VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI ZNOTRAJ IN ZUNAJCELIČNI SIGNALIZACIJI

Barbara Sobotič

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija, maj 2015

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. dr. Vito Turk, predsednik, Institut »Jožef Stefan«, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

prof. dr. Veronika Stoka, član, Institut »Jožef Stefan«, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

prof. dr. Gregor Anderluh, član, Kemijski inštitut, Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Barbara Sobotič

VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI ZNOTRAJ IN ZUNAJCELIČNI SIGNALIZACIJI

Doktorska disertacija

ROLE OF CYSTEINE CATHEPSINS IN EXTRA- AND INTRACELLULAR SIGNALIZATION

Doctoral Dissertation

Mentor: prof. ddr. Boris Turk

Somentor: doc. dr. Marko Fonović

Ljubljana, Slovenija, maj 2015

Kazalo

Povzetek ..... **IX**

Abstract ..... **XI**

Seznam kratic ..... **XIII**

Standardne oznake aminokislin ..... **XIX**

1 Uvod **1**
1.1 Katepsini 1
1.2 Cisteinski katepsini 1
1.3 Struktura katepsinov in substratna specifičnost 2
1.4 Procesiranje in aktivacija katepsinov 3
1.5 Uravnavanje aktivnosti katepsinov 3
1.5.1 Endogeni inhibitorji cisteinskih katepsinov 4
1.6 Fiziološka vloga cisteinskih katepsinov 4
1.7 Zunajcelična vloga cisteinskih katepsinov 5
1.7.1 Rakasta obolenja in tumorsko mikrookolje 6
1.7.2 Proteoliza v tumorskem mikrookolju 6
1.7.2.1 Cepitev zunajceličnih domen membranskih proteinov (*angl*. shedding) 6
1.7.3 Katepsini in tumorsko mikrookolje 7
1.7.4 Povišano izražanje katepsinov 7
1.7.5 Izločanje katepsinov v tumorskem mikrookolju 8
1.7.5.1 S tumorjem povezani makrofagi (*angl*. tumor associated macrophages – TAMs) 9
1.7.6 Vloga katepsinov v zunajcelični proteolizi 9
1.7.6.1 Mehanizmi, preko katerih katepsini pospešujejo tumorigenezo 10
1.7.7 Živalski tumorski modeli 11
1.7.7.1 Model nevroendokrine neoplazije trebušne slinavke (RIP1-Tag2) (RT2) 12
1.8 Cisteinski katepsini pri apoptozi 12
1.8.1 Apoptoza 13
1.8.2 Kaspaze 13
1.8.3 Sprožitev apoptoze 14
1.8.3.1 Notranja (intrinzična, mitohondrijska) pot 14
1.8.3.2 Proteini Bcl-2 15
1.8.3.3 Zunanja (ekstrinzična, receptorska) pot 16
1.8.3.3.1 Ligand in receptor Fas 17
1.8.4 Cisteinski katepsini, vpleteni v apoptotsko pot 19
1.8.4.1 Mehanizmi permeabilizacije lizosomske membrane 20
1.8.4.2 Vloga cisteinskih katepsinov v zunanji poti apoptoze 21

2 Namen dela in hipoteza 23

3 Materiali in metode 25

3.1 Materiali 25

3.1.1 Kemikalije 25
3.1.2 Proteini 26
3.1.3 Protitelesa 26
3.1.4 Gojišča in pufri za gojenje celic 27
3.1.5 Celice 27
3.1.6 Pufri 27
3.1.7 Laboratorijska oprema 30
3.1.8 Komercialni testi 30

3.2 Metode 31

3.2.1 Gojenje celic 31
3.2.2 Tripsinizacija in precepljanje celic 31
3.2.3 Zamrzovanje celic 31
3.2.4 Odmrzovanje celic 31
3.2.5 Določanje deleža apoptotskih celic 31
3.2.6 Določitev optimalne koncentracije APO-1 32
3.2.7 Sprožitev apoptoze z APO-1 na celični liniji Jurkat 32
3.2.8 Določitev deleža celic s poškodovanimi mitohondriji 32
3.2.9 Določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi 32
3.2.10 Priprava celotnega celičnega lizata 32
3.2.11 Priprava citosolnega lizata 33
3.2.12 Določanje celotne koncentracije proteinov v vzorcu 33
3.2.13 Merjenje encimske aktivnosti 33
3.2.14 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS 34
3.2.15 Detekcija proteinov s prenosom western 34
3.2.16 Dodajanje rekombinantnih katepsinov na intaktne celice 34
3.2.17 Priprava vzorcev za masno spektrometrijo 35
3.2.17.1 Označevanje prostih N-koncev z uporabo NHS-tridevtero-acetata za določevanje mest cepitve s katepsinoma L in S 35
3.2.18 Analiza vzorcev z nano LC-MS/MS 37
3.2.19 Analiza masnospektroskopskih podatkov 37
3.2.20 Diferenciacija monocitov U-937 v makrofage 38
3.2.21 Ko-kulture MDA-MB-231 in diferenciranih U-937 38
3.2.22 Test migracije 38
3.2.23 Test invazivnosti 38
3.2.24 Svetlobna mikroskopija 39
3.2.25 Test Ras GTP-azne aktivnosti 39
3.2.26 Priprava topnih ekstraktov nevroendokrinih tumorjev trebušne slinavke (tumorski model RIP1-Tag2), ki so se razvili v miših divjega tipa in v miših z izbitim genom za katepsin B ali S 39

4 Rezultati 41

4.1 Zunajcelična vloga katepsinov 41

4.1.1 Procesiranje intaktnih celic MDA-MB-231 s katepsini L, S in B 41
4.1.2 Določitev zunajceličnih substratov cisteinskih katepsinov L, S in B v celični liniji MDA-MB-231 42
4.1.3 Določitev zunajceličnih substratov cisteinskih katepsinov L in S v drugih celičnih linijah 48

4.1.4 Strukturna podobnost identificiranih substratov cisteinskih katepsinov 57
4.1.5 Določitev mest cepitve katepsinov L in S 58
4.1.6 Cepitev zunajceličnih domen v ko-kulturi celic MDA-MB-231 in U-937 68
4.1.7 Detekcija cepitev substratov *in vivo* v topnih ekstraktih nevroendokrinih tumorjev trebušne slinavke v glodalskem modelu RIP1-Tag2..... 70
4.1.8 Funkcijska podobnost identificiranih substratov cisteinskih katepsinov 71
4.1.9 Vpliv inkubacije tumorskih celic s katepsini na njihovo stopnjo migracije in invazivnost..... 72
4.1.10 Vpliv tretiranja tumorskih celic s katepsini L in S na aktivnost Ras GTP-az..... 75
4.2 Vloga katepsinov pri apoptozi, sproženi z anti-APO-1, v človeških celičnih linijah..... 77
4.2.1 Anti-APO-1 sproži od kaspaz odvisno apoptozo, ki je neodvisna od aktivnosti cisteinskih katepsinov..... 77
4.2.2 Mitohondriji in lizosomi se poškodujejo med apoptozo, sproženo z anti-APO-1..... 80
4.2.3 Katepsinska aktivnost v citosolu je povišana med apoptozo, sproženo z anti-APO-1 82

5 Razprava..... 85
5.1 Cisteinski katepsini v zunajcelični proteolizi..... 85
5.2 Vloga cisteinskih katepsinov pri apoptozi, sproženi preko receptorja smrti Fas 90

6 Zaključki..... 93

7 Zahvale..... 95

Literatura in viri..... 97

Kazalo slik 111

Kazalo tabel..... 117

Priloge 119

Povzetek

Cisteinski katepsini, ki jih celice tumorskega mikrookolja izločajo v zunajcelični prostor, vzpodbujajo tumorigene procese, kot so angiogeneza, migracija in invazija. Kljub temu je razen razgradnje proteinov zunajceličnega matriksa zelo malo znanega o njihovih fizioloških substratih in posledično o molekularnih mehanizmih, s katerimi pospešujejo razvoj tumorjev. Proteolitsko procesiranje zunajceličnih domen membranskih proteinov (*angl*. shedding) je eden izmed ključnih mehanizmov, s katerim serinske in metaloproteaze povečujejo tumorigeni potencial. Z masno-spektroskopskim pristopom smo pokazali, da tudi katepsina S in L odcepita zunajcelične domene transmembranskih receptorjev in proteinov za adhezijo celic. Prav tako smo ugotovili, da v transgenem mišjem modelu karcinoma trebušne slinavke izbitje gena za katepsin S znatno zmanjša procesiranje substratov katepsinov, kar kaže na pomembno vlogo teh proteaz v zunajcelični proteolizi pri raku. Cepitve membranskih proteinov s katepsini ne samo povečajo migracijo in invazivnost celic, najverjetneje zaradi cepitev molekul CAM, ampak tudi vplivajo na znotrajcelično signalizacijo. Preko proteolitskega procesiranja določenih membranskih receptorjev cisteinski katepsini spreminjajo aktivnost znotrajceličnih Ras GTP-az, ki so pomembno soudeležene pri biologiji rakastih obolenj. Tako nam naša spoznanja ponujajo novo povezavo med zunajcelično aktivnostjo katepsinov in razvojem ter širjenjem tumorjev.

Nova spoznanja s področja cisteinskih katepsinov pa se ne odpirajo samo na področju zunajceličnega delovanja, ampak tudi pri znotrajceličnih procesih, kot je programirana celična smrt oz. apoptoza. Ker obstajajo nasprotujoča si poročila o njihovi udeleženosti in mestu v tej signalizacijski poti, kar velja predvsem za katepsin B, smo raziskali njihovo morebitno vlogo v apoptozi, sproženi preko receptorjev Fas. Pokazali smo, da uporaba specifičnega inhibitorja katepsina B (CA-074Me) kot tudi širokospektralnega inhibitorja cisteinskih katepsinov (E-64) ne prepreči sprožitve apoptoze in njenega napredovanja, kot tudi ne zaščiti integritete lizosomske ter mitohondrijske membrane. Iz tega smo sklepali, da cisteinski katepsini niso potebni za sprožitev apoptoze preko receptojev Fas, ne moremo pa izključiti, da so soudeleženi pri ojačitveni signalni zanki.

Abstract

Cysteine cathepsins which are secreted by the cells of the tumor microenvironment are known to drive tumorigenic processes like angiogenesis, migration and invasion. But besides the degradation of extracellular matrix proteins, little is known about their physiological substrates and thus the molecular mechanisms they deploy. One of the key mechanisms used by serine and metalloproteases to facilitate cancer progression is proteolytic release of the extracellular domains of transmembrane proteins or ectodomain shedding. Here we show using a mass spectrometry-based approach that also cathepsins L and S act as sheddases and cleave extracellular domains of CAM adhesion proteins and transmembrane receptors. In cathepsin S-deficient mouse pancreatic cancers, shedding of these cathepsin substrates is highly reduced, pointing to an essential role of cathepsins in extracellular shedding in cancer. In addition to influencing cell migration and invasion, most probably through shedding of CAM molecules, shedding of surface proteins by extracellular cathepsins impacts intracellular signaling. Through the proteolytic removal of certain membrane receptors they modulate intracellular cancer related Ras GTPase activity. This new data provides us a putative mechanistic link between extracellular cathepsin activity and cancer progression.

New insights in the field of cysteine cathepsins are also emerging for their intracellular functions, especially their involvement in programed cell death or apoptosis. As there are contradicting reports regarding their involvement in the signaling pathways, particularly for cathepsin B, we explored their role in Fas mediated apoptosis. We have shown that the specific cathepsin B inhibitor (CA-074Me) as well as the broad-spectrum cysteine cathepsin inhibitor (E-64) did not prevent apoptosis and its progression nor the mitochondrial and lysosomal membrane permeabilization associated with this type of cell death. These data indicate that cysteine cathepsins are not required for Fas-mediated apoptosis. This does not, however, rule out that cysteine cathepsins are involved in the amplification, but not in the initiation, of death receptor-mediated apoptosis in certain cell lines.

Seznam kratic

a.e.	=	arbitrarne enote
angl.	=	angleško
Ac-DEVD-AFC	=	N-acetil-aspartil-glutamil-valil-aspartil-7-amino-4-trifluorometilkumarin
AIF	=	dejavnik, ki sproži apoptozo; apoptosis inducing factor
AIIT	=	aneksin II tetramer; annexin II tetramer
ALCAM	=	aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo
aneksin V-PE	=	aneksin V-fikoeritrin
AO	=	akridin oranž
Apaf-1	=	aktivacijski dejavnik 1 apoptozne proteaze; apoptotic protease-activating factor 1
APP	=	prekurzorski protein amiloida; amiloid precursor protein
APS	=	amonijev persulfat
ASMase	=	kisla sfingomielinaza: acid sfingomielinase
Bak	=	antagonist Bcl-2 in ubijalec; Bcl-2 antagonist/killer
Bax	=	z Bcl-2 povezan protein x; Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	=	protein 2 iz limfoma celic B; B-cell lymphoma 2
Bmf	=	Bcl-2 spreminjajoči dejavnik; Bcl-2-modifying factor
Bcd	=	protein iz celic B; B-cell-derived protein
Bcl-w	=	tudi Bcl-2-like protein 2; protein 2, podoben Bcl-2
Bcl-xL	=	tudi Bcl-2-like protein 1; protein 1, podoben Bcl-2
Bik	=	ubijalec, ki sodeluje z Bcl-2; Bcl-2-interacting killer
BH	=	regije, homologne z Bcl-2; Bcl-2 homology regions
Bid	=	protein smrti, ki reagira z domeno BH-3; BH-3 interacting domain death protein
Bim	=	posrednik celične smrti, ki reagira z Bcl-2; Bcl-2 interacting mediator of cell death
BMDC	=	celice, ki izvirajo iz kostnega mozga; bone marrow derived cells
BSA	=	goveji serumski albumin; bovine serum albumin
CA-074Me	=	[(2S,3S)-3-propilkarbamoiloksiran-2-karbonil]-L-isoleucil-L-prolil metil ester
CARD	=	domena, ki rekrutira kaspaze; caspase recruitment domain
cFLIP	=	celični FLIP; cellular FLIP
cIAP	=	celični inhibitor apoptoze; cellular ihibitor of apoptosis protein
CID	=	s trki spodbujen razpad; collision-induced dissociation
CHAPS	=	3-[(kloraminopropil)dimetilamonij]-2-hidroksi-1-propan
COFRADIC	=	kombinirana frakcijska diagonalna kromatografija; combined fractional diagonal chromatography
D	=	devterij

DD	=	domena smrti; death domain
DED	=	efektorska domena smrti; death effector domain
DIABLO	=	protein z nizkim pI, ki neposredno veže IAP; direct IAP binding protein with low pI
Daxx	=	tudi death domain-associated protein 6; protein 6, ki je povezan z domeno smrti
DISC	=	signalni kompleks, ki sproži smrt; death inducing signaling complex
DMEM	=	po Dulbeccu spremenjeno gojišče Eagle; Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	=	dimetil sulfoksid; dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoksiribonukleinska kislina; deoxyribonucleic acid
DR	=	receptor smrti; death receptor
DT	=	divji tip
DTT	=	ditiotreitol
E-64	=	(2S,3S) *trans*-epoksisukcinil-L-levcilamido (4-guanidino)butan
E-64d	=	(2S,3S)-*trans*-epoksisukcinil-L-levcilamido-3-metilbutan etilni ester
ECL	=	povečana kemoluminiscenca; enhanced chemoluminiscence
ECM	=	zunajcelični matriks; extracellular matrix
EDTA	=	etilendiamin tetra acetat
EGTA	=	etilen glikol-bis(β-aminoetil eter)-N, N, N', N'-tetra acetat
EGF	=	epidermalni rastni dejavnik; epidermal growth factor
EGFR	=	receptor epidermalnega rastnega dejavnika; epidermal growth factor receptor
ENPP1	=	alkalna fosfodiesteraza 1
FADD	=	na Fas vezan protein z domeno smrti; Fas-associated protein with death domain
Fas	=	receptor smrti Fas, tudi CD95 in APO-1
FasL	=	Fas ligand
FAP	=	s Fas-om povezana proteaza; Fas-associated protease
FBS	=	serum govejih zarodkov; fetal bovine serum
FBS-HI	=	toplotno inaktiviran serum govejih zarodkov; heat inactivated fetal bovine serum
FLICE	=	ICE, podoben FADD-u; Fadd-like interleukin-1β converting enzyme
FLIP	=	proteini, ki inhibirajo FLICE; FLICE-inhibitory proteins
FPPS	=	hitro profiliranje specifičnosti proteaz; fast profiling of protease specificity
HCD	=	higher energy collisional dissociation razpad zaradi višje-energijskih trkov
HEPES	=	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonična kislina
Hrk	=	aktivator harakiri apoptoze; activator of apoptosis harakiri
HtrA2/Omi	=	protein A2, ki se potrebuje pri visoki temperaturi; high temperature requirement protein A2
IAP	=	inhibitor apoptoze; inhibitor of apoptosis protein
ICAD/DFF45	=	inhibitor CAD/DNA fragmentacijski dejavnik 45; DNA fragmentation factor 45
IFN	=	interferon

