhibicija katepsina L z inhibitorjem AT094 vpliva na apoptozo celic U87-MG in s tem povezan mehanizem delovanja katepsina L v apoptozi. Vpliv utišanja katepsina L s protismiselno siRNA na povečan delež apoptoze celic U87-MG so že pokazali (Zajc in sod. 2006; Pucer in sod., 2010; Kenig in sod., 2011; Primon in sod., 2013). S testi apoptoze smo želeli preveriti ali tudi inhibiran katepsin L vpliva na povečanje apoptoze v celicah U87-MG. Slednje smo preverili na različne načine: določanje deleža apoptotskih in nekrotskih celic s pomočjo Aneksina V-FITC in PI, določanje prepustnosti mitohondrijske membrane in merjenje aktivnosti kaspaz 3 in 7 ter analiza izražanja apoptotskih proteinov na ravni mRNA. Notranjo pot apoptoze smo sprožili z STS, zunanjo pa s TNF α /AktD.

4.4.1 Določanje deleža apoptotskih celic

Po tretiranju celic z inhibitorjem AT094 smo na pretočnem citometru preverili delež apoptotskih celic. Celice smo označili z Aneksinom V-FITC in PI. Celice označene z Aneksinom V-FITC so zgodnje apoptotske. Pozno apoptotske celice so označene z Aneksinom V-FITC in PI, nekrotične le s PI, žive celice pa so neoznačene. Celice smo po tretiranju z AT094 različnih koncentracij izpostavili STS, ki sproži notranjo pot apoptoze ter TNF α in AktD, ki sprožita zunanjo apoptotsko pot.





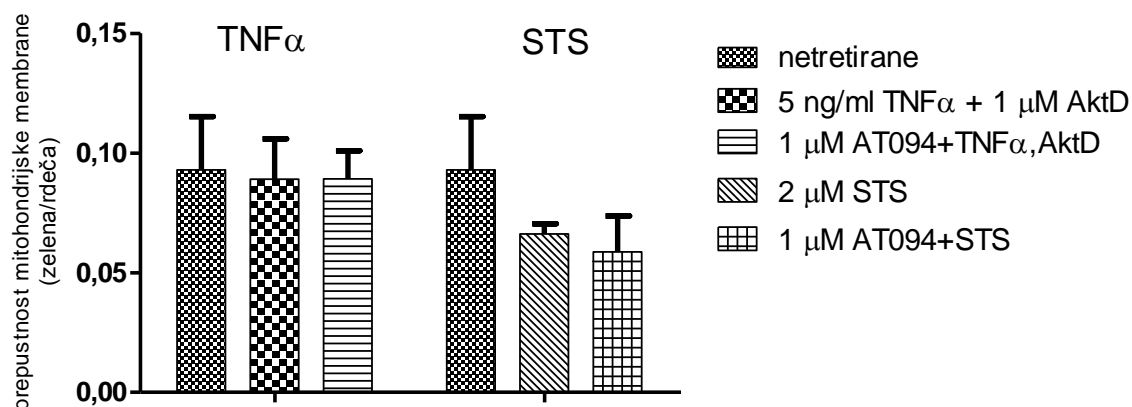
Slika 9: Delež apoptotskih celic U87-MG po inhibiciji katepsina L z inhibitorjem AT094

Slika prikazuje celice U87-MG, v katerih smo inhibirali katepsin L z 1 in 3 μ M AT094. (A) Pri sprožitvi notranje poti apoptoze z 2 μ M STS ni bilo značilnih razlik med celicami, kjer katepsin L ni bil inhibiran (kontrola) ter celicami, ki so bile izpostavljene inhibitorju (B) Pri sprožitvi zunanje poti apoptoze s 5 ng/mL TNF α in 1 μ M AktD prav tako ni bilo značilnih razlik med celicami, kjer katepsin L ni bil inhibiran (kontrola) ter celicami, ki so bile izpostavljene inhibitorju. Prikazana so povprečja treh neodvisnih poskusov \pm SD.

Nobena izmed uporabljenih koncentracij inhibitorja AT094 ni sprožila povečanja umrljivosti (razlike niso statistično značilne) celic U87-MG, niti ne po notranji (sl. 9, A) niti ne po zunanji apoptoski poti (sl. 9, B), v primerjavi s celicami, kjer katepsina L nismo inhibirali, ampak smo jih tretirali le s STS ali TNF α /AktD (kontrola).

4.4.2 Prepustnost mitohondrijske membrane

Celice, ki se nahajajo v apoptozi imajo zmanjšan mitohondrijski membranski potencial, poveča pa se tudi prepustnost mitohondrijske membrane. Pri tem se povečuje zelena fluorescenca, medtem ko se rdeča fluorescenca zmanjšuje.



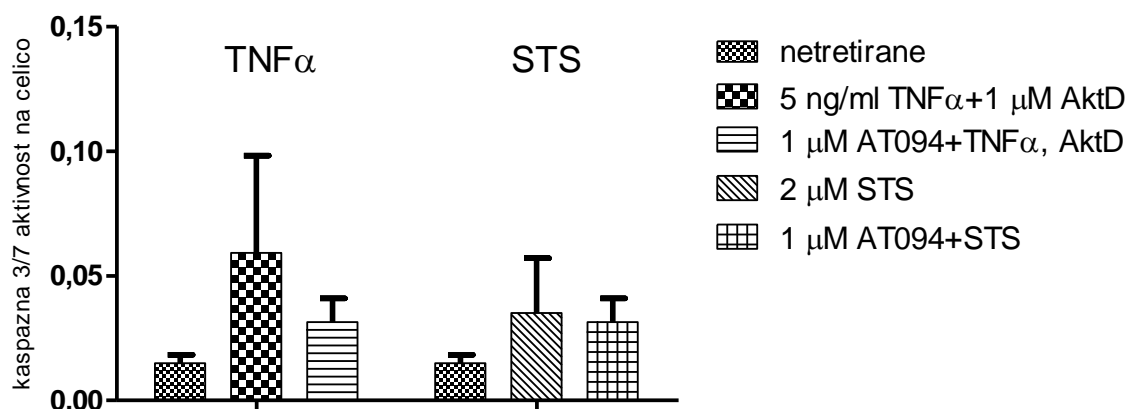
Slika 10: Vpliv inhibitorja katepsina L AT094 na prepustnost mitohondrijske membrane celic U87-MG

Prikazano je razmerje med rdečo in zeleno fluorescenco, po dodatku sonde JC-1 celicam U87-MG, ki smo jih predhodno tretirali s STS (2 μ M STS, 3 h) ali TNF α +AktD (5 ng/ml TNF α in 1 μ M AktD, 12h) in AT094 (1 μ M AT094, 5 h). Med celicami, kjer smo inhibirali katepsin L in celicami, ki niso bile izpostavljene inhibiciji katepsina L (kontrola) nismo zaznali značilnih razlik. Podana so povprečja treh neodvisnih bioloških poskusov \pm SD.

Med celicami U87-MG, ki smo jim inhibirali katepsin L z AT094 in kontrolnimi celicami (celice tretirane s STS ali TNF α /AktD) nismo opazili statistično značilnih razlik (sl. 10) Po tretiranju celic z STS se je prepustnost mitohondrijske membrane zmanjšala, kar je presenetljivo, saj STS preko notranje poti apoptoze poveča prepustnost mitohondrijske membrane.

4.4.3 Aktivnost kaspaz 3 in 7

Aktivnosti kaspaz 3 in 7 v celicah U87-MG smo izmerili s pomočjo fluorogenega substrata Z-DEVD-R110 in z vzporednim testom MTT, s katerim smo določili tudi proliferacijo celic U87-MG. Rezultate smo izrazili kot aktivnost kaspaz 3 in 7 na živo celico, določeno z vzporednim testom MTT.



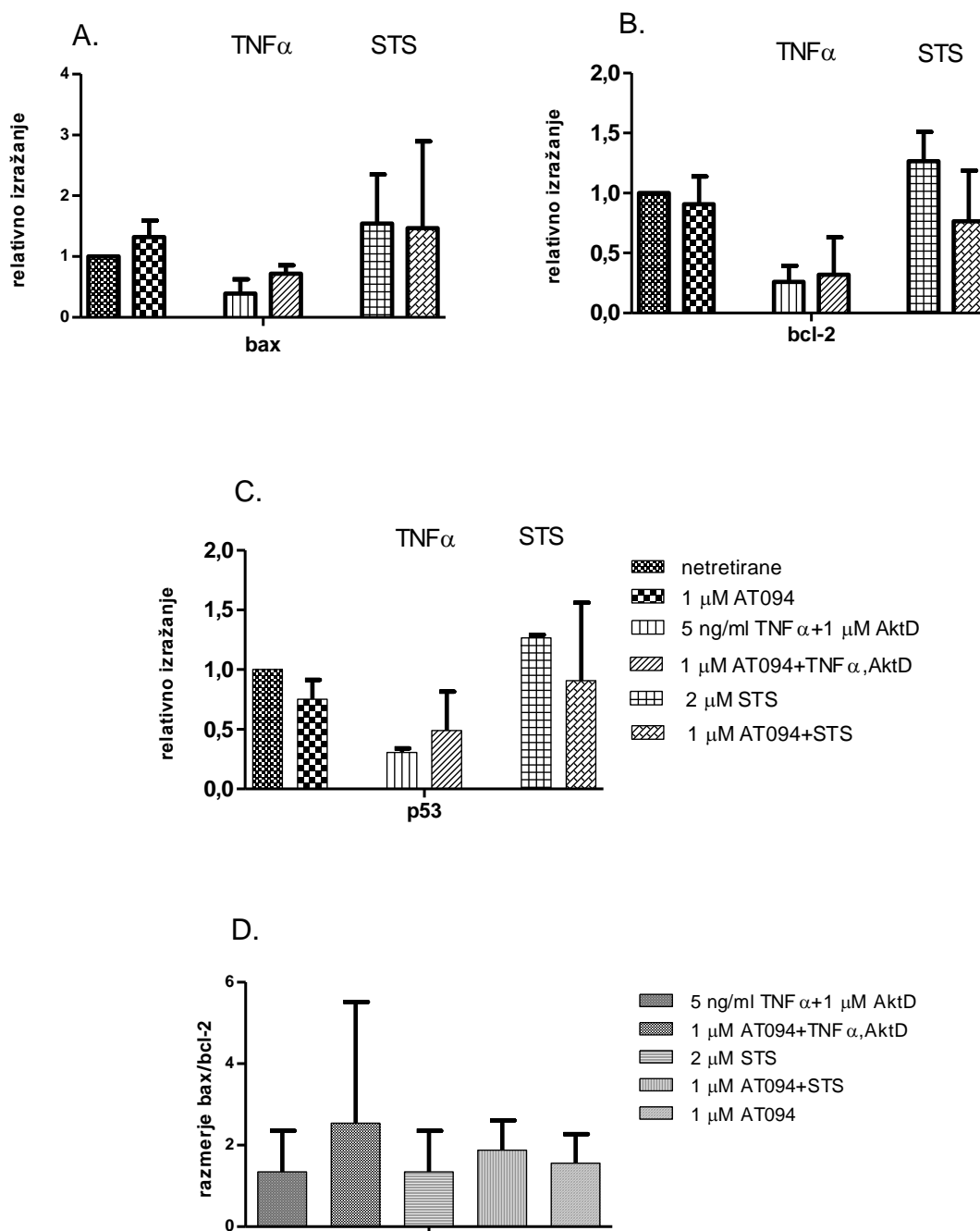
Slika 11: Vpliv inhibitorja katepsina L, ATO94, na aktivnost kaspaz 3 in 7 v celicah U87-MG

Po tretiranju celic U87-MG z 1 μ M AT094 smo sprožili apoptozo z dodatkom STS (2 μ M, 2h) ali TNF α /Akt D (5 ng/ml, 1 μ M, 12 h). Aktivnost obeh kaspaz se ni statistično značilno povečala ne glede na pot sprožene apoptoze v celicah U87-MG, kjer smo inhibirali katepsin L v primerjavi s celicami, kjer katepsina L nismo inhibirali (kontrola). Podani so rezultati povprečij treh biološko neodvisnih poskusov \pm SD.

Dodatna inhibicija katepsina L ni vplivala na povečanje aktivnosti obeh kaspaz v vzorcih, kjer smo sprožili apoptozo po notranji ali zunanji poti v primerjavi s celicami, kjer katepsina L nismo inhibirali, smo pa sprožili apoptozo celic s STS ali TNF α /AktD (kontrola) (sl. 11).

4.4.4 Izražanje proapoptotskih in antiapoptotskih genov

Zgoraj opisani testi apoptoze niso kazali vpliva inhibitorja katepsina L na apoptozo celic U87-MG. S qRT-PCR pa smo poskušali še podrobneje proučiti delovanje inhibitorja AT094, in sicer na ravni izražanja apoptotskih genov.



Slika 12: Izražanje apoptotskih genov Bax (A.), Bcl-2 (B.) in p53 (C.) ter razmerje genov Bax/Bcl-2 (D.) v celicah U87-MG

Preučevali smo vpliv inhibitorja AT094, tako da smo po 5 h delovanja inhibitorja AT094 na celicah U87-MG sprožili apoptozo po notranji poti z 2 μ M STS po 3 h ali zunanji poti s 5 ng/mL TNF α in 1 μ M AktD po 12 h. Ne glede na pot sprožene apoptoze in načina tretiranja celic U87-MG nismo zaznali statistično različnega izražanja genov Bax, Bcl-2 ali p53. Podana so povprečja rezultatov treh biološko neodvisnih poskusov \pm SD.

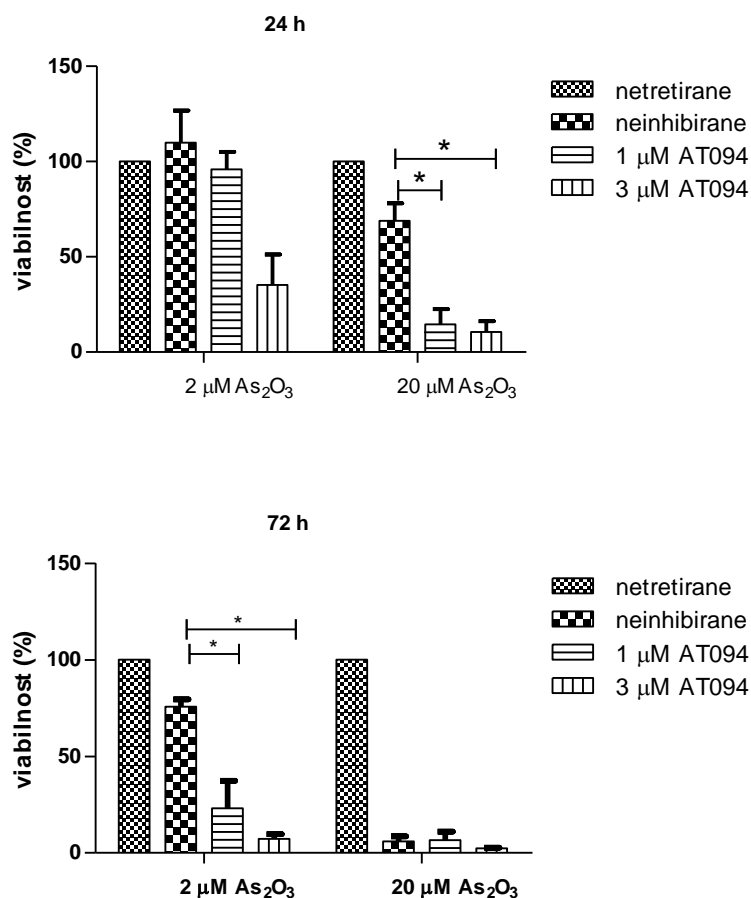
Statistično različnega povišanja v izražanju genov za Bax, Bcl-2 in p53 nismo izmerili ne glede na pot sprožene apoptoze. Izmerili smo sicer nekoliko povečano izražanje proapoptotskega gena Bax v vzorcih, kjer smo celicam U87-MG inhibirali katepsin L in sprožili apoptozo celic po notranji poti oziroma ko smo celice tretirali samo z inhibitorjem AT094 (sl. 11, A). Presenetljivo pa je pri celicah, kjer smo sprožili apoptozo po notranji poti, višje tudi izražanje antiapoptotskega gena Bcl-2 (sl. 11, B) Nekoliko se je povečalo tudi izražanje gena p53 v vzorcih, kjer smo sprožili apoptozo celic po notranji poti (sl. 11, C).