IL	=	interlevkin
ISIL	=	označevanje s stabilnimi izotopi v gelu; In-gel Stable-Isotope Labeling
JNK	=	C-Jun N-terminalna kinaza; c-Jun N-terminal kinase
kDa	=	kilo dalton
kat $B^{-/-}$	=	izbitje gena za katepsin B
kat $L^{-/-}$	=	izbitje gena za katepsin L
kat $S^{-/-}$	=	izbitje gena za katepsin S
K14-HPV16	=	model skvamoznega kožnega in cervikalnega raka (keratin 14 – K14; HPV16 – humani papiloma virus 16)
L1CAM	=	celična adhezijska molekula L1
Lamp	=	membranski protein, povezan z lizosomom; lysosome associated membrane protein
LeuLeuOMe	=	L-Levcil-L-levcin metilni ester
LMP	=	permeabilizacija lizosomske membrane; lysosomal membrane permeabilisation
M6PR	=	receptor manoze 6-fosfat; mannose 6-phosphate receptor
MAPK	=	kinaza, ki jo aktivira mitogen; mitogen-activated protein kinase
Mcl	=	protein za celično diferenciacijo mieloidne levkemije; myeloid leukemia cell differentiation protein
MHC	=	poglavitni histokompatibilnostni kompleks; major histocompatibility complex
MMP	=	metaloproteaza matriksa; matrix metalloprotease
MOPM	=	permeabilizacija zunanje membrane mitohondrija; mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	=	informacijska ribonukleinska kislina; mesenger ribonuclear acid
NaDS	=	natrijev dodecil sulfat
NF-κβ	=	jedrni dejavnik κβ; nuclear factor-κβž
NHS	=	N-hidroksi sukcinimid
Noxa	=	*lat.* poškodba, tudi s PMA induciran protein; PMA-induced protein 1
pRB	=	protein retinoblastoma; retinoblastoma protein
p53	=	protein 53
PAGE	=	poliakrilamidna gelska elektroforeza; polyacrylamide gel electrophoresis
PARP	=	poliADP-riboza polimeraza; (poly) ADP-ribose polymerase
PBS	=	fosfatni pufer z NaCl; phosphate buffer saline
PE	=	fikoeritrin; phycoerythrin
pH	=	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PI	=	propidijev jodid
PIDD	=	protein z domeno smrti, ki ga inducira p53; p53-induced protein with a death domain
PLA2	=	fosfolipaza A2
PLAD	=	domena, ki se sestavi pred vezavo liganda; preligand assembly domain
PET	=	polietilen tereftalat
PECAM	=	endotelijska adhezijska molekula krvnih ploščic; platelet endothelial cell adhesion molecule
PMSF	=	fenil-metil-sulfonil fluorid

proUPA	=	pro-urokinazni aktivator plazminogena; prourokinase plazminogen activator
proMMP	=	pro-metaloproteaza matriksa; pro-matrix metalloprotease
Puma	=	modulator apoptoze, ki ga poviša p53; p53 up-regulated modulator of apoptosis
MMTV-PyMT	=	model metastazirajočega raka mlečnih žlez; mouse mammary tumor virus-polyoma middle T
ras	=	podganji sarkom; rat sarcoma'
REF	=	relativne enote fluorescence
RING	=	really interesting new gene
RIP	=	protein, ki sodeluje z receptorjem; receptor interacting protein
RIPA	=	radioimuno precipitacijski test; radioimmunoprecipitation assay
RIP1-Tag2 (RT2)	=	mišji model nevroendokrine neoplazije trebušne slinavke, rat insulin promoter-T antigen
ROS	=	reaktivne kisikove zvrsti; reactive oxygen species
rcf	=	relativna centrifugalna sila; relative centrifugal force
RPMI	=	Roswell Park Memorial Institute
receptor FN14	=	z rastnim dejavnikom induciran protein zgodnjega odziva; fibroblast growth factor-inducible immediate-early response protein 14, tudi Tweak-receptor
SMAC	=	drugi mitohondrijski aktivator kaspaz; second mitochondria-derived activator of caspase
sod.	=	sodelavci
SV40	=	simianski vakuolizirajoči virus 40; simian vacuolating virus 40
TAMs	=	s tumorjem povezani makrofagi; tumor associated macrofages
Tag	=	T-antigen
tBid	=	skrajšana oblika molekule Bid; truncated Bid
TEMED	=	N, N, N', N'-tetrametilendiamin
TIMP	=	tkivni inhibitor metaloproteaz; tissue inhibitor of metaloproteases
TNF	=	dejavnik tumorske nekroze; tumor necrosis factor
TNF-R1	=	receptor tipa 1 za TNF; tumor necrosis factor receptor 1
tPA	=	tkivni aktivator plazminogena; tissue plazminogen activator
TRADD	=	na receptor TNF vezan protein, ki vsebuje domeno DD; TNF receptor-associated protein with death domain
TRAF-2	=	dejavnik 2, povezan s TNF-receptorjem; TNF-receptor-associated factor-2 apoptosis-inducing ligand
TRAIL	=	TNF-ju soroden ligand, ki sproža apoptozo; TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R	=	TRAIL receptor
TWEAK	=	TNF-ju podoben šibek sprožitelj apoptoze; TNF-related weak inducer of apoptosis
UPA	=	urokinazni aktivator plazminogena; urokinaze plazminogen activator
UPAR	=	receptor urokinaznega aktivatorja plazminogena;

		urokinaze plazminogen activator receptor
VDAC	=	napetostno odvisni anionski kanalček; voltage-dependent anion channel
VEGF	=	žilni endotelijski rastni dejavnik; vascular endothelial growth factor
XIAP	=	na kromosom X vezan inhibitor apoptoze; X-linked inhibitor of apoptosis
Z-FR-AMC	=	N-benzoiloksikarbonil-fenilalanil-arginil-7-amino-4-metilkumarin
Z-RR-AMC	=	N-benzoiloksikarbonil-arginil-arginil-7-amino-4-metilkumarin
Z-VAD-FMK	=	N-benziloksikarbonil-valil-alanil-aspartil-fluorometilketon

Standardne oznake aminokislin

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

1 Uvod

1.1 Katepsini

Ime katepsin je zloženka iz starogrških besed *kata* in *hepsein*, kar pomeni prebaviti. V izvirniku, v tridesetih letih prejšnjega stoletja, je zajemala kisle proteaze želodčne sluznice [1]. Pojem katepsin danes obsega proteaze iz treh različnih mehanističnih razredov (s tremi različnimi katalitskimi mehanizmi): serinske proteaze (katepsina A in G), aspartatne proteaze (katepsina D in E) in cisteinske proteaze. Z izjemo katepsinov E in G se večina katepsinov nahaja v lizosomih [2].

1.2 Cisteinski katepsini

Poznamo 19 cisteinskih katepsinov živalskega izvora, od tega 11 pri človeku (B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W) [3-5]. Spadajo v skupino papainu podobnih encimov in jih uvrščamo v klan CA in družino C1A (klasifikacija po MEROPS-u [6]). V aktivnem mestu se nahajata aminokislinska preostanka cistein in histidin. Za svoje optimalno delovanje potrebujejo reducirajoče, rahlo kislo okolje, ki ga najdemo v lizosomih oziroma endosomih [7].

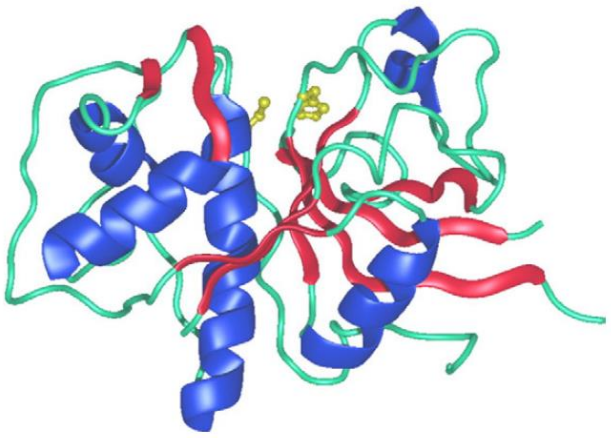
Večina katepsinov ima endopeptidazno aktivnost, nekateri med njimi pa so eksopeptidaze. Pri slednjih strukturne posebnosti (katepsin C), karboksimonopeptidaze (katepsin X), aminomonopeptidaze (katepsin H) in karboksidipeptidaze (katepsin B). Katepsina B in H imata poleg eksopeptidazne tudi endopeptidazno aktivnost [8, 9]. Omejujejo dostop substrata do vezavnega mesta na encimu. Eksopeptidaze so lahko aminodipeptidaze.

Tabela 1: *Poimenovanje in katalitske lastnosti človeških lizosomskih cisteinskih proteaz katepsinov*. Povzeto po [8, 9].

ime	sinonim	vrsta peptidazne aktivnosti
katepsin L	/	endopeptidaza
katepsin V	katepsin L2, U	endopeptidaza
katepsin S	/	endopeptidaza
katepsin K	katepsin O, O2	endopeptidaza
katepsin F	/	endopeptidaza
katepsin B	katepsin B1	endopeptidaza in karboksidipeptidaza
katepsin H	katepsin I	endopeptidaza in aminomonopeptidaza
katepsin X	katepsin Z, P, Y	karboksimonopeptidaza
katepsin C	dipeptidil peptidaza I,katepsin J	aminodipeptidaza
katepsin W	/	ni znano
katepsin O	/	ni znano

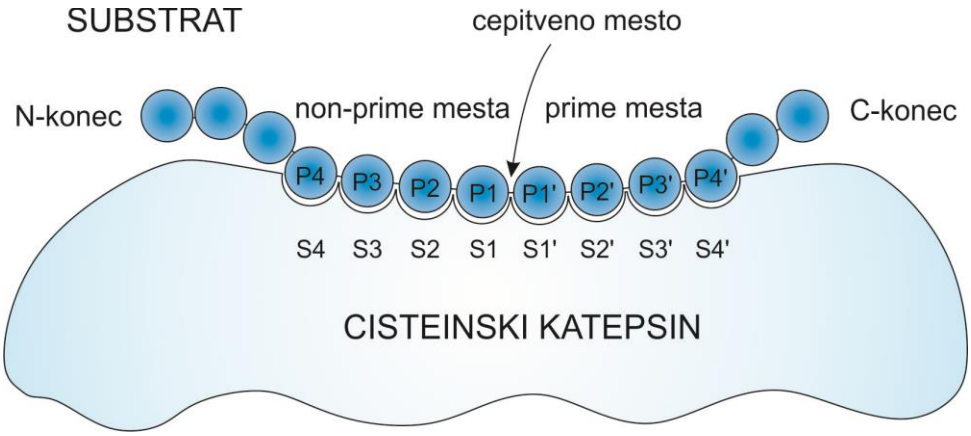
1.3 Struktura katepsinov in substratna specifičnost

Katepsini so majhne molekule velikosti približno 24-30 kDa, z izjemo katepsina C, ki je približno 200 kDa velik tetramer. Sestavljeni so iz dveh domen, L (left) in R (right). Leva (L) domena je sestavljena iz treh alfa vijačnic, desna (R) pa iz antiparalelne beta ploskve z značilno sodčku podobno strukturo. Aktivno mesto se nahaja na vmesni površini obeh domen in ima obliko črke V. V sredini reže sta aminokislini v aktivnem mestu, Cys25 in His159 (papainsko štetje). Cys25 se nahaja v levi domeni na N-terminalnem delu alfa vijačnice, His159 pa na desni domeni na nasprotni strani žepa [5]. V aktivni obliki encima sta oba aminokislinska ostanka nabita in tvorita tiolat-imidazolni ionski par.



Slika 1: *Zvitje zrele oblike cisteinskega katepsina – endopeptidaze.* Prikazana je struktura dvoverižne oblike nativnega katepsina L. Alfa vijačnice in beta ploskve so označene modro oz. rdeče. Z rumeno sta v aktivnem mestu označena Cys25 in His159. Povzeto po [7].

Katepsini so proteaze s široko substratno specifičnostjo. Mesta navzgor in navzdol od cepitvenega mesta poimenujemo v skladu s Schechter-Bergerjevo nomenklaturo, kot je prikazano na sliki 2. Zanje velja, da cepijo substrate posebej učinkovito, kadar je na mestu cepitve določen tip aminokislinskega preostanka, ne zahtevajo pa določene aminokisline ali točno določenega zaporedja. Zaradi strukture aktivnega mesta specifičnost cistenskih katepsinov določajo predvsem substratna vezavna mesta S1, S2 in S1' [10]. Med njimi ima najpomembnejšo vlogo mesto S2, ki edino oblikuje dejanski žepek za vezavo substrata. Tukaj se lahko vežejo hidrofobni ali aromatski aminokislinski preostanki. Prav tako tudi mesti S1 in S1' preferirata vezavo hidrofobnih aminokislinskih preostankov [11-13].



Slika 2: *Shematska predstavitev vezave proteinskega substrata na cisteinski katepsin po Schechterju in Bergerju.* Površino katepsina, na katero se veže stranska veriga enega aminokislinskega preostanka substrata, imenujejo substratno vezavno mesto. Ta so označena s S1 do Sn v smeri proti N-koncu (non-prime S mesta) in S1' do Sn' v smeri proti C-koncu (prime S mesta). Aminokislinski preostanki substrata so prav tako ustrezno označeni s P1-Pn in P1'-Pn'. Povzeto po [10, 14].

1.4 Procesiranje in aktivacija katepsinov

Podobno kot večina proteaz se tudi katepsini sintetizirajo kot preproencimi. Signalni prepeptid se odstrani med prehodom v endoplazemski retikulum. Od tam potujejo v golgijev aparat, kjer se usmerijo v zgodnje endosome. Prokatepsini se nato z odcepitvijo propeptida procesirajo v aktivno obliko v kislem okolju poznih endosomov ali lizosomov.

Propeptid omogoča pravilno zvitje proteina in služi tudi kot inhibitor proteolitične aktivnosti proencima [15]. Ovira vezavo substrata v aktivno mesto, ki je že oblikovano v proencimu tako, da teče preko njega v nasprotni smeri kot substrat. Propeptid se lahko odstrani z drugimi proteazami, ki so že aktivne v lizosomu (katepsin D in cisteinske proteaze), ali pa se odstrani avtokatalitično. Kisel pH v lizosomu/endosomu oslabi interakcije med propeptidom in encimom. Zaradi tega imajo že nekateri proencimi, npr. prokatepsina B in L, nizko katalitično aktivnost, ki je ravno zadostna za avtokatalitično aktivacijo [4, 16]. Prav tako prisotnost glikozaminoglikanov v lizosomih še pospeši ta proces [17]. Na ta način se lahko odcepi propeptid endopeptidaz, medtem ko eksopeptidaze za aktivacijo potrebujejo cepitev z drugimi molekulami [5, 18].

1.5 Uravnavanje aktivnosti katepsinov

Proteoliza je pomemben proces, ki mora biti natančno nadzorovan in uravnavan. Neželena aktivnost katepsinov se regulira na več ravneh: kot že omenjeno, se sintetizirajo

v obliki neaktivnih proencimov, nahajajo se v lizosomih ali drugih organelih, ki so od citosola ločeni s polprepustno membrano in optimalno delujejo v kislem območju pH [5, 19].

Zunaj lizosomov se katepsini pri nevtralnem pH sčasoma ireverzibilno inaktivirajo. Pride do deprotonacije histidinskega preostanka His159 (papainsko štetje), ki predstavlja sestavni del katalitskega para v aktivnem mestu encima. Prekinejo se nekatere elektrostatske interakcije in poruši se terciarna struktura. S tem se encim ireverzibilno razvije [20, 21]. Hitrost teh procesov je odvisna od posameznega katepsina. Katepsin L je v nevtralnem pH aktiven nekaj minut, katepsini B, K in H pa do ene ure [3]. Izjema je katepsin S, ki je stabilen v nevtralnem in tudi rahlo bazičnem okolju pri pH vrednostih nad 8 [22]. Različni ligandi, kot so substrati in glikozaminoglikani, lahko stabilizirajo te proteaze in s tem še podaljšajo njihovo aktivnost izven lizosomov [3, 4].