4.5 SINERGISTIČNI VPLIV INHIBITORJA AT094 IN ARZENOVEGA TRIOKSIDA

Vpliv As_2O_3 na apoptozo in proliferacijo celic GBM preko nastanka reaktivnih kisikovih spojin je bil večkrat potrjen (Ghaffari in sod., 2012; Haga in sod., 2005; Pucer in sod., 2010;). Predhodne raziskave so pokazale toksičnost As_2O_3 na celicah U87-MG, v katerih so prehodno ali trajno utišali izražanje gena za katepsin L (Pucer in sod., 2010; Primon in sod., 2013). Vpliv potencialnega sinergističnega delovanja inhibitorja AT094 z As_2O_3 na proliferacijo in apoptozo celic GBM smo preverili s testom MTT in označbo celic z Aneksinom V-FITC in PI.

4.5.1 Proliferacija celic U87-MG

Z reagentom MTT smo izmerili vpliv sinergističnega delovanja As_2O_3 in inhibitorja AT094 na proliferacijo celic U87-MG. Po 24 h smo izmerili za 54 % (1 μM AT094) in 58 % (3 μM AT094) manj preživelih celic tretiranih z inhibitorjem AT094 in 20 μM As_2O_3 v primerjavi s celicami, ki niso bile tretirane z inhibitorjem AT094, ampak samo z 20 μM As_2O_3 . Pri celicah tretiranih z inhibitorjem AT094 in 2 μM As_2O_3 statistično značilnih razlik po 24 h nismo izmerili. Po 72 h pa je pri kombinaciji 2 μM As_2O_3 in AT094 (1 μM in 3 μM) njuno sinergistično delovanje vplivalo na zmanjšano viabilnost celic za okoli 60 %. Tako velike razlike nismo zaznali pri 20 μM As_2O_3 , saj je As_2O_3 pri višji koncentraciji že sam zmanjšal viabilnost celic za 80 % (sl. 13)



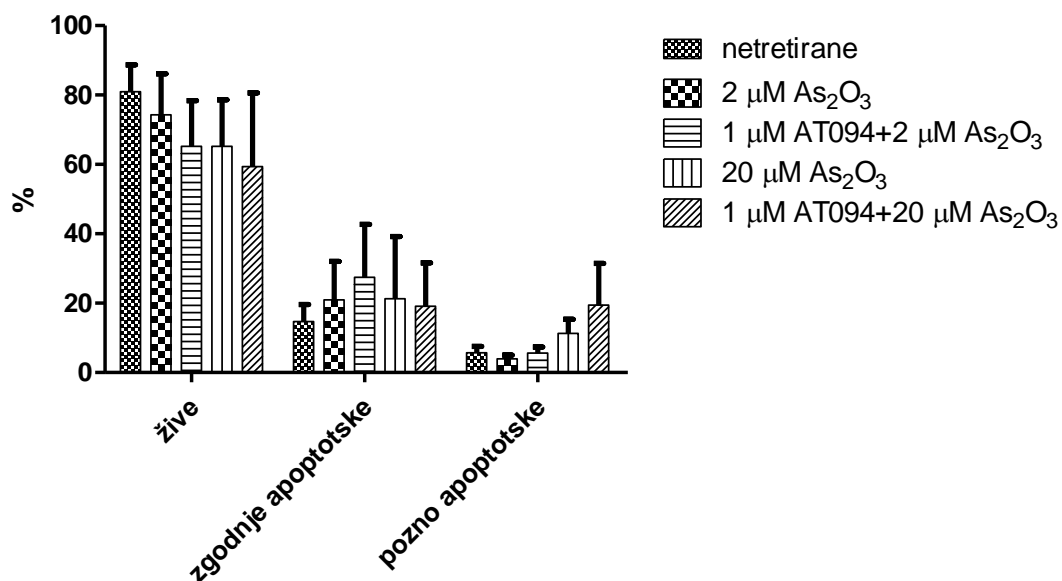
Slika 13: Vpliv inhibitorja katepsina L, AT094, in As₂O₃ na viabilnost celic U87-MG

Celice smo izpostavili mediju z 1 μM in 3 μM inhibitorjem AT094 skupaj z 2 in 20 μM As₂O₃ po 24 in 72 h.

Po 24 h tretiranja celic smo izmerili statistično manjšo preživelost celic U87-MG, tretiranih z 1 in 3 μM AT094 in 20 μM As₂O₃, v primerjavi s celicami, kjer katepsina L nismo inhibirali. Po 72 h smo izmerili statistično manjše preživetje celic U87-MG tretiranih z 1 in 3 μM AT094 in 2 μM As₂O₃, v primerjavi s celicami, kjer katepsina L nismo inhibirali. Podana so povprečja rezultatov treh biološko neodvisnih poskusov ± SD. (*p<0,05)

4.5.2 Apoptoza celic U87-MG

Vpliv sinergističnega delovanja inhibitorja AT094 in As₂O₃ na apoptozo celic U87-MG smo preverili z označenjem z Aneksinom V-FITC in PI. Merili smo vpliv inhibitorja katepsina L, AT094 (1 μM, 5 h) v kombinaciji z As₂O₃ (2 in 20 μM, 24 h) na delež apoptotskih celic (sl. 14).



Slika 14: Vpliv inhibitorja AT094 in As_2O_3 na delež apoptotskih celic U87-MG

Merili smo vpliv inhibitorja katepsina L, AT094 (1 μM , 5 h), v kombinaciji z As_2O_3 (2 in 20 μM , 24 h) na delež apoptotskih celic. Statističnih razlik v celicah, kjer smo inhibirali katepsin L, v primerjavi s celicami, ki smo jih tretirali le z As_2O_3 , nismo izmerili pri nobenem načinu tretiranja celic. Podana so povprečja rezultatov treh biološko neodvisnih poskusov \pm SD.

Izmerili smo nekoliko povečan delež pozno apoptotskih celic, tretiranih z inhibitorjem AT094 in višjo koncentracijo As_2O_3 v primerjavi s celicami, tretiranih le z As_2O_3 , vendar razlike niso bile statistično značilne.

5 RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

5.1 PRISOTNOST IN LOKALIZACIJA KATEPSINOV B IN L V CELICAH U87-MG

Glioblastom (GBM) je najbolj maligni tumor centralnega živčnega sistema pri človeku. Njegove glavne značilnosti so hitra rast, močna invazivnost in ožiljenost (Louis in sod., 2007). Za tumorje GBM je značilno povečano izražanje katepsinov B in L v primerjavi z benignimi tumorji (Strojnik in sod., 2005). Izražanje katepsina B povezujejo z invazijo tumorskih celic, apoptozo in angiogenezo ter velja za prognostični faktor preživetja (Gocheva in sod., 2007; Levičar in sod., 2003; Malla in sod., 2005). Vloga katepsina L pri raku ni povsem jasna, najverjetneje pa je vpleten v celično invazijo tumorskih celic, apoptozo in odpornost tumorskih celic na zdravljenje. Detekcija in inhibicija aktivnega katepsina L bi lahko pomagala pojasniti vlogo katepsina L pri razvoju rakavih obolenj in tudi drugih bolezni, ki so povezane s prekomernim izražanjem katepsina L (Colin in sod., 2009). Kljub temu, da je bil pomen katepsina L pri invaziji rakavih celic pokazan pri nekaterih vrstah raka, pri GBM njegovo povišano izražanje ni povezano s povečano invazivnostjo tumorskih celic, kar so ugotovili preko zmanjšane izražanja katepsina L z siRNA (Zajc in sod., 2005; Kenig in sod., 2011; Yang in sod., 2007). Tudi vloga katepsina L v angiogenezi še ni povsem jasna. Opazili so zmanjšanje angiogeneze ob inhibiciji katepsina L z enoverižnim variabilnim fragmentom protitelesa proti katepsinu L, medtem ko pri miškah z izbitim katepsinom L ni bilo razlik pri angiogenezi, tudi inhibicija katepsina L s selektivnimi inhibitorji cisteinskih proteinaz ni vplivala na razrast kapilar (Rousselet in sod., 2004; Gocheva in sod., 2006; Caserman in sod., 2004). Antiapoptotska vloga katepsina L v apoptozi je bila večkrat potrjena, in sicer preko zmanjšane izražanja katepsina L z siRNA, pri čemer se je povečala občutljivost celic GBM na apoptozo (Kenig in sod., 2011; Zajc in sod., 2006). Avtorji so pokazali večji delež apoptotskih celic GBM z utišanim katepsinom L, ki so bile tretirane z As_2O_3 , zato so predvidevali, da povečano izražanje katepsina L varuje celice GBM pred apoptozo (Primon in sod., 2013; Pucer in sod., 2010). V tem delu smo želeli dokazati, da tudi nov sintetični inhibitor katepsina L AT094 lahko zniža prag umrljivosti celic, če ga uporabimo v kombinaciji z znanimi apoptotskima dejavnikoma, kot sta STS in $TNF\alpha/AktD$, ki sprožita notranjo oziroma zunanjo pot apoptoze. Selektivnost inhibitorja v nepoškodovanih celicah so določili s

fluorescenčno sondo AT071Cy3, ki z inhibitorjem tekmuje za vezavo v aktivno mesto na proteinu (Torkar in sod., 2013) in merjenjem specifične aktivnosti katepsinov v celičnem ekstraktu, ki pa ni nujno pravi odraz aktivnosti katepsinov v celici, in sicer zaradi možnosti poškodb celičnih organelov med pripravo proteinskega ekstrakta. Zato menimo, da je za merjenje aktivnosti katepsinov uporaba sond boljši način.

S pomočjo uporabe neselektivne fluorescenčne sonde AT071Cy3 smo potrdili aktivno obliko katepsina L v citosolni in jedrni frakciji in hkrati tudi prehod inhibitorja AT094 v jedro celic U87-MG, kjer je učinkovito inhibiral aktivni katepsin L (Torkar in sod., 2013). Obstoj katepsina L v jedru je sicer že bil dokazan, vendar je bila tokrat prvič dokazana aktivna oblika katepsina L v jedru (Goulet in sod., 2004; Kenig in sod., 2011; Torkar in sod., 2013). Ti rezultati so bili za nas pomembni, ker je treba za preučevanje vloge katepsina L v celicah GBM U87-MG katepsin L učinkovito inhibirati, to pomeni, da mora inhibitor prehajati v jedro celic.

Pokazali so, da je v citosolni frakciji celic U87-MG prisotnega več aktivnega katepsina B kot L. V jedrni frakciji so zaznali šibkejši signal za katepsin L v primerjavi s citosolno frakcijo, medtem, ko signala za katepsin B v jedrni frakciji niso zaznali (Kenig in sod., 2011; Torkar in sod., 2013). Mi smo prisotnost aktivnih oblik katepsinov B in L v celicah U87-MG preverili še s prenosom western. Potrdili smo izražanje aktivne oblike katepsina B v celicah U87-MG pri molekularni masi okoli 35 kDa, kar je že bilo dokazano v celicah GBM v predhodnih študijah (Konduri in sod.; 2001). Enoveržni katepsin L v celicah U87-MG smo zaznali pri molekularni masi okoli 25 kDa in težko verigo katepsina L pri molekularni masi okoli 35 kDa, kar se ujema z rezultati predhodnih raziskav (Goulet in sod., 2004; Kenig in sod., 2011). Ugotovili so tudi, da katepsin L deluje antiapoptotsko, tako da posredno zavira izražanje kaspaz 3 in 7 na ravni mRNA. Po utišanju katepsina L z siRNA so zaznali povišano izražanje proapoptotskih faktorjev, kot so kaspaze 3 in 7, CRADD in proteinov iz družine receptorjev TNF (TNFRSF11B in TNFRSF21, CD27 in CD70), posledično so v teh celicah zaznali tudi večji delež apoptoze. Nadaljne raziskave so pokazale, da se v celicah z utišanim katepsinom L najbolj poveča izražanje efektorskih kaspaz 3 in 7. Ko so v celicah U87-MG z utišanim katepsinom L sprožili apoptozo po notranji ali zunanji poti, je bilo v celici na voljo več aktiviranih kaspaz, zato so izmerili višjo raven apoptoze in tudi močno povečano izražanje kaspaze 7, v primerjavi s celicami,

kjer izražanje katepsina L ni bilo utišano. Rezultati so pokazali, da je kaspaza 7 ena izmed najpomembnejših tarč katepsina L in da katepsin L lahko regulira izražanje kaspaze 7 preko p53 in prohibitina, ki sta se po utišanju katepsina L nakopičila v jedrni frakciji (Kenig in sod., 2011).

5.2 CITOTOKSIČNOST INHIBITORJA AT094 NA HUMANIH CELIČNIH LINIJAH U87-MG IN NHA

Na celicah U87-MG smo uporabili aciloksimetilketonski (AOMK) ireverzibilni inhibitor AT094. Ta se je izkazal kot najbolj selektiven inhibitor katepsina L. S spremenjenim mestom P1', kamor so vgradili triazolno skupino, se je izmed vseh sintetiziranih inhibitorjev najbolj specifično vezal v mesto S1', ki je substrat vezavno mesto na katepsinu L in ga inhibiral. Selektivnost inhibitorja AT094 za katepsin L so preverili najprej na rekombinantnih katepsinih, kjer je inhibiral katepsin L v enem koraku in pri 10-krat nižji koncentraciji, kot je bila potrebna za inaktivacijo katepsina B (Torkar in sod., 2013).

Preden smo inhibitor AT094 uporabili na celicah U87-MG smo testirali njegov vpliv na preživelost dveh vrst humanih celičnih linij, in sicer celične linije GBM U87-MG in normalnih humanih astrocitov NHA. Tako smo lahko v nadaljevanju uporabili necitotoksične, vendar inhibitorne koncentracije inhibitorja AT094. Inhibitor se je izkazal kot bolj toksičen za celice NHA, kar je verjetno posledica večje dovzetnosti nerakavih celic na sprožitev apoptoze, medtem ko imajo rakave celice močnejše antiapoptotske mehanizme in so se apoptozi v veliki meri sposobne izogniti. V rakavih celicah zaradi mutacij pride do povečanega izražanja antiapoptotskih proteinov (npr. IAP, Bcl-2) in zmanjšanega izražanja proapoptotskih proteinov (npr. mutacija v p53), pri čemer pride do motenj v celičnem ciklu in celice se nemoteno delijo kljub poškodovani DNA. Posledici sta nekontrolirana celična delitev in ustavitev apoptoze. K odpornosti celic na kontrolirano celično smrt vpliva tudi katepsin L, ki se povečano izraža pri raku dojke, pljuč, želodca, črevesja, karcinomu vratu, melanomu in predvsem GBM (Gocheva in sod., 2007). Katepsin L najverjetneje vpliva na celični cikel preko razgradnje jedrnih transkripcijskih faktorjev (Goulet in sod., 2004).