Aktivnost cisteinskih katepsinov uravnavajo tudi endogeni inhibitorji, ki so najpomembnejši mehanizem njihove regulacije.

1.5.1 Endogeni inhibitorji cisteinskih katepsinov

Večina endogenih inhibitorjev je kompetitivnih, kar pomeni, da je osnova njihovega delovanja vezava v aktivno mesto, s čimer onemogočijo vezavo substrata. Celice pred nezaželenim delovanjem katepsinov ščiti splošen inhibitor iz krvne plazme, α2 makroglobulin, ter inhibitorji iz naddružine cistatinov. Te na podlagi sekvenčne homologije delimo v štiri družine. V prve tri uvrščamo inhibitorne proteine stefine, cistatine in kininogene [23-25]. V četrto skupino sodijo neinhibitorni homologi cistatinov, kot so fetuini in s histidinom bogati glikoproteini [26, 27].

Stefini so enoverižni, neglikozilirani proteini, veliki približno 11 kDa [24]. Nahajajo se znotraj celice, najdemo pa jih tudi v telesnih tekočinah [28]. Cistatini so enoverižni proteini, veliki približno 13 kDa, za razliko od stefinov pa imajo signalno zaporedje za izločanje iz celice. Kininogeni so zunajcelični večfunkcijski glikoproteini, so enoverižni z več domenami za vezavo cisteinskih proteaz. Med ostalimi inhibitorji cisteinskih proteaz najdemo tiropine (fragment p41 invariantne verige MHC razreda II) in serpine, inhibitorje serinskih proteaz [3, 7].

1.6 Fiziološka vloga cisteinskih katepsinov

Z izjemo katepsinov S, W in K so te cisteinske proteaze splošno prisotne v vseh vrstah celic in tkiv [29, 30]. Sprva so jih povezovali le z razgradnjo proteinov v lizosomih, kar je tudi v skladu z njihovo široko substratno specifičnostjo. S tem je povezana tudi njihova vloga pri procesih, kjer je potrebno učinkovito procesiranje, kot je npr. MHC-II posredovano predstavljanje procesiranih antigenov.

Dolgo je veljalo, da je prisotnost katepsinov omejena na endosomski/lizosomski sistem. Nedavne študije pa so pokazale, da se katepsini lahko nahajajo in so omejen čas aktivni tudi izven lizosomov v citosolu ali v zunajceličnem prostoru. Tako so katepsini prisotni v jedru, citosolu, na plazemski membrani in v zunajceličnem matriksu [31-36]. Udeleženi so pri stopenjskem procesiranju invariantne verige, diferenciaciji keratinocitov, aktivaciji prohormonov, preoblikovanju kostnine in drugih vrst zunajceličnega matriksa, signalizaciji v jedru in v drugih procesih [29, 34]. Iz tega nabora funkcij je razvidno, da lahko imajo tudi proteaze s široko substratno specifičnostjo zelo specifične vloge, kar pa predvsem velja za katepsine z bolj omejenim izražanjem v določenih tipih celic ali tkiv (npr. katepina S in W v imunskih celicah in katepsin K v osteoklastih). Specifične funkcije pa pravtako opravljajo tudi splošno prisotni katepsini (npr. katepsin L pri

morfogenezi lasnih mešičkov). Podroben pregled fizioloških vlog katepsinov in njihove lokalizacije je v tabeli 2.

Tabela 2: *Glavne specifične fiziološke vloge glavnih katepsinov in njihova lokalizacija.* Povzeto po [29, 34].

ime	fiziološka vloga	lokalizacija
katepsin L	procesiranje in predstavljanje antigenov (razgradnja invariantne verige MHC razreda II) morfogeneza lasnih mešičkov uravnavanje celičnega cikla	splošno prisoten
katepsin V	vloga pri pozitivni selekciji limfocitov T procesiranje in predstavljanje antigenov (razgradnja invariantne verige MHC razreda II)	priželjc, moda, epitelij mrežnice, veznice in kože
katepsin S	procesiranje in predstavljanje antigenov (razgradnja invariantne verige MHC razreda II) arterogeneza in angiogeneza	alveolarni makrofagi, moda, epitelijske celice, $CD4^+$ celice T
katepsin K	preurejanje in resorpcija kosti procesiranje tiroglobulina	osteoklasti, večina epitelijev
katepsin F	razgradnja proteinov	srce, skeletne mišice, možgani, moda, jajčniki
katepsin B	imunski odgovor, procesiranje prekurzorskega proteina amiloida β (APP) in tiroglobulina	splošno prisoten
katepsin H	procesiranje in predstavljanje antigenov (razgradnja invariantne verige MHC razreda II)	možgani, ledvice, jetra
katepsin X	neproteolitična pri adheziji celic	v skoraj vseh tkivih
katepsin C	aktivacija granulocitnih serinskih proteaz	splošno prisoten
katepsin W	delovanje imunskih celic	vranica, citotoksične celice T, naravne celice ubijalke
katepsin O	razgradnja proteinov	v skoraj vseh tkivih

1.7 Zunajcelična vloga cisteinskih katepsinov

Ena izmed pomebnejših zunaj-lizosomalnih vlog cisteinskih katepsinov je njihovo delovaje v zunajceličnem prostoru, kjer sodelujejo pri procesiranju prohormonov, celjenju ran in proteolitični razgradnji celičnega matriksa [29]. Tako so katepsina B in L že v

osemdesetih letih prejšnjega stoletja povezali s homeostazo kostnine. Kasnejše odkritje katepsina K, ki ga osteoklasti v velikih količinah izločajo v resorbcijske lakune v kostnini, pa je pokazalo, da je ta cisteinska proteaza celo ključna za razgradnjo organskega matriksa kosti in hrustanca [37, 38]. Prej omenjene katepsine izločajo tudi epitelijske celice ščitnice, ki sproščajo tiroidne hormone iz zunajcelično prisotnega tiroglobulina.

Največkrat pa zunajcelična lokalizacija in proteazna aktivnost cisteinskih katepsinov ni povezana s fiziološkimni procesi, ampak s patološkimi stanji [39]. Motnje v normalnem delovanju cisteinskih katepsinov zaradi spremenjenega (največkrat prekomernega) izločanja katepsinov v zunajcelični prostor vodijo v različna bolezenska stanja, kot so revmatoidni artritis, osteoartritis, osteoporoza in rak [5, 40, 41]. V biologiji rakastih obolenj v zadnjem času narašča zanimanje za cisteinske katepsine, saj so jih začeli povezovati z zunajceličnimi aktivnostmi, ki vzpodbujajo širjenje tumorjev [42-44].

1.7.1 Rakasta obolenja in tumorsko mikrookolje

Glavne značilnosti rakastega obolenja lahko opišemo kot različne biološke sposobnosti, ki jih pridobijo tumorske in z njimi povezane celice. Tumor v svojem večstopenjskem razvoju sproži proliferativno signalizacijo, se izogiba zaviralcem rasti, obide mehanizem celične smrti, pridobi proliferativno nesmrtnost, sproži angiogenezo in aktivira invazijo ter metastaziranje. Obenem reprogramira energetski metabolizem in se izogiba napadu imunskega sistema [42-45]. Pridobitev teh lastnosti temelji na kroničnem vnetju, ki je prisotno v tumorjih, in genomski nestabilnosti tumorskih celic [45].

V tumorju je kompleksen nabor rekrutiranih nespremenjenih celic strome, ki skupaj z rakastimi celicami ustvarjajo tumorsko mikrookolje [45, 46]. Sestavljajo ga endotelijske in mezenhimalne matične celice, periciti, fibroblasti in različne celice, ki izvirajo iz kostnega mozga (*angl*. bone marrow derived cells – BMDC). Med njimi so makrofagi, monociti, nevtrofilci, mast celice, zaviralne celice mileloidnega izvora (*angl*. myleloid cell-derived suppresor cells), limfociti in mezenhimalne matične celice [47].

BMDC v tumorju ustvarjajo kronično vnetje. V kombinaciji z nižjim pH-jem zaradi kopičenja kislih metabolnih produktov, nizko perfuzijo, nizkim parcialnim tlakom kisika in posledično nekrozo sredice tumorja [48] takšni pogoji omogočajo in/ali povečajo tumor-promotorske učinke rekrutiranih celic strome [49-51].

1.7.2 Proteoliza v tumorskem mikrookolju

Proteaze so včasih smatrali le kot končni člen pri razgradnji odpadnih proteinov in za razgrajevalce zunajceličnega matriksa. Danes vemo, da imajo kompleksno in razvejano funkcijo, ki prispeva k povečanju tumorigenosti. Mnoge ključne značilnosti agresivnih tumorjev, kot so invazija tumorskih celic v stromo, angiogeneza in metastaziranje, so neposredna posledica proteolitske aktivnosti [47]. Zato ne preseneča, da je v tumorskem mikrookolju prisoten širok nabor različnih proteaz. Njihova aktivnost in izločanje je v primerjavi z normalnim fiziološkim stanjem spremenjena, največkrat povišana. Proteaze so vključene v de/aktivacijo drugih proteaz ali signalnih molekul preko specifičnih cepitev svojih tarčnih substratov [46, 47].

1.7.2.1 Cepitev zunajceličnih domen membranskih proteinov (*angl*. shedding)

Sproščanje zunajceličnih proteinskih domen s specifično omejeno proteolizo v angleškem jeziku imenujemo »shedding«. Proteaze, ki imajo tako aktivnost, pa imenujemo »sheddases«. Takšne cepitve lahko regulirajo večino celičnih mehanizmov, v katere so vključeni transmembranski proteini. Zato je proces pritegnil pozornost celičnih biologov,

ki se ukvarjajo s celično adhezijo in transmembransko signalizacijo, lastnostima, ki sta ključni pri razumevanju rakavih obolenj [52, 53].

Večina proteaz, vključenih v sproščanje zunajceličnih delov membranskih proteinov, pripada dvema družinama od cinka odvisnih proteaz: metaloproteaze celičnega matriksa (*angl*. matrix metalloproteinase – MMPs) in metaloproteaze disintegrinskega tipa (*angl*. a disintegrin and metalloproteinase – ADAMs) [52]. Poleg teh dveh družin med proteaze z opisano aktivnostjo prištevamo tudi nekatere serinske proteaze (nevtrofilna elastaza, katepsin G, preprotein konvertaza [54, 55]). Do sedaj še ni bilo poročil o podobni aktivnosti cisteinskih katepsinov, z izjemo *in vitro* procesiranja E-kadherina (substrat katepsinov B, L in S) [43].

Posledica cepitev zunajceličnih domen ni samo zmanjšanje števila proteinov na površini celic, saj lahko tudi sproščene topne zunanje domene sodelujejo v avtokrinem ali parakrinem signaliziranju. Že dolgo je znano, da encimi, ki cepijo zunajcelične domene, na ta način sproščajo rastne dejavnike, ki so vezani na membrane (npr. epidermalni rastni dejavnik – EGF in dejavnik tumorske nekroze-α −TNF-α) [56]. Prav tako lahko po cepitvah membranskih receptorjev nastale odceljene domene modulirajo funkcijo ligandov (delujejo kot agonisti ali antagonisti). To bi lahko razložilo, zakaj so produkti cepitve zunajceličnega dela receptorja HER2 pri raku dojke povezani z bolj agresivnim fenotipom [57].

Odcepitev zunanjih delov membranskih pa lahko spremeni tudi signalizacijo preko znotrajceličnega dela, ki ostane v membrani po cepitvi. Obstajajo poročila, da se znotrajcelični del HER4 po dodatni cepitvi v membrani prenese v jedro, kjer vpliva na prepisovanje genov, vendar je ta vloga še vedno nejasna [58]. Prav tako se iz znotrajceličnih domen adhezijskih molekul PECAM-1 in CD44 loči fragment, ki gre v jedro in vpliva na transkripcijo [59]. Spremembe v znotrajcelični signalizaciji pa niso omejene samo na izražanje genov. Tako na primer nekateri tirozin-kinazni receptorji iz družine receptorjev epidermalnega rastnega dejavnika − EGFR po odstranitvi zunajcelične domene postanejo konstitutivno aktivni in imajo tako zvečan signalizacijski potencial [60, 61].

1.7.3 Katepsini in tumorsko mikrookolje

Številne študije so pokazale povišano izražanje, aktivnost in spremenjeno lokalizacijo katepsinov v različnih tipih rakastih obolenj, kar jih povezuje z nastankom in širjenjem tumorjev. Povečano izražanje katepsinov je bilo opaženo tako v tumorjih mezenhimalnega kot tudi epitelijskega izvora. To vključuje melanom, rak debelega črevesa, pljuč, možganov in dojke [39, 43, 44, 47, 62-65]. Izražanje določenih katepsinov (katepsin K in S) ima celo prognostično vlogo [40, 62, 64]. Vedno več raziskav povezuje katepsina B in L ter v manjši meri katepsine S, H, X in K s proteolitsko aktivnostjo, ki povečuje tumorigenost [29, 65-67].

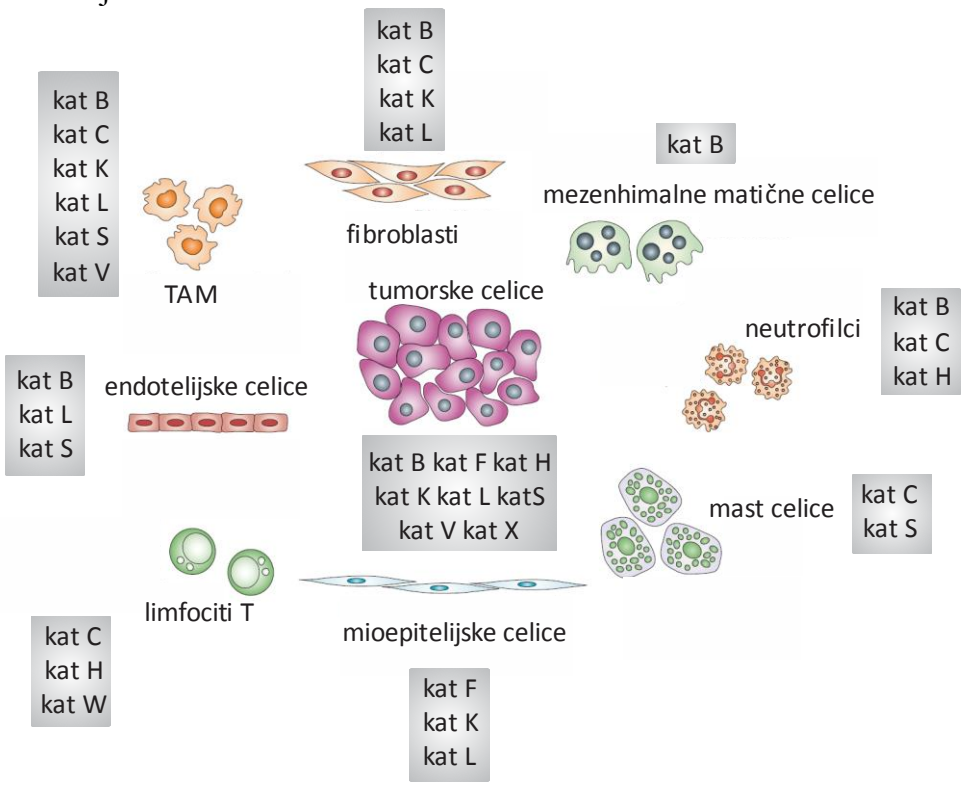
1.7.4 Povišano izražanje katepsinov

Spremembe izražanja cisteinskih katepsinov so posledica različnih mehanizmov. Lahko pride do sprememb izražanja genov za katepsine, nastanka novih transkripcijskih različic in spremenjene transkripcije [65]. V tumorskih celicah najdemo transkripcijske različice katepsinov B in L kot posledico aktivacije alternativnih promotorjev ali alternativnega izrezovanja oziroma spajanja intronov in eksonov. Tako se na primer alternativni krajši prepis katepsina B hitreje prevaja v proteinski zapis, kar omogoči povišano izražanje [68]. Dodatno se lahko izražanje katepsina B in L regulira s povečano stabilnostjo njune mRNA [36].

Kljub dosedanjim spoznanjem na tem področju ostaja še veliko nepojasnjenega. Verjetno obstajajo še dodatni do sedaj nepoznani mehanizmi, ki izražanje katepsinov povečajo. To omogoča, da imajo posamezni katepsini in njihove transkripcijske različice specifične vloge v različnih stopnjah razvoja tumorja in v različnih tipih celic.