5.3 SELEKTIVNOST INHIBITORJA AT094

Selektivnost inhibitorja AT094 za katepsin L so preverili *in vitro* na celicah U87-MG s sondo AT071Cy3. Medtem ko je inhibitor AT094 skoraj popolnoma inhibiral katepsin L, je bilo v celici aktivnega še veliko katepsina B. Inhibitor AT094 se je izkazal kot bolj selektiven inhibitor katepsina L, vendar zaradi velike podobnosti aktivnega mesta med cisteinskimi katepsini ni popolnoma selektiven za katepsin L, ampak delno inhibira tudi druge katepsine, vključno s katepsinom B (Torkar in sod., 2013). Rezultate selektivnosti inhibitorja AT094 za katepsin L smo preverili z merjenjem aktivnosti katepsinov B in L v celičnem ekstraktu celic GBM. Aktivnost katepsina L se je v primerjavi z aktivnostjo katepsina B pri celicah tretiranih z AT094 nekoliko zmanjšala, vendar statistično značilnih razlik nismo zaznali. To je verjetno posledica tega, da smo merili aktivnost katepsinov B in L v celičnem ekstraktu, ki je homogenat znotrajceličnih proteinov, v katerem je lahko prišlo zaradi sprememb v pH do inaktivacije katepsinov ali celo do njihove hidrolize. V pufru za homogenizacijo celic sta bila namreč prisotna tudi proteazna inhibitorja (pepstatin A in fenilmetilsulfonil fluorid - PMSF), ki bi lahko zaradi podobnosti aktivnih mest med proteazami delno inaktivirala tudi katepsin B. Posledično tako verjetno nismo uspeli statistično potrditi večje selektivnosti inhibitorja AT094 za katepsin L v primerjavi s katepsinom B.

5.4 DELOVANJE INHIBITORJA AT094 NA APOPTOZO

Mnenja o vlogi katepsina L na apoptozo v tumorskih celicah so deljena. Predhodne raziskave so kazale na antiapoptotsko vlogo katepsina L, tako pri notranji kot zunanji poti sprožitvi apoptoze (Zajc in sod., 2006; Pucer in sod., 2010; Kenig in sod., 2011), zato smo želeli preveriti, kako inhibicija katepsina L s selektivnim inhibitorjem katepsina L AT094 vpliva na apoptozo celic U87-MG. V teh celicah smo v kombinaciji z inhibitorjem AT094 sprožili apoptozo z znanima induktorjema apoptoze, kot sta STS in TNF α /AktD, ki sprožita notranjo oziroma zunanjo pot apoptoze. Glede na rezultate utišanja katepsina L s siRNA, ko je bilo ob znižanju izražanja katepsina L več apoptotskih celic (Kenig in sod., 2013), smo pričakovali večjo občutljivost celic na apoptozo v primeru inhibicije katepsina L, vendar v tej nalogi tega nismo uspeli dokazati. Netoksične koncentracije AT094 niso

vplivale na povečanje deleža apoptotskih celic, povišanje izražanja efektorskih kaspaz 3 in 7, povečanje mitohondrijske prepustnosti ali na izražanje apoptotskih genov za Bax, Bcl-2 in p53. Izmerili smo sicer manjše povečanje izražanja gena za Bax v primeru inhibicije katepsina L in sprožitve notranje poti apoptoze, vendar značilnih razlik nismo opazili. Prav tako smo manjše povečanje izražanja gena za Bax izmerili tudi takrat, ko smo sprožili le inhibicijo katepsina L. Protein Bax deluje proapoptotsko tako, da se veže na membrano mitohondrija in poveča njeno prepustnost. Poleg gena za Bax se je v celicah v enakih razmerah povečalo tudi izražanje gena za p53. Vpletenost p53 v mehanizem delovanja katepsina L je že bil opisan, saj se je ob njegovem utišanju povišalo v celicah GBM izražanje genov za Bax, Bid, Fas in APAF-1, torej genov, ki jih regulira p53 (Kenig in sod., 2013; Haupt in sod., 2003). Ugotovljeno je bilo, da inhibitor AT094 v celicah U87-MG verjetno sproži celični stres, saj vpliva na povečanje izražanja HSP27 (ang. *heat shock protein 27*) in proteinov HTRA (ang. *heat shock induced serine protease*), vendar podroben mehanizem delovanja inhibitorja ni znan (Torkar in sod., 2013). Verjeten razlog, da ni prišlo do proapoptotskega delovanja inhibitorja, je tudi postopek tretiranja celic. Zaradi odstranitve inhibitorja z gojišča po 5 h pred dodatkom induktorjev apoptoze, s katerimi so bile celice tretirane 3 ali 12 h, je lahko prišlo do obnovitve encimske aktivnosti katepsina L, medtem ko pri trajnem in povsem specifičnem utišanju katepsina L z siRNA do tega ne pride. Omenili smo še nepopolno selektivnost inhibitorja za katepsin L v primerjavi z drugimi katepsini v celici, mogoča pa je tudi (kljub potrditvam na gelu NaDS-PAGE s sondo AT071Cy3) nepopolna inhibicija katepsina L v celici. Ker ima inhibitor AOMK elektrofilno skupino je možno, da AT094 poleg drugih cisteinskih katepsinov v celici inhibira tudi druge proteaze oz. encime, kar vpliva na celično apoptozo. Naše hipoteze, da se celicam U87-MG zniža prag apoptoze po tretiranju s selektivnim inhibitorjem katepsina L, AT094, torej nismo uspeli potrditi. Smiselno pa bi bilo poskuse ponoviti tako, da bi bil inhibitor tekom celotnega poskusa prisoten v mediju celic, torej tudi po sprožitvi notranje ali zunanje poti apoptoze, s čimer bi se obnovi encimske aktivnosti katepsina L lahko izognili. V primeru, da bi podaljšali čas tretiranja, je možno, da bi zaznali pozitivne učinke na sprožitev apoptoze sprožene preko inhibicije katepsina L z AT094, ker je možno, da smo sedaj opazovali le začetno fazo apoptoze. To bi sicer vseeno morali zaznati na ravni mRNA, kjer nismo zaznali značilnih razlik v povišanju proapoptotskih genov. V našem delu smo torej uporabili enake razmere tretiranja celic, kot

so pri svojem delu uporabili Kenig in sod. (2011), vendar njihovih rezultatov nismo potrdili, vzrok temu pa je najverjetneje prekratek čas izpostavljanja celic U87-MG inhibitorju AT094.

5.5 SINERGISTIČNO DELOVANJE ARZENOVEGA TRIOKSIDA IN INHIBITORJA AT094 – PRIHODNOST V PROTIRAKAVI TERAPIJI

Arzenov trioksid (As_2O_3) je znani kemoterapevtik in se danes uporablja v zdravstvene namene pri različnih oblikah raka, vključno z GBM. As_2O_3 sproži avtofagijo v rakavih celicah, vendar je delovanje As_2O_3 povezano tudi z apoptozo, ker so v mehanizmu delovanja As_2O_3 vključene tudi efektorske kaspaze. Predlagani mehanizem delovanja As_2O_3 torej vključuje avtofagosom in posledično povečano prepustnost mitohondrijske membrane ter sprožitev apoptoze preko kaspaz 3 in 7. Pucer in sod. (2010) so pokazali, da As_2O_3 statistično značilno zmanjša raven katepsina B v celici na nivoju mRNA in proteina ter inhibira njegovo aktivnost kot učinkovit ireverzibilni inhibitor. Tudi v celicah U87-MG z zmanjšanim izražanjem katepsina L je As_2O_3 deloval bolj toksično (Primon in sod., 2013). Sinergistično delovanje As_2O_3 in inhibicije katepsina L smo uspeli le delno potrditi s testom MTT in uporabo selektivnega inhibitorja katepsina L, saj smo pri sočasni inhibiciji katepsina L z inhibitorjem AT094 in tretiranju celic z As_2O_3 izmerili zmanjšan delež preživelih celic U87-MG. V tem primeru smo celice sočasno tretirali z inhibitorjem ter As_2O_3 . As_2O_3 smo uporabili v dveh različnih koncentracijah, in sicer 2 μM saj se ta koncentracija uporablja v kliničnih testiranjih (Haga in sod., 2005) ter 20 μM , ker smo želeli preveriti največji možen učinek As_2O_3 v danih razmerah. Sinergističen vpliv inhibitorja AT094 in As_2O_3 smo zaznali le pri nižji koncentraciji As_2O_3 . Nasprotno, povečanega deleža apoptotskih celic ni bilo, vendar je bil delež apoptotskih celic v primeru sočasne inhibicije katepsina L in tretiranja celic U87-MG z As_2O_3 večji. Razlog je verjetno ta, da celice tudi tu niso bile izpostavljene inhibitorju ves čas poskusa in je lahko prišlo do obnove encimske aktivnosti katepsina L.

Povzamemo lahko, da oba preliminarna testa kažeta, da je sinergistično delovanje inhibitorja AT094 in As_2O_3 mogoče, vendar smo statistično značilne razlike izmerili le pri testu MTT.

6 SKLEPI

V tej nalogi smo ovrednotili selektivnost in citotoksičnost novega aciloksimetilnega inhibitorja AT094 za katepsin L v celicah GBM. Z uporabo tega inhibitorja smo želeli potrditi hipotezo o antiapoptotskem delovanju katepsina L v GBM. Na podlagi rezultatov te naloge lahko zaključimo:

1. Inhibitor AT094 lahko prehaja v jedro celic GBM kjer se nahaja aktivni katepsin L.
2. Inhibitor AT094 bolj selektivno inhibira katepsin L kot katepsin B v celicah GBM, pri čemer pa ni popolnoma selektiven le za katepsin L. Zaradi podobnosti v aktivnih mestih cisteinskih proteaz verjeteno do določene mere inhibira tudi druge katepsine.
3. Inhibitor AT094 je v koncentraciji nad 1 μM bolj citotoksičen za normalne astrocite, kot za celice GBM.
4. Inhibitor katepsina L pri necitotoksični koncentraciji ni vplival na znižanje apoptotskega praga v celicah U87-MG kjer smo po inhibiciji katepsina L še dodatno sprožili apoptozo po notranji (s STS) ali zunanji poti (s TNF α /AktD).
5. Razlog za nepotrjen vpliv inhibitorja AT094 na apoptozo v celicah U87-MG je lahko ta, da je inaktivacija katepsina L lahko spodbudila "homeostazni" odziv in nastanek novih aktivnih oblik encima iz prokatepsinov. Možno pa je, da je učinek inhibicije katepsina L na apoptozo možno potrditi šele po daljšem času tretiranja celic z inhibitorjem.
6. Inhibicija katepsina L z AT094 ob sočasni prisotnosti arzenovega trioksida vpliva na povečano umrljivost celic U87-MG, izpostaviti pa moramo dejstvo, da gre tu za nekoliko drugačen mehanizem sprožanja celične smrti.

Zaključimo lahko, da sta inhibitor in sonda s podobno strukturo primerna za študij vloge katepsina L v različnih procesih v celicah GBM. Preliminarni testi sinergističnega pro-apoptotskega delovanja AT094 z arzenovim trioksidom kažejo na antiapoptotsko vlogo katepsina L pri GBM in pomembno prispevajo k nadaljnjim študijam za uporabo inhibitorja pri zdravljenju GBM ali drugih vrst raka.

7 VIRI

- Altieri D.C. 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature reviews cancer*, 3: 46–54
- Barret A.J., Rawlings N., Woessner J. 2004. *Handbook of proteolytic enzymes*. 2nd ed. London. Elsevier academic press: 1880 str.
- Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. 1998. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. London. Academic press: 1666 str.
- Bellail A.C., Mulligan P., Hao C. 2009. Targeting of TRAIL apoptotic pathways for glioblastoma therapies. V: Van Meir E.G. (ed.). *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets and therapeutic approaches*. 1st ed. New York, Humana press: 977–1010
- Boya P., Andreau K., Poncet D., Zamzami N., Perfettini J.L., Metivier D., Ojcius D.M., Jäättelä M., Kroemer G. 2003. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *Journal of experimental medicine*, 197, 10: 1323-1334
- Brinker A., Weber E., Stoll D., Voigt J., Muller A., Sewald N., Jung G., Wiesmüller K.-H., Bohley P. 2000. Highly potent inhibitors of human cathepsin L identified by screening combinatorial pentapeptide amide collections. *European journal of biochemistry*, 267, 16: 5085-5092
- Brocklehurst K. 1994. A sound basis for pH-dependent kinetic studies on enzymes. *Protein engineering*, 7: 291–299
- Burkhardt D.L., Sage J. 2008. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature reviews cancer*, 8: 671–682
- Buttle D.J., Saklatvala J., Tamai M., Barrett A.J. 1992. Inhibition of interleukin 1-stimulated cartilage proteoglycan degradation by a lipophilic inactivator of cysteine endopeptidases. *Biochemical journal*, 281, 1: 175–177
- Bylaite M., Moussali H., Marciukaitiene I., Ruzicka T., Walz M. 2006. Expression of cathepsin L and its inhibitor hurpin in inflammatory and neoplastic skin disease. *Experimental dermatology*, 15, 2: 110-118
- Cairns R.A., Khokha R., Hill R.P. 2003. Molecular mechanism of tumor invasion and metastasis an integrated view. *Current molecular view*, 3, 7: 659-671

- Carmona E., Dufour E., Plouffe C., Takebe S., Mason P., Mort J.S., Ménard R. 1996. Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry*, 35, 25: 8149–8157
- Caserman S., Lah T.T. 2004. Comparison of expression of cathepsins B and L and MMP2 in endothelial cells and in capillary sprouting in collagen gel. *International journal of biological markers*, 19, 2: 120-129
- Chow A.Y. 2010. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nature education*, 3, 9: 7
- Colin C., Voutsinos-Porche B., Nanni I., Fina F., Metellus P., Intagliata D., Baeza N., Bouvier C., Delfino C., Loundou A., Chinot O., Lah T., Kos J., Martin P.M., Ouafik L.H., Figarella-Branger D. 2009. High expression of cathepsin B and plasminogen activator inhibitor type-1 are strong predictor of survival in glioblastoma. *Acta neuropathologica*, 118, 6: 745-754
- Cooper G.M., Hausman R.E. 2004. *The cell: a molecular approach*, 3rd ed. Washington. D.C. ASM Press/Sunderland, Sinauer associates: 713 str.
- Dass C.R., Tran T.M., Choong P.F. 2007. Angiogenesis inhibitors and the need for anti-angiogenic therapeutics. *Journal of dental research*, 86, 10: 927-936
- Dennis-Sykes C.A., Miller W.J., McAleer W.J. 1985. A quantitative Western Blot method for protein measurement. *Journal of biological standardization*, 13, 4: 309–314
- Di Piazza M., Mader C., Geletneky K., Herreo Y., Calle M., Weber E., Schlehofer J., Deleu L., Rommelaere J. 2007. Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *Journal of virology*, 81, 8: 4186-4198
- Dunn A.D., Crutchfield H.E., Dunn J.T. 1991. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *The journal of biological chemistry*, 266, 30: 20198-20204
- Eichhorst T.S., Krammer H.P. 2002. Derangement of apoptosis in cancer. *Lancet*, 385, 9279: 345-346
- Emadi A., Gore S.D. 2010. Arsenic trioxide – An old drug rediscovered. *Blood reviews*., 24: 191-199
- Evan G.I., Vausden K.H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411, 6835: 342-348

- Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J.W.W., Comber H., Forman D., Bray F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer*, 49: 1374-1403
- Ghaffari S.H., Bashash D., Dizaji M.Z., Ghavamzadeh A., Alimoghaddam K. 2012. Alteration in miRNA gene expression pattern in acute promyelocytic leukemia cell induced by arsenic trioxide: a possible mechanism to explain arsenic multi-target action. *Tumour biology*, 33, 1: 157-172
- Gocheva V., Joyce J.A. 2007. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell cycle*, 6, 1: 60-64
- Gocheva V., Zeng W., Ke D., Klimstra D., Reinheckel T., Peters C., Hanahan D., Joyce J.A. 2006. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes & development*, 20, 5: 543-556
- Goulet B., Baruch A., Moon N.S., Poirier M., Sansregret L.L., Erickson A., Bogyo M., Nepveu A. 2004. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Molecular cell*, 14, 2: 207-219
- Haga N., Fujita N., Tsuruo T. 2005. Involvement of mitochondrial aggregation in arsenic trioxide (As₂O₃)-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Cancer science*, 96, 1: 825-833
- Hanada K., Tamai M., Yamagishi M., Ohmura S., Sawada J., Tanaka I. 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agricultural and biological chemistry*, 42: 523-528
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 1: 57-70
- Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *Journal of cell science*, 116: 4077-4085
- Huang S., Millar A., H. 2013. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Current opinion in plant biology*, 16, 3: 344-349
- Joyce J.A., Baruch A., Chehade K., Meyer-Morse N., Giraudo E., Tsai F.Y., Greenbaum D.C., Hager J.H., Bogyo M., Hanahan D. 2004. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer cell*, 5: 443-453