1.7.5 Izločanje katepsinov v tumorskem mikrookolju

Katepsine izločajo skoraj vse vrste celic v tumorskem mikrookolju. Čeprav rakaste celice in druge celice strome izločajo katepsine, so njihov glavni vir imunske celice, predvsem alternativno aktivirani makrofagi, imenovani TAMs (*angl.* – tumor associated macrophages), ki se mobilizirajo v maso tumorja, kjer se polarizirajo v tumor-promotorske oblike. Na sliki 3 je prikazano, katere celice prispevajo k izločanju in katere katepsine izločajo.



Slika 3: *Cisteinske katepsine izločajo tumorske in s tumorjem povezane celice.* Katepsini, ki jih izločajo, so navedeni zraven tipa celic. Prirejeno po [47, 65].

Katepsini se prenesejo v mikrookolje tumorja večinoma v obliki proencimov (pregledano v [65]). Klasično katepsini iz ER potujejo v GA, kjer se visokomanozni glikani fosforilirajo v manozo-6-fosfat, kar jih usmeri v zgodnje endosome, kjer so prisotni manoza-6-fosfatni receptorji. Pri povišanjem izražanju pa del katepsinov ne dobi manoza-6-fosfatnih modifikacij v GA in se z eksocitozo izloči iz celice. Tam prisotni aktivni katepsini in druge proteaze (urokinazni plazminogenski aktivator – uPA, tkivni plazminogenski aktivator – tPA in elastaza) v zunajceličnem matriksu (*angl*. extracellular matrix – ECM) aktivirajo neaktivne prooblike katepsinov [47]. Prav tako lahko tudi zunaj celic pride do avtoaktivacije endopeptidaznih katepsinov, k čemur pripomore zakisanost tumorjev in prisotnost glikozaminoglikanov in drugih negativno nabitih polimerov [17]. V ECM pa se sproščajo tudi aktivne oblike katepsinov. Te lahko izvirajo iz poznih endosomov ali lizosomov, ki se v s Ca^{2+} posredovani fuziji zlivajo s plazemsko

membrano [69]. Tako zrel katepsin B izločajo številne tumorske celice, aktivirani makrofagi pa katepsine B, K, L in S [70, 71].

Posamezni katepsini se lahko prenesejo tudi na membrane tumorskih celic z asociacijo na vezavne partnerje v določenih tipih membranskih mikrodomen. Katepsin B je do sedaj edini katepsin, za katerega so neposredno pokazali, da se lahko nahaja v takšnih membranskih področjih. Našli so ga v kaveolah raka debelega črevesa, kjer se veže na lahko verigo aneksin II heterotetramera (AIIT) [72]. Kaveole so podvrsta lipidnih raftov, ki vsebujejo strukturno molekulo kaveolin in imajo veliko proteolitsko kapaciteto. Prenos katepsina B na membrano se zgodi v poznih edenomih in zgodnjih karcinomih, izločanje pa regulira aktivnost K-ras [73].

1.7.5.1 S tumorjem povezani makrofagi (*angl*. tumor associated macrophages – TAMs)

Makrofagi so imunske celice, ki spadajo v skupino celic, ki izhajajo iz kostnega mozga (*angl*. bone marrow derived cells – BMDC). Nahajajo se v vseh tipih tkiv. Vzpostavljajo homeostazo z zmanjševanjem infekcij, akutnih vnetij in regulirajo metabolne odgovore na stres [74]. Za izvajanje tako širokega nabora funkcij morajo biti zelo prilagodljivi, ta lastnost pa povezuje makrofage tudi s promocijo nekaterih patogenih stanj, med drugim tudi raka. Med razvojem tumorja se makrofagi množično infiltrirajo in lahko predstavljajo tudi do 50% njegove mase. V tem okolju se lahko polarizirajo v dve različni populaciji, ki sta klasično ali alternativno aktivirani, vendar ta mehanizem še vedno ni zadovoljivo pojasnjen [75]. Prva skupina je rezultat celično-posredovanega imunskega odgovora (aktivacija z IFN-γ, TNF-α). Takšni makrofagi delujejo tumor-supresorsko. Alternativna aktivacija pa poteče s stimulacijo z interlevkinom 4 in/ali 13. Tako aktivirane makrofage imenujemo TAMs (*angl*. tumor associated macrofages). Ti promovirajo angiogenezo, invazivnost in metastaziranje ter zmanjšujejo normalni imunski odgovor, ki ga izzovejo tumorske celice (pregledano v [74-76]). TAM so del mehanizma, ki vzdržuje kronično vnetje v tumorskem mikrookolju, kar je eden izmed temeljev razvoja in napredovanja tumorja [45].

S tumorjem povezani makrofagi so tudi glavni vir cisteinskih katepsinov B in S [77]. V živalskem transgenem modelu raka trebušne slinavke (RIP1-Tag2) ter raku mlečne žleze in njenih metastazah v pljučih (PyMT) so Gocheva in sod. pokazali, da sta ta dva katepsina iz TAMs kritična za napredovanje tumorja, angiogenezo in metastaziranje *in vivo* [77]. Prav tako je inhibicija katepsinske aktivnosti, ki izvira iz makrofagov, v kombinaciji s klasično kemoterapijo povečala učinkovitost kemoterapevtika taksola v modelu raka dojke [78].

1.7.6 Vloga katepsinov v zunajcelični proteolizi

Povišano izražanje katepsinov v tumorjih kaže na udeleženost teh primarno lizosomskih proteaz v encimski mreži tumorskega mikrookolja. Čeprav znotraj lizosomov zaradi denaturacijskih pogojev in nizkega pH cepijo vrsto proteinov s široko specifičnostjo, pa lahko v manj ugodnih pogojih pokažejo visoko specifičnost za izvenlizosomske substrate [79]. Kljub temu, da imajo kratko življenjsko dobo v zunajceličnem prostoru, lahko konstantno izločanje katepsinov v pogojih zakisanja okolja omogoči, da prevzamejo veliko vlog v nevtralnem pH delujočih serinskih in metaloproteaz, za katere je znano, da uspešno razgrajujejo ECM [80].

Katepsini tako sodelujejo v številnih stopnjah prehoda iz premalignega v maligno stanje. Vključeni so v spremembe proliferacije in apoptoze, angiogenezo, povišanje migracije, invazije ter metastaziranja [39, 44, 63, 65].

1.7.6.1 Mehanizmi, preko katerih katepsini pospešujejo tumorigenezo

a) degradacija komponent zunajceličnega matriksa

Katepsini lahko razgrajujejo komponente zunajceličnega matriksa, vključno z bazalno membrano. Cepitve komponent se odvijajo zunajcelično ali v lizosomih/endosomih preko endocitoze ECM. Tako katepsini omogočajo prodor tumorskih celic v okoliško tkivo in metastaziranje preko bazalne membrane. Zavedati pa se moramo, da za nekatere substrate ostajajo samo *in vitro* dokazi o njihovi razgradnji, *in vivo* validacije, ki bi pripomogle k globljemu razumevanju fiziološkega pomena cisteinskih katepsinov, pa še vedno niso bile izvedene [81-84].

Tabela 3: *Substrati cisteinskih katepsinov iz ECM*. Povzeto po [81-84].

intersticijski proteini ECM	**katepsin**
agrekan	katepsin B, K, L, S
kolagen tipa I in II	katepsin B, K, L, S
elastin	katepsin K, L, S, V
fibronektin	katepsin B, L, S
osteokalcin	katepsin B, H, K, L, S
osteonektin	katepsin B, K
proteini bazalne membrane	
perlekan	katepsin B, L
nidogen	katepsin S
kolagen tipa IV	katepsin B, S
tenascin C	katepsin B
laminin	katepsin B, L, S

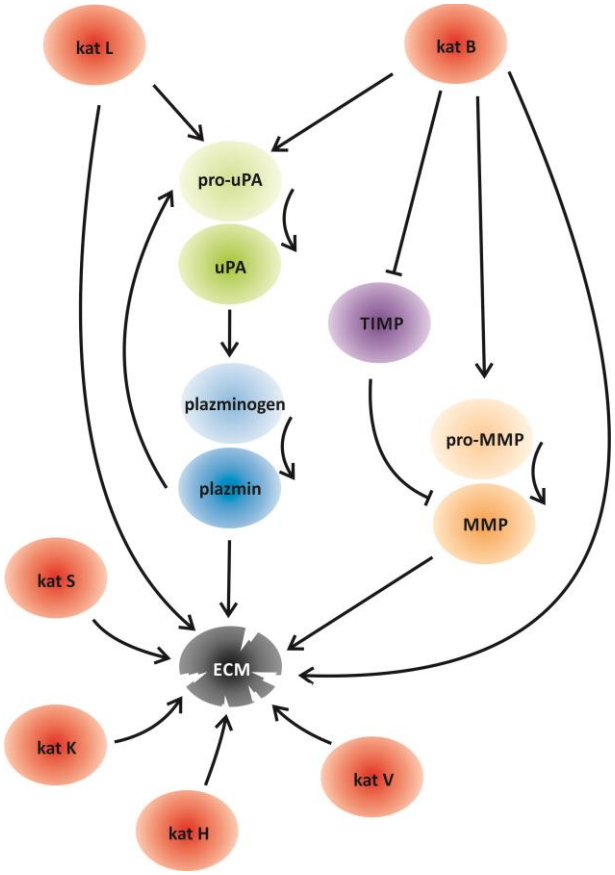
Angiogeneza je zelo pomembna za rast tumorjev in oskrbovanje tumorske mase s hranili. Zanjo je potrebno preoblikovanje žilnega sistema z endotelijsko proliferacijo in razgradnjo ECM. Katepsini B, L in S z razgradnjo ECM in bazalne membrane [81-83] pospešijo tvorbo novih žil. Med neoplastično progresijo rakasto tkivo izzove t. i. angiogenski preklop (*angl*. angiogenic switching), ki ravnovesje med antiangiogenskimi (endostatin, angiostatin) in angiogenskimi dejavniki (žilni endotelijski rastni dejavnik − VEGF) prevesi v prid slednjih. Študije kažejo, da katepsini lahko sproščajo tako proangiogenske kot antiangiogenske dejavnike iz ECM [39, 85-87], zato na tem področju ostajajo še številne nejasnosti glede njihove vloge pri nastanku novih žil.

b) regulacija proteolitskih kaskad

Katepsini neposredno aktivirajo prekurzorje serinskih in metaloproteaz ter tako pospešijo proteolizo v tumorskem mikrookolju. Katepsina B in L lahko aktivirata pro-urokinazni plazminogenski aktivator (pro-UPA) [88, 89]. Pro-UPA se izloča kot proencim v zunajcelično, kjer se veže na UPAR (receptor urokinaznega plazminogenskega aktivatorja). Aktivni UPA pretvarja plazminogen v plazmin, ki lahko razgrajuje številne komponente ECM. Plazmin aktivira tudi številne metaloproteaze matriksa - MMP-je in povratno aktivira nove pro-UPA molekule, kar še poveča razgradnjo ECM [47]. Nekatere MMP-je lahko katepsini aktivirajo celo neposredno. Tako katepsin B aktivira proMMP-2

in MMP-3 [90]. Aktivnost metaloproteaz pa še dodatno poveča z razgradnjo njihovih inhibitorjev TIMP-1 in -2 [91].

Poudariti pa je potrebno, da poznani mehanizmi degradacije ECM preko neposredne cepitve in/ali aktivacije drugih proteaz s cisteinskimi katepsini trenutno temeljijo le na *in vitro* raziskavah. Shematsko so prikazani na sliki 4.



Slika 4: *S katepsini posredovana cepitev ECM*. Povzeto po [84, 88-90].

c) cepitev adhezijskih proteinov

Do sedaj je le malo znanega o drugih mehanizmih pospeševanja tumorigeneze zaradi zunajcelične aktivnosti katepsinov. Poznan je le en *in vitro* membranski substrat, E-kadherin, ki ga cepijo katepsini B, L in S [43]. Ta protein je sestavni del celičnih stikov, zato cepitev pripomore k hitrejšemu sproščanju tumorskih celic v okoliško tkivo [92].

1.7.7 Živalski tumorski modeli

Študija tumorigeneze na živalskih transgenih modelih raka, ki so bili križani z linijami z izbitimi geni za cisteinske katepsine, je omogočila podrobnejši vpogled v funkcije teh cisteinskih proteaz *in vivo*. Ti modeli so model nevroendokrine neoplazije trebušne slinavke (RIP1-Tag2) [93], model skvamoznega kožnega in cervikalnega raka (K14-HPV16) [94] in model metastazirajočega raka mlečnih žlez (MMTV-PyMT) [95]. V nasprotju s človeškimi karcinomi, ki jim lahko sledimo šele po detekciji v pacientih (to je največkrat v srednji in pozni fazi razvoja tumorja), omogočajo spremljanje tudi najbolj zgodnjih faz maligne transformacije in neoplazije.

1.7.7.1 Model nevroendokrine neoplazije trebušne slinavke (RIP1-Tag2) (RT2)

Eden izmed prvih modelov človeške malignosti je bil transgeni model nevroendokrine neoplazije trebušne slinavke (RIP1-Tag2 ali RT2). Tukaj je izražanje onkogena (SV-40 veliki T-antigen (Tag)) omejeno na β-celice, ki proizvajajo inzulin v Langerhansovih otočkih trebušne slinavke. Izražanje onkoproteina, ki inaktivira tumorsupresorska proteina pRB in p53, je omejeno zaradi njegove kontrole preko podganjega inzulinskega promotorja (RIP) II. Izražanje Tag tako sovpada z začetkom nastajanja inzulina v β-celicah, ko so zarodki stari 9 dni, in traja skozi vso odraslo dobo. V starosti 4-6 tednov se posameznim otočkom poviša proliferativni indeks. Nato začnejo pri 6-8 tednih nekateri hiperplastični otočki kazati povišano angiogenezo. Po 12-14 tednih pa 20% angiogenskih otočkov razvije ožiljene tumorje z različnim invazijskim potencialom. Zmanjšanje izražanja E-kadherina je prav tako pozitivno povezano s povečano invazijo tumorjev [93].

RT2 so križali z linijami, ki so imele izbite gene za posamezne katepsine [43]. Namen te študije je bil proučitev vloge katepsinov v tem modelu tumorigeneze. Tumorji brez katepsinov B, L in S so imeli manjši volumen, povečano apoptozo, pri izbitju gena za katepsina B in S je prišlo do počasnejšega angiogenskega preklopa in zmanjšanja gostote ožiljenosti, pri izbitem genu za katepsina B in L pa je bila zmanjšana proliferacija.

Opažanja so v skladu s prejšnjimi študijami, ki so že pokazale pomembno vlogo katepsinov v razvoju humanih tumorjev [39, 44, 63, 65]. Različne stopnje ožiljenosti tumorjev pa prav tako lahko razložimo z individualnimi vlogami katepsinov v tem procesu, kot je že omenjeno v poglavju Vloga katepsinov v zunajcelični proteolizi.

Tabela 4: *Povzetek vpliva izbitja katepsinov na tumorigenezo v RT2 modelu*. Povzeto po [43, 63].

tumorigene lastnosti	**kat $B^{-/-}$ RT2**	**kat $L^{-/-}$ RT2**	**kat $S^{-/-}$ RT2**
angiogenski preklop	24% zmanjšanje	ni sprememb	24% zmanjšanje
volumen tumorja	72% zmanjšanje	88% zmanjšanje	47% zmanjšanje
gostota mikrovaskulature tumorja	56% zmanjšanje	ni sprememb	48% zmanjšanje
apoptoza	22% povečanje	337% povečanje	164% povečanje
proliferacija celic	44% zmanjšanje	58% zmanjšanje	ni sprememb
invazivnost tumorja	pomembno zmanjšanje	pomembno zmanjšanje	pomembno zmanjšanje

In vivo inhibicija cisteinskih katepsinov v RT2 modelu zmanjša rast in širjenje tumorjev, prav tako pa v kombinacijski terapiji z zdravili proti raku poveča njihov učinek [42, 96].

1.8 Cisteinski katepsini pri apoptozi

Nove vloge cisteinskih katepsinov pa se ne odpirajo samo na področju njihovega zunajceličnega delovanja, saj lahko ti encimi vplivajo tudi na številne procese znotraj celice. Tako je bila permeabilizacija lizosomov zaradi zunanjih ali notranjih dejavnikov in posledičnega sproščanja katepsinov v citosol povezana z različnimi oblikami celične smrti (apoptoza in nekroza) [97]. Motnje v regulaciji celične smrti niso samo ena izmed

ključnih lastnosti rakastih obolenj, temveč tudi številnih drugih patoloških stanj, kar odpira nova zanimivo področje raziskav vloge katepsinov pri teh signalnih poteh.

1.8.1 Apoptoza

Apoptoza je morfološko in biokemijsko specifična oblika programirane celične smrti. To je osnoven in urejen biološki proces, s katerim organizem varno odstranjuje odvečne, postarane ali poškodovane celice [98]. Apoptoza je ključna za razvoj in homeostazo večceličnih organizmov. Napake pri njenem uravnavanju povzročijo različna obolenja, navedena v tabeli 5 [99, 100].

Tabela 5: *Bolezni, povezane z motnjami apoptoze*. Povzeto po [99, 100].

motnje apoptoze	
nezadostna apoptoza	**prekomerna apoptoza**
rak	kardiovaskularne bolezni
avtoimune bolezni	nevrodegenerativne bolezni
sepsa	vnetje
virusne okužbe	

Med apoptozo pride do morfoloških in biokemijskih sprememb v celici. Ta se skrči, citoskelet razgradi, jedro in citoplazma pa kondenzirata. Za tem pride do brstenja membrane. Fosfatidilserin se izpostavi na zunanjo stran membrane, kar je signal za okoliške makrofage, da požrejo nastajajoča apoptotska telesca. Tako se odvečne celice odstranijo popolnoma neškodljivo brez izlitja njihove vsebine in sprožitve vnetja. Najpomembnejša biokemijska sprememba apoptotskih celic pa je aktivacija družine visokospecifičnih cisteinskih proteaz kaspaz [101]. Sprožitvene kaspaze (kaspaza 8, 9 in 10) aktivirajo izvršitvene kaspaze (kaspaze 3, 6 in 7), ki povzročijo porušenje homeostaze, ustavitev celičnega cikla in inaktivacijo zaviralcev apoptoze.

1.8.2 Kaspaze

Kaspaze so od cisteina odvisne aspartat-specifične endoproteaze, kar pove tudi njihovo ime (caspase – cysteine-dependent aspartate-specific protease) [102]. Uvrščamo jih v družino C14 in klan CD. Cepitve so zelo specifične, saj navadno substrat cepijo samo nekajkrat ali celo le enkrat. Zato je posledica njihovega delovanja največkrat aktivacija ali inaktivacija proteinov, ne pa njihova razgradnja [103, 104].

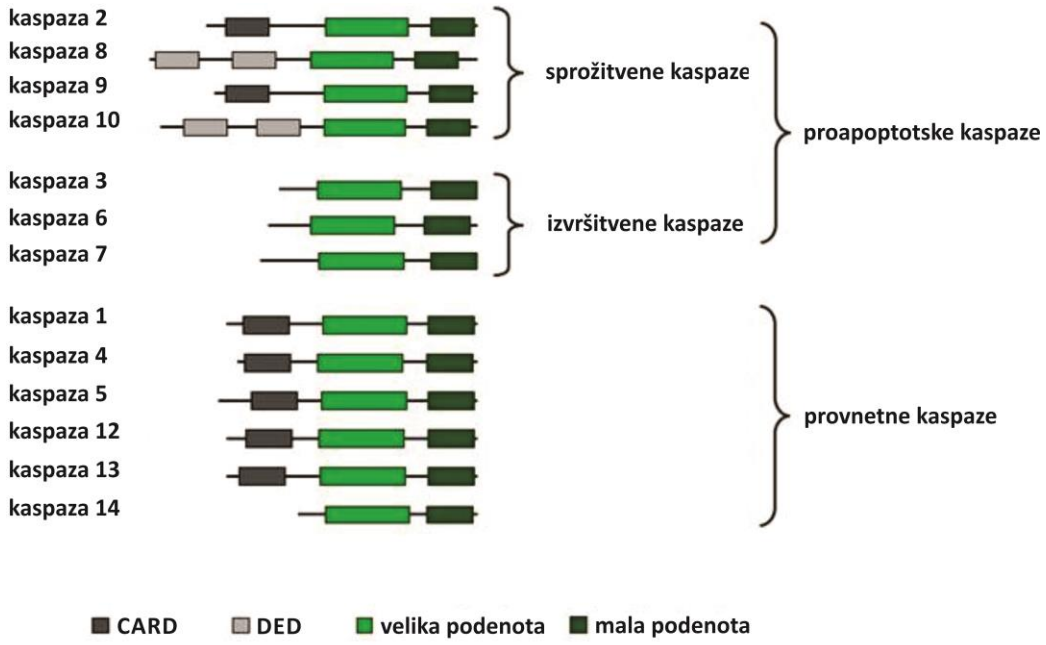
Kaspaze lahko glede na funkcijo, ki jo opravljajo, v splošnem razdelimo na apoptotske in provnetne. Apoptotske kaspaze obsegajo dve pomembni skupini, sprožitvene/ iniciatorske/aktivatorske (kaspaze 8, 9 in 10) ter izvršitvene/eksekucijske (kaspaze 3, 6 in 7) kaspaze. Kaspaza 2 ima značilnosti obeh skupin [105]. Sprožitvene kaspaze se aktivirajo na začetku signalne kaskade apoptoze. Cepijo izvršitvene kaspaze, te pa direktno cepijo številne tarčne beljakovine v jedru, citoplazmi in citoskeletu, ki so pomembne za izvršitev programirane celične smrti.

Kaspaze se sintetizirajo kot zimogeni/proencimi. Sprožitvene prokaspaze so monomeri, izvršitvene pa dimeri. Pri aktivaciji se katalitična domena cepi na veliko in malo podenoto, ki se povežeta. V aktivni obliki so sprožitvene in izvršitvene kaspaze dimeri, tako da ima vsaka molekula dve aktivni mesti [106].

Pri sprožitvenih kaspazah je za aktivacijo potrebna homodimerizacija monomerov. Potrebno je vedeti, da imajo glede na pot sprožitve apoptoze kaspaze različna mesta

aktivacije. Z adapterskimi proteini se preko protein-protein prepoznavnih interakcijskih motivov (efektorska domena smrti - DED (*angl*. death efector domain) ali domen, ki rekrutirajo kaspaze - CARD (*angl*. caspase recrutiment domain)), povežejo v platforme, kjer se doseže visoka lokalna koncentracija kaspaz [107]. Tako se lahko dimerizirajo kot posledica bližine molekul (*angl*. proximity-induced dimerization) [108].

Za razliko od sprožitvenih kaspaz, ki so v citosolu neaktivne v obliki monomernih zimogenov, so izvršitvene kaspaze pred aktivacijo v obliki dimerov in potrebujejo cepitev katalitične domene za aktivacijo [109]. Aktivnost že tvorjenega dimera preprečuje povezovalni peptid med veliko in malo podenoto katalitičnega mesta. Tvorbo aktivnega mesta omogoči cepitev povezovalnega peptida, ki jo izvršijo sprožitvene kaspaze (kaspaze 8, 9, 10) ali pa grancim B (serinska proteaza, specifična za limfocite) in katepsin G (cepitev je potrjena samo *in vitro*) [106].



Slika 5: *Delitev kaspaz glede na njihovo vlogo*. Povzeto po [106].

1.8.3 Sprožitev apoptoze

Apoptozo lahko sprožijo številni signali po dveh različnih poteh, zunanji (ekstrinzični) in notranji (intrinzični). Zunanja pot se aktivira, ko se na receptorje smrti, ki so na zunanji strani celične membrane, vežejo ligandi smrti. Notranjo pot pa lahko sprožijo različni stresni signali, ki poškodujejo mitohondrije in povzročijo sprostitev proapoptotskih dejavnikov v citosol. Aktivacija obeh poti vodi do aktivacije kaspaz, ki izvršijo proces apoptoze [110].

1.8.3.1 Notranja (intrinzična, mitohondrijska) pot

Osrednji dogodek pri tej poti je permeabilizacija zunanje mitohondrijske membrane (*angl*. mitohondrial outer membrane permeabilisation – MOMP). To je lahko posledica sevanja, citotoksičnih snovi in drugih škodljivih vplivov. Zaradi tega se iz medmembranskega mitohondrijskega prostora v citosol sprostijo proapoptotske molekule, kot so citokrom c, HtrA2/Omi in Smac/Diablo [100].

Sproščeni citokrom c se poveže z adaptorskim proteinom Apaf-1. To povzroči konformacijske spremembe in oligomerizacijo v apoptosom. Ta je sestavljen približno iz

sedmih molekul citokroma c in sedmih molekul Apaf-1. Slednje imajo specifične domene CARD (*angl*. caspase activation and recruitment domain), kamor se veže prokaspaza 9. Na njem se dimerizirajo v aktivne oblike, ki aktivirajo kaspazi 3 in 7.

1.8.3.2 Proteini Bcl-2

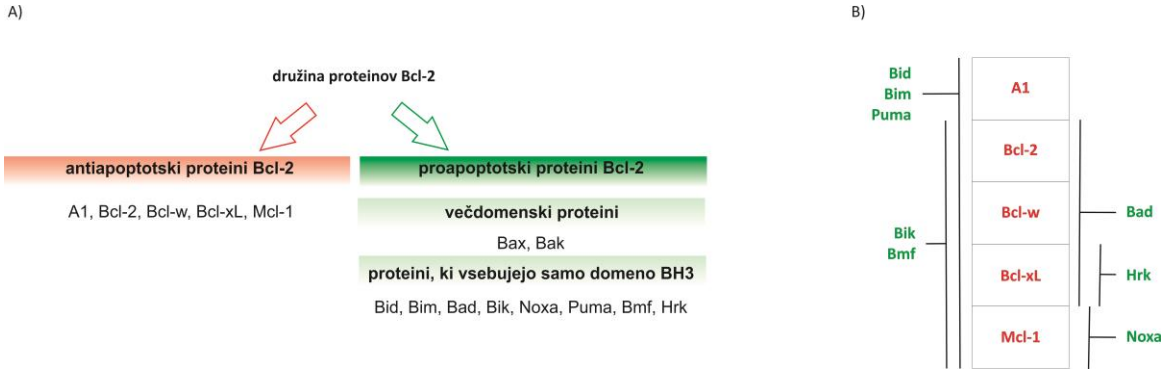
Permeabilizacijo zunanje mitohondrijske membrane nadzirajo proteini iz družine Bcl-2 (*angl*. B-cell lymphoma-2). Glede na funkcijo in strukturo jih razdelimo na antiapoptotske, ki zavirajo apoptozo, in proapoptotske, ki apoptozo pospešujejo [111].

V družino antiapoptotskih proteinov uvrščamo proteine Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 in A1. Družino proapoptotskih proteinov razdelimo na dve podskupini. V prvo uvrščamo proteine s tremi regijami, homolognimi Bcl-2 (BH1-3), to so predvsem Bax, Bak, Bok in še nekaj drugih proteinov. Drugo podskupino tvorijo proteini, ki imajo le regijo BH3 (*angl*. BH3-only); Bid, Puma, Noxa, Bim, Bad in ostali [112]. Z izjemo Bax-a, ki ga najdemo tudi v mitohondrijski membrani, se vsi proapoptotski proteini nahajajo v citosolu.

Proteini, ki imajo samo regijo BH3, delujejo kot senzorji apoptotskih signalov, njihova aktivnost pa se uravnava s cepitvami (Bid), defosforilacijo (Bim, Bad) ali na nivoju transkripcije (Puma, Noxa) [112]. Cepitev proteina Bid v tBid (*angl*. truncated Bid−tBid) omogoči njegov prenos v mitohondrij, kjer sodeluje pri oligomerizaciji proteinov Bax in Bak [113].

Večdomenska proapoptotska proteina Bax in Bak lahko tvorita pore v mitohondrijski membrani. Pri neposrednem načinu aktivacije se nekateri proapoptotski proteini, ki jih imenujemo aktivatorji (Bid, Bim, Puma) vežejo na Bax in Bak in ju tako aktivirajo. Pri posredni aktivaciji pa sta Bax in Bak najprej v neaktivnem kompleksu povezana z antiapoptotskimi Bcl-2 proteini. Proapoptotski proteini, ki imajo le BH3 regijo, lahko z vezavo na te Bcl-2 proteine proteina Bax in Bak sprostijo [114].

Protein Bak se nenehno prenaša v zunanjo mitohondrijsko membrano, kjer ga inhibira napetostno odvisni anionski kanalček VDAC2. Aktivatorji tBid, Bim ali Puma lahko prekinejo povezavo Bak-VDAC2 ter s tem omogočijo oligomerizacijo in tvorbo pore. Bax je citosolen monomerni protein, katerega C-končna vijačnica α9 preprečuje dimerizacijo. Struktura proteina se spremeni, ko se na N-končno vijačnico α1 vežejo tBid, Bim ali Puma, z vijačnico α9 pa se Bax vgradi v mitohondrijsko membrano [115]. Bax lahko tvori pore sam ali pa v povezavi z Bak-om ali tBid-om [116]. Pore omogočajo permeabilizacijo membrane in prehod proapoptotskih molekul v citosol.



Slika 6: *Delitev proteinov družine Bcl-2 (A) in profil interakcij antiapoptotskih proteinov Bcl-2 s proteini, ki vsebujejo samo regijo BH3 (B).* Slika je povzeta po [111].

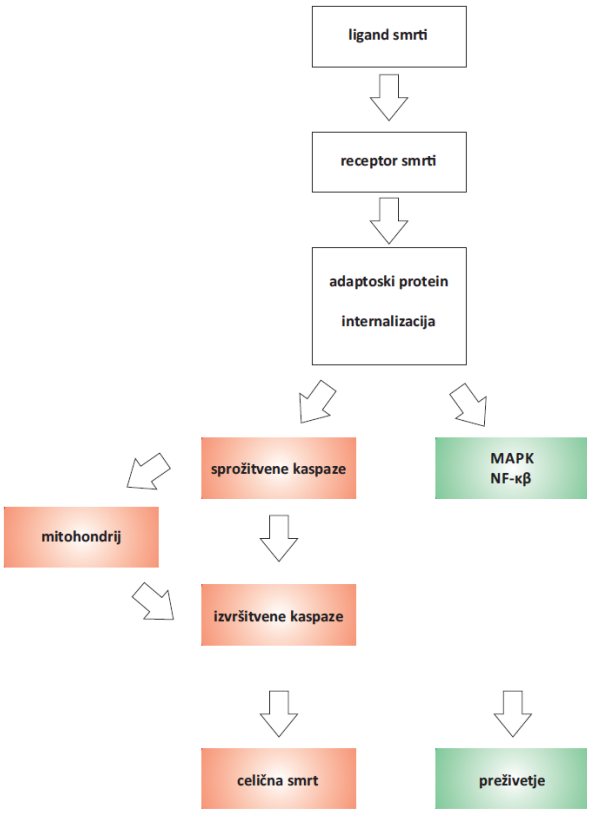
1.8.3.3 Zunanja (ekstrinzična, receptorska) pot

Zunanjo pot apoptoze sproži vezava ligandov smrti na receptorje smrti. To so člani družine receptorjev dejavnika tumorske nekroze (TNF). Značilnost receptorjev smrti je ohranjeno zaporedje v citoplazemski regiji, imenovano domena smrti (*angl*. death domain – DD), ki je nujna za sprožitev apoptoze [117, 118]. Najbolj raziskani receptorji iz družine TNF so Fas (CD95/APO-1), receptor TNF 1 (TNF-R1/CD120a), receptor TRAIL 1 (TRAIL-R1/DR4) in receptor TRAIL 2 (TRAIL-R2/DR5/APO-2) [119].

Aktivirajo se z vezavo specifičnih citokinov iz družine TNF. Na receptor Fas se veže ligand FasL, na receptor TNF se veže TNF-α in na receptorje TRAIL se veže TRAIL [117, 120].

Receptorji smrti morajo oligomerizirati, da se lahko signal prenese v notranjost celice [121]. Verjetno se preko specifičnih funkcionalnih regij zunaj celice, ki so bogate s cisteinskimi preostanki, imenovane PLAD (*angl*. preligand assembly domain), sami povežejo v kompleks že pred vezavo liganda [122, 123]. Ta pa povzroči konformacijske spremembe, ki omogočijo vezavo adaptorskih proteinov FADD (*angl*. Fas-associated protein with death domain) ali TRADD (*angl*. TNF receptor-associated protein with death domain) na domene smrti preko homotipske interakcije z njihovimi domenami smrti. Ti proteini skupaj z receptorji smrti tvorijo kompleks, ki ga imenujemo DISC (*angl*. death inducing signaling complex). Nanj se preko efektorskih domen smrti (DED) adaptorskih proteinov s prav tako homotipsko interakcijo vežejo sprožitvene prokaspaze, ki imajo domene DED (kaspazi 8 in 10) [124]. Iz DISC-a se sprosti v citosol aktivna heterotetramerna molekula kaspaze, ki lahko sproži apoptotsko signalno kaskado. [119].