- Takegawa H., Nikawa T., Tagami K., Kamioka H., Sumitani K., Kawata T., Drobnic-Kosorok M., Lenarčič B., Turk V., Katunuma N. 1993. Participation of cathepsin L on bone resorption. *FEBS letters*, 321: 247-250
- Kato D., Boatright K.M., Berger A.B., Nazif T., Blum G., Ryan C., Chehade K.A.H., Salvesen G.S., Bogoy M. 2005. Activity-based probes that target diverse cysteine protease families. *Nature chemical biology*, 1, 1: 33-38
- Katunuma N. 1989. Mechanisms and regulation of lysosomal proteolysis. *Revisiónes sobre biología celular*, 20: 35-61
- Katunuma N., Tsuge M., Nukatsuka M. 2002. Structure-based development of cathepsin L inhibitors and therapeutic applications for prevention of cancer metastasis and cancer-induced osteoporosis. *Advance in enzyme regulation*, 42: 159-172
- Kenig S., Frangež R., Pucer A., Lah T. 2011. Inhibition of cathepsin L lowers the apoptotic threshold of glioblastoma cells by up-regulating p53 and transcription of caspases 3 and 7. *Springer science+business media*, 16, 7: 671-682
- Kishore Kumar G.D., Gustavo E.C., Charlton-Sevick A.K., Arispe W.M., MacDonough M.T., Strecker T.E., Chen S.E., Siim B.G., Chaplin D.J., Trawick M.L., Pinney K.G. 2010. Design, synthesis, and biological evaluation of potent thiosemicarbazone based cathepsin L inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20, 4: 1415-1419
- Klemenčič I., Carmona A.K., Cezari M.H., Juliano M.A., Juliano L., Guncar G., Turk D., Križaj I., Turk V., Turk B. 2000. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *European journal of biochemistry*, 267, 17: 5404-5412
- Konduri S., Lakka S.S., Tasiou A., Yanamandra N., Gondi C.S., Dinh D.H., Olivero W.C., Gujrati M., Rao J.S. 2001. Elevated levels of cathepsin B in human glioblastoma cell lines. *International journal of oncology*, 19, 3: 519-524
- Lah T.T., Duran Alonso M.B., Van Noorden C.J. Antiprotease therapy in cancer: hot or not? 2006. *Expert opinion on biological therapy*, 6, 3: 257-279
- Landowski T.H., Moscinski L., Burke R., Buyuksal I., Painter J.S., Goldstein S., Dalton W.S. 2001. CD95 antigen mutations in hematopoietic malignancies. *Leukemia & lymphoma*, 42, 5: 835-846
- Langauer C., Kinzler W.K., Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancer. *Nature*, 396, 6712: 643-649

- Langauer C., Vogelstein B., Kinzler K.W. 2002. *The Genetic Basis of Human Cancer*. 2nd ed. McGraw-Hill. Medical publishing division, 821 str.
- Lankelma J.M., Voorend M.D., Barwari T., Koetsveld J., Van der Spek A.H., De Porto A.P.N.A., Rooijen G., Van Noorden C.J.F. 2010. Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life science*, 86: 225-233
- Levičar N., Dewey R.A., Daley E., Bates T.E., Davies D., Kos J., Pilkington G.J., Lah T.T. 2003. Selective suppression of cathepsin L by antisense cDNA impairs human brain tumor cell invasion in vitro and promotes apoptosis. *Cancer gene therapy*, 10, 2: 141-151
- Levičar N., Nuttall R.K., Lah Turnšek T. 2003. Proteases in brain tumor progression. *Acta neurochirurgica*, 145, 9: 825-838
- Lima S.R.F., Kahn A.S., Soletti C.S., Biasoli D., Alves T., Da Fonseca C.C.A., Garcia C., Romão L., Brito J., Holanda-Afonso R., Faria J., Borges H., Moura-Neto V. 2012. Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochimica et biophysica acta*, 1826, 2: 338-349
- Liu Y., Peterson D.A., Kimura H., Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*, 69, 2: 518-593
- Lopez-Otin C., Bond J.S. 2008. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *The journal of biological chemistry*, 283, 45: 30433-30437
- Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114, 2: 97-109
- Maher E.A., Furnari F.B., Bachoo R.M., Rowitch D.H., Louis D.N., Cavenee W.K., DePinho R.A. 2001. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & development*, 15, 11: 1311-1333
- Malla R., Gopinath S., Alapati K., Gondi C.S., Gujrati M., Dinh D.H., Mohanam S., Rao J.S. 2005. Downregulation of uPAR and Cathepsin B Induces Apoptosis via Regulation of Bcl-2 and Bax and Inhibition of the PI3K/Akt Pathway in Gliomas. *PLOS ONE*, 5, 10: e13731
- Mancini M., Nicholson D.W., Roy S., Thornberry N.A., Peterson E.P., Casciola-Rosen L.A., Rosen A. 1998. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial

- distribution: implications for apoptotic signaling. *The journal of cell biology*, 140: 1485–1495
- McGrath M.E. 1999. The lysosomal cysteine proteases. *Annual review of biophysics*, 28: 181-204
- Mohamed M. M., Sloane B. F. 2006. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature reviews cancer*, 6, 10: 764-775
- Nagaraj N.S., Zacharias W. 2007. Cigarette smoke condensate increases cathepsin-mediated invasiveness of oral carcinoma cells. *Toxicology letters*, 170: 134-145
- Nakagawa T., Roth W., Wong P., Nelson A., Farr A., Deussing J., Villadangos J.A., Ploegh H., Peters C., Rudensky A.Y. 1998. Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*, 280: 450-453
- Navab R., Pedraza C., Fallavollita L., Wang N., Chevet E., Auguste P., Jenna S., You Z., Bikfalvi A., Hu J., O'Connor R., Erickson A., Mort J.S., Brodt P. 2008. Loss of responsiveness to IGF-I in cells with reduced cathepsin L expression levels. *Oncogene*, 27, 37: 4973-4985
- Ohgaki H., Kleihues P. 2012. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research*, 19, 4: 764-772
- Ponten J., Macintyre E.H. 1986. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta pathologica microbiologica scandinavica*, 74, 4: 465-486
- Primon M., Huszthy C.P., Motaln H., Talasila K.M., Torkar A., Bjerkvig R., Lah Turnšek T. 2013. Cathepsin L Silencing Enhances Arsenic Trioxide - mediated in vitro Cytotoxicity and Apoptosis in Glioblastoma U87MG Spheroids. *Research paper*, 319, 17: 2637-2648
- Pucer A., Castino R., Mirkovič B., Falnoga I., Slejkovec Z., Isidoro C., Lah T.T. 2010. Differential role of cathepsins B and L in autophagy-associated cell death induced by arsenic trioxide in U87 human glioblastoma cells. *Biological chemistry*, 391, 5: 519-531
- Puri N., Roche P.A. 2008. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105, 7: 2580–2585
- Rawlings N.D., Barrett A.J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical journal*, 290: 205-218

- Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J. 2006. MEROPoS: the peptidase database. *Nucleic acids research*, 34: 270-272
- Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research*, 36, 1: 320-325
- Reed J.C. 1997. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Seminars in hematology*, 34: 9–19
- Reiser J., Adair B., Reinheckel T. 2010. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *Journal of clinical investigation*, 120, 10: 3421-3431
- Rodriguez-Mora O., Franklin A.R., McCubrey A.J. 2003. A New Hope for Treatment of Glioblastomas. *Cancer biology & therapy*, 2, 4: 354-355
- Rofstad E.K., Mathiesen B., Kindem K., Galappathi K. 2006. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer research*, 66, 13: 6699-6707
- Roth W., Deussing J., Botchkarev V.A., Pauly-Evers M., Saftig P., Hafner A., Schmidt P., Schmahl W., Scherer J., Anton-Lamprecht I., Von-Figura K., Paus R., Peters C. 2000. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *The FASEB journal*, 14, 13: 2075-2086
- Rousselet N., Mills L., Jean D., Tellez C., Bar-Eli M., Frade R. 2004. Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human melanoma cells by anti-cathepsin L single chain variable fragment. *Cancer research*, 64, 1: 146-151
- Schroeder A., Auffray C. 2005. Toward standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic acids research*, 33, 6: e56
- Sever S., Altintas M.M., Nankoe S.R., Möller C.C., Ko D., Wei C., Henderson J., del Re E.C., Hsing L., Erickson A., Cohen C.D., Kretzler M., Kerjaschki D., Rudensky A., Nikolic B., Reiser J. 2007. Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *Journal of clinical investigation*, 117, 8: 2095–2104
- Shi G.P., Villadangos J.A., Dranoff G., Small C., Gu L., Haley K.J., Riese R., Ploegh H.L., Chapman H.A. 1999. Cathepsin S is required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*, 10: 197–206

- Skrzydłowska E., Sulkowska M., Koda M., Sulkowski S. 2005. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World journal of gastroenterology*, 11: 1251–1266
- Stahl S., Reinders Y., Asan E., Mothes W., Conzelman E., Sickmann A., Felbor U. 2007. Proteomic analysis of cathepsin B- and L- deficient mouse brain lysosomes. *Biochimica et biophysica acta*, 1774, 10: 1237-1246
- Stoka V., Turk B., Schendel S.L., Kim T.H., Cirman T., Snipas S.J., Ellerby L.M., Bredesen D., Freeze H., Abrahamson M., Bromme D., Krajewski S., Reed J.C., Yin X.M., Turk V., Salvesen G.S. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *The journal of biological chemistry*, 276, 5: 3149-3157
- Strojnik T., Kavalarič R., Trinkaus M., Lah T.T. 2005. Cathepsin L in glioma progression: comparison with cathepsin B. *Cancer detection and prevention*, 29, 5: 448-455
- Stypmann J., Glaser K., Roth W., Tobin D.J., Petermann I., Matthias R., Monnig G., Haverkamp W., Breithardt G., Schmahl W., Peters C., Reinheckel T. 2002. Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 99, 9: 6234-6239
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebbersold R., Siderovski D.P., Penninger M., Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397: 441-446
- Thornberry N.A., Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312–1316
- Torkar A., Lenarčič B., Lah T., Dive V., Devel L. 2013. Identification of new peptide amides as selective cathepsin L inhibitors: The first step towards selective irreversible inhibitors? *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23, 10: 2968-2973
- Torkar A. 2013. Razvoj selektivnih inhibitorjev katepsina L: doktorska disertacija, Ljubljana, [A. Torkar]: 111 str.
- Tso C.L., Freije W.A., Day A., Chen Z., Merriman B., Perlina A., Lee Y., Dia E.Q., Yoshimoto K., Mischel P.S., Liau L.M., Cloughesy T.F., Nelson S.F. 2006. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer research*, 66, 1: 159-167

- Tsujimoto Y., Finger L.R., Yunis J., Nowell P.C., Croce C.M. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226: 1097–1099
- Turk B., Dolenc I., Turk V., Bieth J.G. 1993. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry*, 32: 375–380
- Turk B., Turk D., Turk V. 2000. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et biophysica acta*, 1477: 98-111
- Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D. 2012. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et biophysica acta*, 1824, 1: 68-88
- Van Nierop K., Muller F.J., Stap J., Van Norden C.J., van Eijk M., de Groot C. 2006. Lysosomal destabilization contributes to apoptosis of germinal center B-lymphocytes. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 54, 12: 1425-1435
- Vasiljeva O., Reinheckel T., Peters C., Turk D., Turk V., Turk B. 2007. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current pharmaceutical design*, 13: 385-401
- Vasiljeva O., Turk B. 2008. Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie*, 90: 380-386
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*, 184, 1: 39-51
- Wajant H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296: 1635–1636
- Wartmann T., Mayerle J., Kähne T., Sahin-Tóth M., Ruthenbürger M., Matthias R., Kruse A., Reinheckel T., Peters C., Weiss F.U., Sandler M., Lippert H., Schulz H.U., Aghdassi A., Dummer A., Teller S., Halangk W., Lerch M.M. 2010. Cathepsin L inactivates human trypsinogen, whereas cathepsin L-deletion reduces the severity of pancreatitis in mice. *Gastroenterology*, 138, 2: 726-730
- Westermarck B. 2012. Glioblastoma-a moving target. *The american journal of the medical science*, 117: 251–256

- Willstätter R., Bamann E. 1929. Über die proteasen der magenschleimhaut. Erste abhandlung über die enzyme der leukocyten. Hoppe-Seyler's zeitschrift für physiologische chemie, 180: 127–143
- Wright W.W., Smith L., Kerr C., Charron M. 2003. Mice that express enzymatically inactive cathepsin L exhibit abnormal spermatogenesis. Biology of reproduction, 68, 2: 680-687
- Yang Z., Cox J.L. 2007. Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma. Cancer cell international, 7: 8
- Zajc I., Hreljac I., Lah T. 2006. Cathepsin L affects apoptosis of glioblastoma cells: a potential implication in the design of cancer therapeutics. Anticancer research, 26, 5A: 3357-3364
- Zapata J.M., Pawlowski K., Haas E., Ware C.F., Godzik A., Reed J.C. 2001. Adiverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. The journal of biology chemistry, 276: 24242–24252
- Zhao M., Eaton J.W., Brunk U.T. 2001. Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis. FEBS letters, 509, 3: 405-412
- Zhao S., Aviles E.R., Fujikawa D.G. 2010. Nuclear translocation of mitochondrial cytochrome c, lysosomal cathepsins B and D, and three other death-promoting proteins within the first 60 minutes of generalized seizures. Journal of neuroscience research, 88, 8: 1727-1737
- Zheng X., Chou P. M., Mirkin B. I., Rebbaa A. 2004. Senescence-initiated Reversal of Drug Resistance: Specific Role of Cathepsin L. Cancer research, 64: 1773-1780

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Tamari Lah Turnšek za ponujeno priložnost za delo v njenem laboratoriju ter pomoč, potrpežljivost in spodbudo tekom izdelave magistrske naloge.

Zahvaljujem se somentorici dr. Ani Torkar, za pomoč, potrpežljivost, vspodbudo in koristne nasvete tekom mojega dela v laboratoriju in kasneje za usmerjanje in motiviranje pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se ji tudi za dober zgled in prijateljske nasvete izven laboratorija.

Zahvaljujem se komisiji, ki jo sestavljajo predsednica komisije prof. dr. Jasna Štrus, recenzent prof. dr. Petek Maček in mentorica prof. dr. Tamara Lah Turnšek, za hiter pregled magistrskega dela in nasvete za možne izboljšave.

Zahvaljujem se tudi vsem bivšim sodelavcem iz Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo, ki so mi bili vedno pripravljene pomagati v laboratoriju in izven njega ter se skupaj z mano veselili uspehov.

Nazadnje se zahvaljujem mojim domačim, posebej stricu Tonetu, ki so me podpirali in mi stali ob strani tekom študija ter verjeli vame. Zahvaljujem se tudi Žigu in Neži za pomoč in nasvete pri oblikovanju magistrske naloge. Enako se zahvaljujem vsem mojim dobrim prijateljem za podporo in prijateljske nasvete ter prijetno druženje.