Preko receptorjev smrti se lahko sprožijo tudi z apoptozo nepovezani procesi. Tako se po vezavi ligandov smrti lahko sproži proliferacija, diferenciacija, nastajanje kemokinov in vnetni odziv [119]. Aktivacija preživetvenih poti ni posledica inhibicije apoptotske kaskade, ampak je kompleksen proces regulacije preko adaptorskih proteinov in internalizacije signalnih kompleksov.



Slika 7: *Splošen mehanizem signaliziranja apoptoze, ki ga sprožijo ligandi smrti*. Slika je povzeta po [119]. Vezava ligandov smrti na receptorje smrti sproži tako celično smrt kot tudi preživetvene poti preko aktivacije MAPK in NF-κβ.

1.8.3.3.1 Ligand in receptor Fas

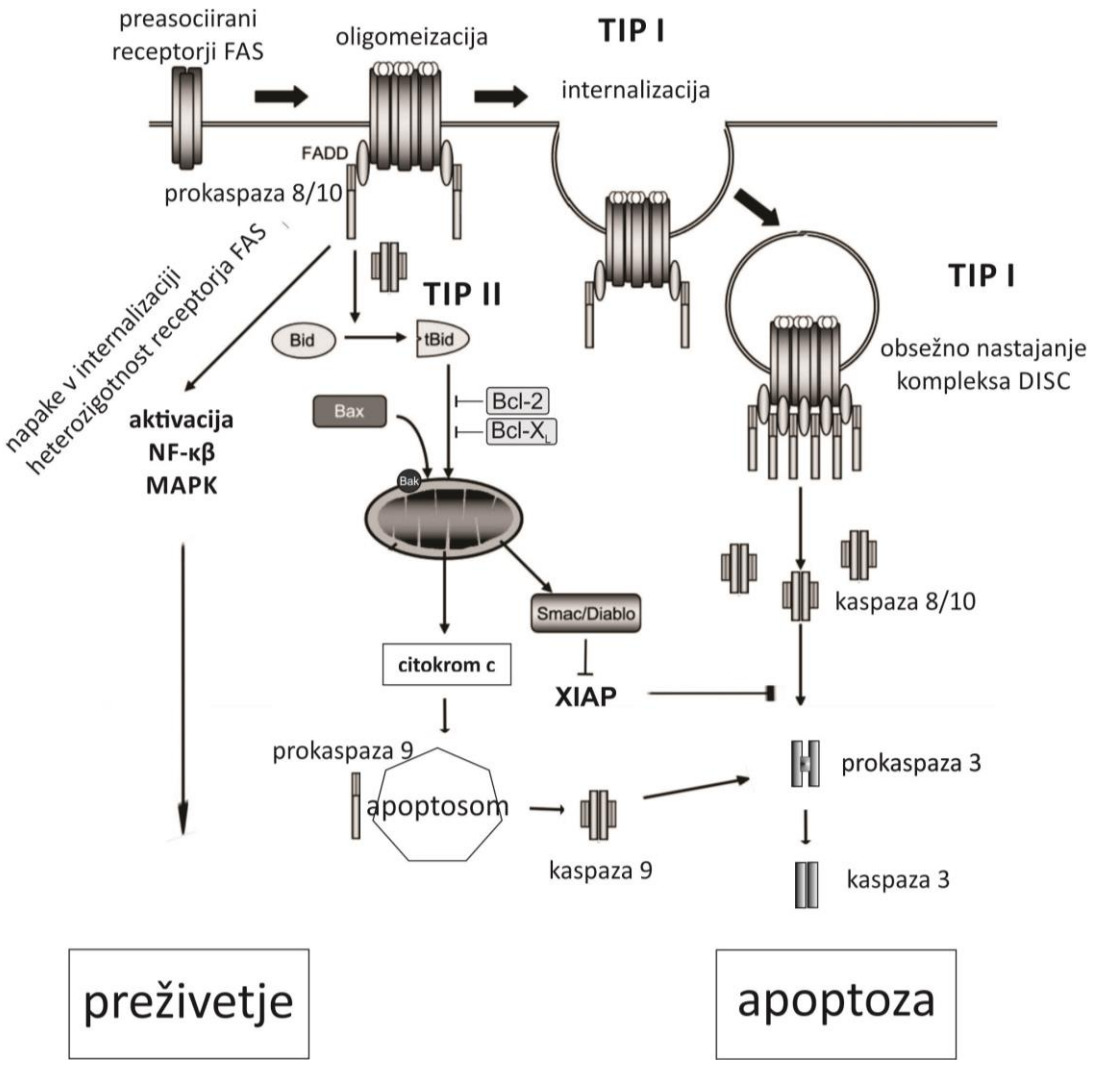
Poglavitna naloga receptorjev Fas (CD95/Apo-1) je uravnavanje imunskega odziva. S Fas posredovano apoptozo citotoksični limfociti T uničijo celice, ki izražajo tuje antigene, uravnava se odstranjevanje antigen-prestavljajočih celic in aktiviranih limfocitov T med okužbo. Ker pa je receptor Fas splošno prisoten, sodeluje pri signalizaciji celične smrti tudi v številnih drugih tkivih.

Ligand Fas (FasL) v največji meri izražajo aktivirani limfociti T. Stimulacija z njim povzroči nastajanje mikroagregatov predhodno povezanih receptorjev in njihov prenos v lipidne rafte, kjer se združijo v višje organizirane komplekse. S tem se pospeši kasnejša internalizacija receptorjev. Sledijo konformacijske spremembe in združevanje domen smrti na znotrajcelični strani receptorja, kamor se veže adaptor FADD, nanj pa kaspaza 8. Te strukture imenujemo SPOTS (*angl.* signaling protein oligomerization transduction structures). V tem koraku nastane le majhna količina kompleksa DISC. Receptorji se nato internalizirajo v s klatrinom-posredovani endocitozi. Tukaj v zgodnjih endosomih nastane največ kompleksa DISC in posledično aktivne kaspaze 8 [125, 126].

Glede na nivo nastalega kompleksa DISC in aktivnosti kaspaze 8 lahko celice razdelimo na tip I in tip II [127]. V celicah tipa I nastaja velika količina kompleksa DISC, prekomerno izražanje antiapoptotskih proteinov Bcl-2 in Bcl-X_L pa ne zavre apoptoze in/ali vsebujejo manj X-vezanega inhibitorja apoptoze (XIAP)[128]. Tako nastane dovolj aktivne kaspaze 8, ki aktivira izvršitvene kaspaze celične smrti. V celicah tipa II direktna aktivacija ni možna. Po vezavi liganda receptorji le zmerno ko-lokalizirajo z lipidnimi rafti in niso učinkovito internalizirani. Posledično nastane manj kompleksov DISC in aktivacija kaspaze 8 na kompleksu DISC je majhna. Zato je potrebna ojačitvena zanka preko mitohondrijev [127]. Kaspaza 8 tako cepi Bid v tBid, ki povzroči, da se iz

mitohondrija sprosti citokrom c. Za tem se tvori apoptosom, v katerem se aktivira kaspaza 9. Ta cepi neaktivno izvršitveno kaspazo 3 v aktivno obliko [129].

V mnogih celicah FasL ne sproži citotoksičnega odziva, temveč pospeši celično delitev, migracijo in sintezo citokinov [130]. To je posledica dejstva, da vezava liganda Fas lahko poleg formacije kompleksa DISC sproži tudi signalno pot jedrnega dejavnika κβ (NF-κβ) in pot z mitogeni aktiviranih proteinskih kinaz (MAPK), kar vključi prepisovanje preživetvenih genov. Vezava adaptorskih in drugih molekul, kompartmenizacija in endocitozna pot Fas-a so kritične za določitev, ali bo vezava FasL sprožila preživetje celice ali njeno smrt [130-132]. Tako adaptorski protein RIP1 (*angl*. receptor interacting protein 1) glede na post-translacijske modifikacije sodeluje pri FasL inducirani nekrozi, aktivaciji preživetvene poti preko NF- κβ ali zviša aktivacijo kaspaze 8, aktivira pa lahko tudi kaspazo 2; protein 6, ki je povezan z domeno smrti (Daxx), sodeluje pri od kaspaz neodvisnih poteh apoptoze in pri aktivaciji c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) neodvisno od kaspaze 8 [131]. Daxx lahko veže tudi protein SUMO-1, ki ščiti pred Fas-posredovano apoptozo [133]. Fosforilacija FADD s proteinsko kinazo zeta (PKCζ) inhibira celično smrt [134]. Prav tako se lahko v kompleks DISC vežejo še druge molekule. Tako cFLIP, odvisno od koncentracije in spojitvene oblike, inhibira ali okrepi apoptotsko signaliziranje [130]. Natančen mehanizem regulacije med obema potema pa še vedno ostaja deloma nepojasnjen [119]. Na sliki 8 je shematsko prikazan mehanizem sprožitve apoptoze preko receptorja Fas.



Slika 8: *Signalizacijski poti, sproženi preko aktivacije receptorja Fas*. Povzeto po [119, 130].

1.8.4 Cisteinski katepsini, vpleteni v apoptotsko pot

Čeprav imajo kaspaze vodilno vlogo pri apoptozi, so novejše študije nakazale, da v primerih, ko gre za zmerne poškodbe lizosomskih membran, tudi katepsini prispevajo k signalizaciji v tej obliki programirane celične smrti, saj že delna permeabilizacija lizosomske membrane zadostuje, da količina sproščenih encimov v citosol preseže zaščitno delovanje citosolnih inhibitorjev [97, 135-137].

Zaradi nestabilnosti in izgube aktivnosti v citosolu ni veliko podatkov o znotrajceličnih proteinih, ki so tarče katepsinske aktivnosti [138]. V tabeli 6 so prikazani do sedaj poznani citosolni *in vitro* substrati cisteinskih katepsinov, ki so povezani s programirano celično smrtjo.

Tabela 6: *Znotrajcelični in vitro substrati človeških lizosomskih cisteinskih proteaz*. Povzeto po [8, 9].

ime	**citosolni substrati**
katepsin L	Bid, Bak, BimEL, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP
katepsin V	/
katepsin S	Bid, Bak, BimEL, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP
katepsin K	Bid, Bak, BimEL, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP
katepsin F	/
katepsin B	Bid, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, PARP-1, kaspaze1/2/11
katepsin H	Bid, Bak, BimEL, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP

S cepitvijo z apoptozo povezanih proteinov katepsini sodelujejo v njeni regulaciji. Prva znana tarča je protein Bid, proapoptotski homolog Bcl-2, ki je tudi do sedaj največkrat naveden substrat katepsinov [139-141]. Najpomembnejšo vlogo pri cepitvi Bid-a naj bi imela katepsina B in L [140]. Cepljen Bid (tBid) sicer omogoča tvorbo por v mitohondrijski membrani, vendar pa so raziskave na miših z izbitim genom za Bid pokazale, da odsotnost tega proteina ne zaščiti celic pred apoptozo, ki je odvisna od katepsinov [142]. To nakazuje vpletenost dodatnih proteinov, ki jih sproščeni katepsini cepijo. Tako lahko razgradnja antiapoptotskih proteinov iz družine Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) destabilizira mitohondrijske membrane [141, 143].

Katepsini pa lahko sodelujejo tudi v signalni poti neodvisno od poškodb mitohondrijske membrane. Pri apoptozi, inducirani z lizosomotropikom LLOMe, so pokazali, da katepsini cepijo inhibitor apoptoze XIAP [141].

Tudi kaspaze so lahko tarče katepsinov. Katepsin B lahko *in vitro* cepi kaspazi 1 in 11 [144]. Ostalih kaspaz, ki so vpletene v apoptotsko pot, katepsini B, H, L, K, L, S in X ne cepijo [139]. Kljub temu so kaspaze slabi substrati za katepsine. Pomembno je tudi opozoriti, da sta kaspazi 1 in 11 provnetni in ne proapoptoski, kar pomeni, da njuna aktivacija le posredno vpliva na proces celične smrti.

1.8.4.1 Mehanizmi permeabilizacije lizosomske membrane

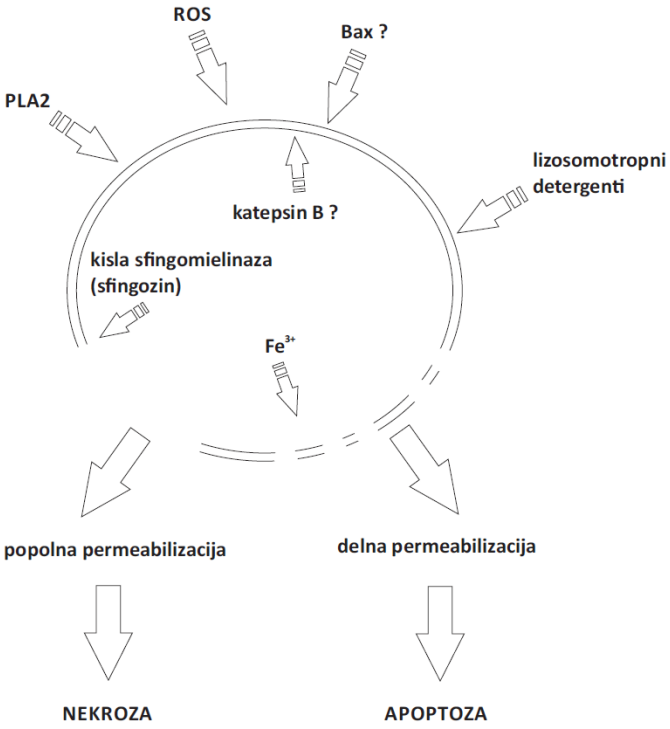
Številni agensi endogenega in sintetičnega izvora lahko sprožijo permeabilizacijo lizosomske membrane (LMP) in s tem sprostijo katepsine v znotrajcelični prostor.

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) so najverjetneje eden izmed najbolj pomembnih notranjih sprožilcev LMP. Te zelo reaktivne molekule izvorno nastajajo v mitohondrijih, zato poškodujejo predvsem lizosome v njihovi bližini [145]. Kot posledica oksidativnega stresa vodikov peroksid iz mitohondrijev prehaja v bližnje lizosome. Tukaj se kopiči avtofagiran material, ki je bogat z železom. V Fentonovi reakciji zato nastajajo visokoreaktivni hidroksilni radikali, ki peroksidirajo membranske lipide. Tako se membrane lizosomov poškodujejo in pride do izpusta molekul v citosol. Na ta način se oksidativni stres iz mitohondrijev ojača s pomočjo redoks-aktivnega železa v lizosomih [146]. Dodatno lahko tudi lizosomski encimi sprožijo poškodbe mitohondrijske membrane s cepitvijo Bcl-2 proteinov, kar še dodatno pospeši nastajanje ROS. Tako se ustvari pozitivna povratna zanka, ki vodi v nove poškodbe lizosomov [141]. ROS lahko aktivirajo fosfolipazo A2 (PLA2), ki destabilizira organele z razgradnjo membranskih fosfolipidov [147]. Tudi antagonist sigma-2-receptorja – siramezin je bil povezan s povečanim nastajanjem ROS, kar privede do LMP in celične smrti [148, 149].

Lizosomotropiki so agensi endogenega in sintetičnega izvora in lahko direktno sprožijo LMP. Po protonaciji se ujamejo v lizosome. Ko njihova koncentracija v teh organelih preseže kritično vrednost, postanejo membranolitični ter sprostijo vsebino lizosomov v citosol [150]. Med endogenimi lizosomotropiki je najpomembnejši sfingolipid sfingomielin. V lizosomski membrani ga kisla sfingomielinaza (ASMase) in ceramidaza pretvorita v ceramid in dalje v sfingozin. Nastajanje slednjega je še povečano pri s TNF-α sproženi apoptozi. Kopičenje obeh sproži LMP. Obstajajo dokazi, da sfingozin celo stimulira delovanje katepsina B in s tem prav tako promovira LMP [65, 151]. Najbolj proučen sintetični lizosomotropik pa je Leu-LeuOMe, ki je v kliničnem testiranju za zdravljenje zavrnitvene reakcije po presaditvi kostnega mozga [152].

Z LMP povezujejo tudi proapoptotska Bcl-2 proteina Bax in/ali Bak, ki sodelujeta pri permeabilizaciji zunanje mitohondrijske membrane [112]. Obstaja več teorij, kako bi lahko proteina Bax in Bak tvorila pore v lizosomski membrani [151, 153-155]. Nedavna študija pa je pokazala tudi možnost, da se proteina Bax/Bak preneseta v lizosom kot posledica avtofagnega prenosa poškodovanih mitohondrijev [156]. Zaradi nasprotujočih si študij vloga Bax in Bak ostaja vprašljiva.

Na permeabilizacijo lizosomskih membran vplivajo tudi sami katepsini. Študije na celicah z izbitim genom za katepsin B so pokazale manjšo lizosomsko permeabilizacijo po indukciji apoptoze s TNF-α v primerjavi s celicami divjega tipa. Novejše raziskave so razkrile, da povišana aktivnost katepsinov razpolovi življenjsko dobo proteinov Lamp-1 in Lamp-2 (membranski protein, povezan z lizosomom-1 in -2) in s tem destabilizira lizosomske membrane [157]. Hkrati pa naj bi katepsin B podaljšal življenjsko dobo sfingozina z razgradnjo sfingozin kinaze-1, ki pretvarja proapoptotski sfingozin v antiapoptotski sfingozin-1-fosfat [158]. Na sliki 9 so prikazani mehanizmi permeabilizacije membrane lizosomov.



Slika 9: *Mehanizmi permeabilizacije lizosomske membrane.* Povzeto po [138, 159].

1.8.4.2 Vloga cisteinskih katepsinov v zunanji poti apoptoze

Ko govorimo o vlogi LMP in sproščanju katepsinov v citosol, je ključnega pomena, ali je to zgodnji ali pozen, prožilni ali ojačevalni dogodek v apoptotski kaskadi. Zato je pomembno, da razlikujemo med neposredno sprožitvijo LMP z lizosomotropiki in posredno, ki je posledica apoptotske kaskade. V prvem primeru je jasno, da je LMP prvi in kritičen korak [97, 160].

O vlogi indirektne sprožitve LMP pri apoptozi in posledičnega sproščanja katepsinov v citosol pa obstajajo zelo nasprotujoče si raziskave. Številna poročila cisteinske katepsine, še posebej pa katepsin B, povezujejo s procesi po aktivaciji kaspaze 8 [119, 159, 161-163]. LMP in katepsine so najprej umestili pred permeabilizacijo mitohondrijske membrane. Predpostavljeni mehanizmi poškodbe lizosomske membrane in delovanja katepsinov so bili zelo različni. Večina teh študij je analizirala le končne točke pri apoptozi, kjer so bile poškodbe lizosomov in mitohondrijev tako velike, da so onemogočile jasne zaključke. Prav tako je utišanje ali izbitje genov za katepsine samo zakasnilo, ne pa preprečilo apoptozo [151, 158, 161, 164]. Novejše študije, ki vključujejo tudi kinetiko apoptotskega procesa pri z receptorji smrti sproženi apoptozi, LMP opredeljujejo kot kasnejši dogodek, ki sledi permeabilizaciji mitohondrijev in služi kot pozitivna ojačevalna zanka [156, 165, 166]. Vloga cisteinskih katepsinov pri z receptorji smrti sproženi apoptozi do sedaj zaradi nasprotujočih si rezultatov raziskav še vedno ostaja nejasna.

Nedavna študija pa je uvrstila intaktne lizosome celo na sam začetek apoptotske kaskade. Kompleks med dejavnikom, povezanim s TNF receptorjem 2 (TRAF2), in celičnim inhibitorjem apoptoze (cIAP1) preprečuje formacijo kompleksa DISC preko TNFR/TNF-α poti. Njegovo razgradnjo v lizosomu inducira vezava TNF-ju podobnega šibkega sprožitelja apoptoze (TWEAK) na njegov receptor FN14, ki rekrutira TRAF2-cIAP kompleks. Ko se ta kompleks internalizira, ga razgradijo katepsini [167]. To zaenkrat ostaja poseben primer, ki pa ga je potrebno še nadalje raziskati.

2 Namen dela in hipoteza

Novejše študije so pokazale, da so izvorno lizosomski cisteinski katepsini vključeni v biologijo rakavih obolenj preko zunajceličnih signalizacijskih poti kot tudi znotrajcelično s sodelovanjem pri programirani celični smrti. Tako uporaba zunajceličnih inhibitorjev *in vitro* [67, 168] kot tudi *in vivo* inhibicija [42, 169] ali izbitje katepsinskih genov v transgenih modelih [43] zmanjša tumorigenost rakastih tvorb. Kljub temu je do sedaj le malo poznanega o zunajcelični vlogi cisteinskih katepsinov, predvsem o njihovi vključenosti v proteazno aktivnost na površini celic, tj. cepitvah proteinskih domen na membrani.

Na podlagi do sedaj zbranih raziskav domnevamo, da so cisteinski katepsini B, L in S pomemben del regulatorne zunajcelične proteolize ne le kot razgrajevalci ECM, ampak da proteolitsko procesirajo tudi zunajcelične domene membranskih proteinov.

Namen doktorskega dela je identifikacija proteinov, ki jih cisteinski katepsini B, L in S v regulirani proteolizi odcepijo s celične površine, in določitev fiziološkega pomena teh cepitev. Razvoj proteomike na področju degradomike (določevanje nabora proteinov, ki jih cepi določena proteaza) omogoča aplikacijo visokozmogljivih masnospektroskopskih metod za odkrivanje novih substratov. Uporaba tega pristopa predstavlja doslej prvo sistematsko študijo membranskih substratov cisteinskih katepsinov.

Nadalje številne študije o receptorsko posredovani apoptozi nakazujejo, da so cisteinski katepsini, še posebej katepsin B, vpleteni v procese signalizacije po aktivaciji kaspaze 8. Vendar obstajajo nasprotujoča si poročila o pomenu cisteinskih katepsinov v tej signalni poti.

Predvidevamo, da pri sprožitvi apoptoze preko receptorja Fas cisteinski katepsini niso ključni.

Zato je dodatni namen doktorskega dela raziskati vlogo cisteinskih katepsinov, predvsem katepsina B, pri znotrajceličnem signaliziranju pri apoptozi, sproženi preko receptorja smrti Fas.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

- 0,25% tripsin (Gibco)
- Ac-DEVD-AFC (N-acetil-aspartil-glutamil-valil-aspartil-7-amino-4-trifluorometilkumarin) (Bachem)
- acetonitril LC-MS (JT Baker)
- amonijev hidrogenkarbonat (Fluka)
- akridin oranž (Sigma)
- akrilamid-N,N-metilenenbisakrilamid (Serva)
- annexin-V-PE kit (BD Pharmigen)
- APS (amonijev persulfat) (Serva)
- CA-074Me ([(2S,3S)3-propilkarbamoiloksiran-2-karbonil]-L-izoleucil-L-prolil metilni ester) (Peptide)
- raztopina za brezencimsko odlepljanje celic (cell free cell dissotiation solution) (Millipore)
- DMSO (dimetilsulfoksid) (Merck)
- DTT (ditiotreitol) (Sigma)
- (D3)-NHS-acetat (NHS-trideutero-acetat) (pripravljeno na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani)
- E-64 (2S,3S)-*trans*-epoksisukcinil-L-levcilamido (4-gvanidino) butan) (Peptide Institute)
- E-64d (2S,3S)-*trans*-epoksisukcinil-L-levcilamido (4-gvanidino) butan etilni ester) (Peptide Institute)
- serum govejih zarodkov − FBS (PAA)
- toplotno inaktiviran serum govejih zarodkov − FBS HI (PAA)
- glicin (Sigma)
- glutamin (Sigma)
- goveji serumski albumin (New England Biolabs)
- jodoacetamid (Sigma)
- mešanica inhibitorjev proteaz (Sigma)
- mešanica penicilina in streptomicina (Sigma)
- MitoTracker CMX-Ros (Invitrogen)
- mravljinčna kislina (Fluka)
- NaDS (natrijev dodecil sulfat) (Serva)
- proteinska velikostna lestvica: PageRuler Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas)
- Nutridoma-SP (Roche)

- PMA (forbol-12-miristat-13-acetat) (Sigma)
- posneto mleko v prahu (Pomurske mlekarne)
- propidijev jodid (Sigma)
- reagent ECL za kemiluminiscenco (Amersham Pharmacia Biotech)
- reagent za določanje koncentracije proteinov (Biorad)
- TEMED (N,N,N', N'-tetrametiletilendiamin) (Merck)
- tripsin (TrypLE Select) (Gibco)
- Tris (Serva)
- Tween-20 (Serva)
- voda LC-MS-CHROMASOLV (Riedel de Haen)
- Z-FR-AMC (N-benzoiloksikarbonil-fenilalanil-arginil-7-amino-4-metilkumarin) (Bachem)
- Z-RR-AMC (N-benzoiloksikarbonil-arginil-arginil-7-amino-4-metilkumarin) (Bachem)
- Z-VAD-FMK (N-benziloksikarbonil-valil-alanil-aspartil-fluorometilketon) (Bachem)

3.1.2 Proteini

- človeški katepsin B, izražen v *E.coli*
- človeški katepsin S, izražen v *P. pastoris*
- človeški katepsin L, izražen v *P. pastoris*
- modificiran tripsin iz trebušne slinavke prašiča (Promega)
- protein A iz seva *S. aureus* (Sigma)

3.1.3 Protitelesa

- primarna mišja monoklonska protitelesa proti humanemu aktinu (Sigma)
- primarna ovčja poliklonska protitelesa proti humanemu nevropilinu 1 (R&D Systems)
- primarna kozja poliklonska protitelesa proti humanemu transferinskemu receptorju 1 (R&D Systems)
- primarna mišja poliklonska protitelesa proti humanemu CD44 (R&D Systems)
- primarna kozja poliklonska protitelesa proti humanemu ALCAM-u (R&D Systems)
- primarna kozja poliklonska protitelesa proti mišjemu ALCAM-u (R&D Systems)
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu B (pripravljena na Institutu »Jožef Stefan«)
- primarna kozja poliklonska protitelesa proti humanemu L1CAM-u (R&D Systems)
- primarna kunčja poliklonska protitelesa proti humanemu efrinskemu receptorju tipa A2 (Novus Biologicals)
- primarna ovčja poliklonska protitelesa proti humanemu pleksinu B2 (R&D Systems)
- primarna kozja poliklonska protitelesa proti humanemu MUC18 (R&D Systems)
- primarna kunčja monoklonska protitelesa proti mišjemu aktinu (Sigma)
- sekundarna kunčja antimišja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Abcam)

- sekundarna kozja antikunčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Abcam)
- sekundarna oslovska antikozja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Abcam)
- sekundarna kunčja antiovčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Abcam)
- sekundarna oslovska antiovčja protitelesa Alexa Fluor® 488 (Molecular probes/Invitrogen)
- sekundarna oslovska antikozja protitelesa Alexa Fluor® 488 (Molecular probes/Invitrogen)

3.1.4 Gojišča in pufri za gojenje celic

- gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom (PAA), obogateno z 10% FBS, 1% glutaminom in 1% streptomicinom/penicilinom
- gojišče RPMI 1640 z L-glutaminom, obogateno z 10% FBS-HI, 1% glutaminom in 1% streptomicinom/penicilinom
- gojišče RPMI 1640 z L-glutaminom, obogateno z 10% FBS, 1% glutaminom in 1% streptomicinom/penicilinom
- Dulbeccov PBS pufer (PAA)

3.1.5 Celice

HeLa – adenokarcinom materničnega vratu
HuH-7 – hepatokarcinom
U-937 – levkemijski monocitni limfom
Jurkat – celice akutne T celične levkemije
MDA-MB-231 – adenokarcinom mlečne žleze
T98-G – glioblastom multiforme
HT-144 – maligni melanom
PANC-1– adenokarcinom trebušne slinavke
MCF-7 – adenokarcinom mlečne žleze

3.1.6 Pufri

<u>elektroforezni pufer za NaDS-PAGE</u>
25 mM Tris
192 mM L-glicin
0,1% NaDS

<u>fosfatni pufer pH 6,0 za merjenje katepsinske aktivnosti</u>
100mM Na_2HPO_4
1mM EDTA

<u>kaspazni pufer (2X)</u>
100 mM Tris
10 mM DTT
0,1% CHAPS
10% saharoza
pH 7,4

lizirni pufer pH 8
20 mM Na_2HPO_4
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM PMSF
0,05% NP-40
0,05% NaDS

nanašalni pufer za NaDS-PAGE (6x)
300 mM Tris
100 mM NaDS
40 mM EDTA
1,2 M DTT
60% glicerol
0,3% bromfenol modro

prenašalni pufer
25 mM Tris
192 mM L-glicin
20% metanol

pufer HEPES
50 mM HEPES
0,25 mM NaCl
0,1% NP-40
pH 7,0

pufer PBS
145 mM NaCl
2,5 mM NaH_2PO_4
7,5 mM Na_2HPO_4
pH 7,4

pufer PBS(T)
145 mM NaCl
2,5 mM NaH_2PO_4
7,5 mM Na_2HPO_4
0,5% Tween-20
pH 7,4

pufer PBS za cepitev proteinov s površine
pufer PBS (PAA)
0,5 mM DTT
pH 6,0

pufer RIPA
50 mM tris
100 mM NaCl
0,1% NaDS
1% NP-40

0,5% deoksilonska kislina
1 mM EDTA

pufer za ekstrakcijo
70 μg/ml digitonin
250 mM saharoza
20 mM HEPES
10 mM KCl
1 mM $MgCl_2$
1 mM EDTA
1 mM EGTA
pH 7,5

pufer za tripsin (Promega)

pufer za vezavo AnnexinV-PE (BD Pharmigen)

raztopina za alkilacijo
55 mM jodoacetamid
25 mM NH_4HCO_3

raztopina za barvanje
0,5% barvilo Coomassie Brilliant Blue R-250
50% metanol
10% ocetna kislina

raztopina za ekstrakcijo
50% acetonitril
5% mravljinčna kislina

raztopina za razbarvanje 1
50% metanol
10% ocetna kislina

raztopina za razbarvanje 2
25 mM NH_4HCO_3
50% acetonitril

raztopina za redukcijo
10 mM DTT
25 mM NH_4HCO_3

raztopina za spiranje
25 mM NH_4HCO_3

raztopina za tripsinizacijo
25 mM NH_4HCO_3

topilo B
0,1% mravljinčna kislina v acetonitrilu

3.1.7 Laboratorijska oprema

- aparatura za prenos western P8DS Penguin (Owl Separation Systems)
- avtomatska temnica SRX-101A (Konica Minolta)
- avtomatske pipete (Eppendorf)
- C_{18} lovilna kolona (Proxeon Easy-Column^{TM})
- C_{18} PicoFritTM AQUASIL analitična kolona (New Objective)
- centrifuge Eppendorf 5402, 5410, 5417R, 5415R, 5810R
- centrifugirke (15 ml in 50 ml) (Falcon)
- filmi Biomax Light film (Kodak)
- filtrski vstavki MWCO 3.000 (Milipore)
- filtrski vstavki MWCO 10.000 (Milipore)
- fluorimeter za mikrotitrske plošče Safire (Tecan)
- hemocitometer
- inkubator za celične linije (Binder)
- invertni fluorescenčni mikroskop IX71 (Olympus)
- kaseta za razvijanje filmov X-omatic regular screens (Kodak)
- komplet za elektroforezo v prisotnosti NaDS (Biorad)
- laminar (Iskra PIO)
- magnetna mešala MM-530 (Tehtnica)
- masni spektrometer Orbitrap LTQ Velos (Thermo Scientific), sklopljen z EASY-nanoLCII HPLC enoto Proxeon (Thermo Scientific)
- nitrocelulozna membrana NC45 (Sigma)
- oprema za delo s celicami (pipete, plošče za gojenje, centrifugirke …) (TPP, Corning, Greiner)
- pH-meter (Metrel)
- pretočni citometer FACSCalibur (Becton Dickinson)
  ekscitacijska svetloba: 488 nm
  emisijska svetloba, filtri : FL1: 515 – 545 nm
  FL2: 564 – 606 nm
  FL3: > 670 nm
- vakuumska črpalka (ABM)
- vibracijski mešalnik Thermomixer compact (Eppendorf)

3.1.8 Komercialni testi

- test za invazivnost (QCM^{TM} 24-Well Cell Invasion Assay) (Millipore)
- test za merjenje Ras GTP-azne aktivnosti (Ras GTPase Chemi ELISA Kit) (Active motif)
- test za merjenje apoptotskih celic (Annexin V-PE apoptosis detection kit I) (BD Pharmigen)
- vstavki za migracijo PET (BD Falcon^{TM} Cell Cuture Inserts)

3.2 Metode

3.2.1 Gojenje celic

Celice smo gojili v inkubatorju v nadzorovani atmosferi (37 °C, 5% CO_2 in ozračje, nasičeno z vodno paro). Celice HeLa, HuH-7, MDA-MB-231, MCF-7 in T98-G smo gojili v gojišču DMEM (Gibco), obogatenim z 10% FBS, 1% glutaminom in 1% streptomicinom/penicilinom. Celice U-937 in Jurkat smo gojili v gojišču RPMI 1640, obogatenim z 10% FBS-HI, 1% glutaminom in 1% streptomicinom/penicilinom. Celice HT-144 smo gojili v gojišču RPMI 1640, obogatenim z 10% FBS, 1% glutaminom in 1% streptomicinom/penicilinom.

3.2.2 Tripsinizacija in precepljanje celic

Pri precepljanju celic smo najprej odsesali gojišče, sprali celice s pufrom PBS (PAA) in nanje dodali raztopino TrypLE Select. Celice s to raztopino smo inkubirali v CO_2 inkubatorju pri 37 °C, dokler se celice niso odlepile, nato smo jim dodali komplementiran medij za inaktivacijo tripsina (v razmerju 1:10) in jih nacepili na nove plošče.

3.2.3 Zamrzovanje celic

Po tripsinizaciji smo celice centrifugirali 5 minut pri 500 rcf. Supernatant smo odsesali in pelet resuspendirali v gojišču za zamrzovanje (90% FBS ali FBS HI za U-937 in Jurkat, 10% DMSO). Celice smo nato razdelili v zamrzovalne vijale. V posodi z izopropanolom, ki omogoča ohlajanje 1 °C/na minuto, smo jih zamrznili pri -80 °C.

3.2.4 Odmrzovanje celic

Vijale s celicami smo iz tekočega dušika ali zamrzovalnika pri -80 °C odtajali v vodni kopeli eno minuto pri 37 °C. Celice smo nato prenesli v 10 ml gojišča, centrifugirali 5 minut pri 500 rcf, gojišče odstranili, celice pa resuspendirali v 10 ml novega gojišča in prenesli na ploščo.

3.2.5 Določanje deleža apoptotskih celic

Zgodaj med apoptozo celice izgubijo asimetrično porazdelitev membranskih fosfolipidov, kasneje pa pride do kondenzacije in fragmentacije DNA. V apoptotskih celicah tako zaradi izgube asimetrije med drugim pride do izpostavitve fosfatidil serina (PS) na zunanjo stran membrane, kar lahko sledimo z uporabo konjugata Annexin V-PE. Annexin V je protein, ki se z visoko afiniteto veže na PS. Konjugiran je s fikoeritrinom (PE), ki je fluorokrom in služi za detekcijo vezave. Za sledenje poznim fazam apoptoze smo uporabili propidijev jodid (PI), ki je DNA interkelator. Ker so membrane živih celic neprepustne za PI, obarva samo pozno-apoptotske in mrtve celice. S kombinirano uporabo Annexin V-PE in PI tako lahko določimo deleža zgodnje- in pozno-apoptotskih celic.

Celice smo po potrebi tripsinizirali (pritrjene celice) in centrifugirali 5 minut pri 500 rcf. Gojišče smo odsesali, celice pa resuspendirali v 1 ml pufra PBS, prešteli in ponovno centrifugirali 5 minut pri 500 rcf. Po ponovnem spiranju s pufrom PBS smo 10^6 celic/ml resuspendirali v 1 ml pufra za vezavo konjugata Annexin V-PE. Suspenzijo (100 µl) smo prenesli v tubico za pretočno citometrijo, dodali 2 µl konjugata Annexina V-PE in inkubirali v temi. Po 15 minutah smo dodali še 300 µl pufra za vezavo konjugiranega

Annexina V-PE, 2 µl PI (končna koncentracija 0,2 µg/ml) ter pomerili fluorescenco označenega vzorca s pretočnim citometrom FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) s programsko opremo CellQuest.

3.2.6 Določitev optimalne koncentracije APO-1

Celice smo nacepili na ploščo s 6 vdolbinicami tako, da je bilo v vsaki vdolbinici $1x10^6$ celic (Jurkat, U-937) oziroma $1x10^5$ celic (HeLa, HuH-7). Naslednji dan smo po menjavi gojišča dodali APO-1 s proteinom A (razmerje 1:1) v različnih koncentracijah ter po 18 h (Jurkat) oziroma po 24 h (U-937, HeLa, HuH-7) določili delež apoptotskih celic.

3.2.7 Sprožitev apoptoze z APO-1 na celični liniji Jurkat

Celicam smo dodali inhibitorja cisteinskih katepsinov E-64d in CA-074Me ter inhibitor kaspaz Z-VAD-FMK (vse v končni koncentraciji 10 µM). Po 2-urni inkubaciji smo sprožili apoptozo z APO-1 in proteinom A, inkubirali nadaljnjih 18 ur v inkubatorju s 5% CO_2 pri 37 °C ter nato določili delež apoptotskih celic.

3.2.8 Določitev deleža celic s poškodovanimi mitohondriji

Delež celic s poškodovanimi mitohondriji smo določili z barvilom MitoTracker CMX-Ros. Ta kemikalija prehaja preko plazemske membrane in vstopi v mitohondrije. Nefluorescentna oblika se z oksidacijo pretvori v fluorescentno samo v metabolno aktivnih mitohondrijih. Tako celice s poškodovanimi mitohondriji kažejo zmanjšano intenziteto fluorescence v primerjavi s celicami z nepoškodovanimi mitohondriji.

Celice smo po potrebi tripsinizirali (pritrjene celice) in centrifugirali 5 minut pri 500 rcf. Po dvakratnem spiranju v pufru PBS smo $1x10^6$ celic/ml resuspendirali v 1 ml gojišča RPMI z MitoTracker CMX-Ros (končna koncentracija 50 nM). Celice smo nato inkubirali 30 minut pri 37 °C, jih centrifugirali 5 minut pri 500 rcf, odsesali gojišče in resuspendirali v 1 ml pufra PBS. Sledila je meritev fluorescence s pretočnim citometrom FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) s programsko opremo CellQuest.

3.2.9 Določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi

Delež celic s poškodovanimi lizosomi smo določali z uporabo akridin oranža (AO). To je lizosomotropik, ki se kopiči v kislih organelih in oddaja fluorescenco rdeče barve. Pri celicah s poškodovanimi lizosomi se v lizosomih nakopiči manj AO, zato je intenziteta fluorescence nižja.

Celice smo po potrebi tripsinizirali (pritrjene celice) in centrifugirali 5 minut pri 500 rcf. Gojišče smo odsesali, celice pa resuspendirali v 1 ml pufra PBS, prešteli in ponovno centrifugirali 5 minut pri 500 rcf. Po ponovnem spiranju s pufrom PBS smo $1x10^6$ celic/ml resuspendirali v 1 ml gojišča DMEM s končno koncentracijo AO 5 µg/ml. Celice smo inkubirali 15 minut pri 37 °C, nato smo jih centrifugirali 5 minut pri 1000 rpm, odsesali gojišče in resuspendirali v 1 ml pufra PBS. Za tem smo s pretočnim citometrom FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) s programsko opremo CellQuest pomerili fluorescenco.

3.2.10 Priprava celotnega celičnega lizata

Celice smo po potrebi tripsinizirali (pritrjene celice) in centrifugirali 5 minut pri 500 rcf. Ko smo odstranili gojišče, je sledilo dvakratno spiranje celic s hladnim pufrom PBS. Za

določanje katepsinske aktivnosti smo nato celice resuspendirali v 50 µl hladnega pufra HEPES, za določanje kaspazne aktivnosti ter imunodetekcijo pa v 50 µl hladnega pufra RIPA. PO 10-minutni inkubaciji na ledu smo celice centrifugirali 10 minut pri 500 rcf in 4 °C. Supernatant smo nato prenesli v novo epico in shranili pri -80 °C oziroma takoj uporabili v analizah.

3.2.11 Priprava citosolnega lizata

Celice smo po potrebi tripsinizirali (pritrjene celice) in centrifugirali 5 minut pri 500 rcf. Ko smo odstranili gojišče, je sledilo dvakratno spiranje celic s hladnim pufrom PBS. Nato smo jih resuspendirali v 200 µl hladnega pufra za ekstrakcijo, za potrebe imunodetekcije pa smo dodali še mešanico inhibitorjev proteaz v razmerju 1:100 (v/v). Med 10-minutno inkubacijo na ledu smo vzorce vsako minuto 5 sekund vrtinčili. Nato smo centrifugirali 3 minute pri 1500 rcf, supernatant pa prenesli v novo epico in shranili pri -80 °C oziroma takoj uporabili v analizah.

3.2.12 Določanje celotne koncentracije proteinov v vzorcu

Vsebnost proteinov v vzorcih smo določili z metodo po Bradfordu. Poskus smo naredili na ploščah s 96 vdolbinicami, vrednosti absorbance pa odčitali s fluorimetrom za mikrotitrske plošče (Tecan Infinite M1000 Pro). Najprej smo pripravili umeritveno krivuljo z BSA (0-100 µg/ml). 160 µl ustrezne redčitve BSA smo dodali 40 µl Bradfordovega reagenta, premešali in izmerili absorbanco pri 595 nm. Vzorce smo redčili v razmerju 1:100-1:500. Od te redčitve smo 160 µl zmešali s 40 µl Bradfordovega reagenta ter izmerili absorbanco. Koncentracijo proteinov v vzorcu smo nato določili iz umeritvene krivulje.

3.2.13 Merjenje encimske aktivnosti

Aktivnost izbranih encimov smo določali z uporabo različnih sintetičnih fluorigenih substratov. Ustrezen volumen vzorca (50 µg proteinov v primeru celičnih lizatov ali 50 µl supernatanta ko-kultur tumorskih celic in makrofagov) smo odpipetirali v črno mikrotitrsko ploščo ter dodali do 40 µl destilirane vode (v primeru lizatov). Nato smo dodali še 50 µl ustreznega pufra ter inkubirali vzorce 10 minut pri 37 °C, za tem smo dodali 10 µl izbranega substrata tako, da je bila končna koncentracija substrata 20 µM, in izmerili fluorescenco s fluorimetrom za mikrotitrske plošče (Tecan Infinite M1000 Pro). Sprememba fluorescence v časovni enoti (naklon) je sorazmerna encimski aktivnosti. V tabeli 7 so prikazani encimi, uporabljeni substrati in pufri ter vzbujevalna in emisijska valovna dolžina svetlobe za ustrezen substrat.

Tabela 7: *Substrati in njihove značilnosti za določanje encimske aktivnosti*.

encim	pufer	substrat	vzbujevalna valovna dolžina svetlobe	emisijska valovna dolžina svetlobe
kaspaza 3	kaspazni pufer	Ac-DEVD-AFC	400 nm	505 nm
cisteinski katepsini	fosfatni pufer pH 6,0	Z-Phe-Arg-AMC	370 nm	460 nm
katepsin B	fosfatni pufer pH 6,0	Z-Arg-Arg-AMC	370 nm	460 nm

3.2.14 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo z dodanim denaturantom natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE) smo uporabili pod redukcijskimi pogoji (v prisotnosti DTT) za ločevanje proteinov iz celičnih linij. Poliakrilamidni gel je sestavljen iz ločevalnega in koncentracijskega dela. Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali nanašalni pufer z NaDS in DTT ter jih termično obdelali (5 minut inkubacije pri 100 °C). Za referenčne velikosti proteinov smo nanesli proteinske standarde. Elektroforeza je potekala v elektroforeznem pufru v aparaturi za elektroforezo pri konstantnem toku 30 mA/gel. Za obarvanje vseh proteinov v vzorcih smo uporabili 0,2% raztopino Coomassie Brilliant Blue, za potrebe imunodetekcije pa smo uporabili prenos western. V tabeli 8 je navedena sestava poliakrilamidnih gelov.

Tabela 8: *Sestava poliakrilamidnih gelov*.

komponenta	**ločevalni gel**		**koncentracijski gel**
	12,5%	15%	5%
40% akrilamid-bisakrilamid (37,5:1)	3,13 ml	3,75 ml	1,25 ml
4x separacijski pufer (1,5 M Tris; pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	/
4x koncentracijski pufer (0,5 M Tris; pH 6,8)	/	/	2,5 ml
dH_2O	4,27 ml	3,65 ml	6,15 ml
10% NaDS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl
10% APS	30 µl	30 µl	30 µl

3.2.15 Detekcija proteinov s prenosom western

Prenos western je metoda prenosa proteinov iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno membrano s pomočjo električnega toka. Prenos je potekal dve uri pri konstantnem toku 35 mA. Prosta mesta na membrani smo nato blokirali z enourno inkubacijo v blokirni raztopini (5% posneto mleko v prahu v pufru PBS-T) pri sobni temperaturi z rahlim mešanjem. Za tem smo membrano inkubirali s primarnimi protitelesi preko noči pri 4 °C. Kasnejše spiranje nevezanih protiteles je potekalo pri sobni temperaturi 1 uro z rednim menjavanjem raztopine za spiranje PBS-T (vsakih 15 minut). Sledila je 2-urna inkubacija pri sobni temperaturi s sekundarnimi protitelesi. Ponovno smo spirali membrano 1 uro z rednim menjanjem raztopine za spiranje pri sobni temperaturi. Sistem ECL smo uporabili za detekcijo proteinov po navodilih proizvajalca.

3.2.16 Dodajanje rekombinantnih katepsinov na intaktne celice

Konfluentne celice MDA-MB-231, HT-144, PANC-1 in T98-G smo odlepili z raztopino za brezencimsko odlepljanje celic. 30 milijonov celic na paralelko smo nato inkubirali v 500 µl pufra PBS za cepitev proteinov s površine (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z rekombinantnimi katepsini B, L ali S dveh različnih koncentracij (končna koncentracija je bila 1 µM in 0,2 µM). Kot negativno kontrolo smo uporabili celice, inkubirane z 1 µM katepsinom, ki je bil predhodno eno uro inhibiran z 20 µM splošnim inhibitorjem

cisteinskih katepsinov E-64. Po enourni inkubaciji na 37 °C smo vzorce centrifugirali 5 minut na 500rcf, odvzet supernatant pa smo ponovno centrifugirali 5 minut pri največji hitrosti. Po končanem centrifugiranju smo supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko. Preostalo katepsinsko aktivnost v vzorcih smo blokirali z dodatkom E-64 (končna koncentracija je bila 20 μM).

3.2.17 Priprava vzorcev za masno spektrometrijo

Vzorcem supernatanta (priprava opisana v 3.2.16) smo dodali nanašalni pufer z NaDS in DTT ter jih termično obdelali (5 minut inkubacije pri 100 °C). Proteine v supernatantih smo nato ločili na 12,5% NaDS-PAGE gelih. Barvanju s Comassie Brilliant Blue je sledilo razbarvanje z raztopino za razbarvanje 1 (50% metanol, 10% ocetna kislina) do primerne intenzivnosti proteinskih prog. Vsako proteinsko progo na gelu smo razrezali na 6 enakih delov (vsak del je predstavljal en vzorec za analizo), ki smo jih z razbarvalno raztopino 2 (25 mm NH_4HCO_3, 50% acetonitril) razbarvali. Dele gela smo nato sprali z acetonitrilom in posušili v vakuumskem koncentratorju. Sledila je rehidracija v reducirajoči raztopini (10 mM DTT, 25 mM NH_4HCO_3). Po 45-minutni inkubaciji na 65 °C smo reducirajočo raztopino zamenjali z alkilacijsko (55 mM jododoacetamid, 25 mM NH_4HCO_3). Reakcija je potekala 30 minut v temi. Nato smo koščke gela sprali s 25 mM NH_4HCO_3 med intenzivnim vrtinčenjem. Po spiranju z acetonitrilom smo jih posušili v vakuumskem koncentratorju. Sledila je 15-minutna rehidracija na ledu v 80 μl tripsinizacijskega pufra (25 mM NH_4HCO_3), ki je vseboval 1 μg modificiranega prašičjega tripsina. Za tem smo dodali še toliko tripsinizacijskega pufra, da so bili koščki popolnoma prekriti, jih prestavili na 37 °C in pustili tripsinizacijo potekati preko noči. Naslednji dan smo pobrali tripsinsko raztopino in preostale peptide ekstrahirali z raztopino 50% acetonitrila in 5% mravljinčne kisline. Raztopini smo nato združili in koncentrirali v vakuumskem koncentratorju do končnega volumna 20 μl.

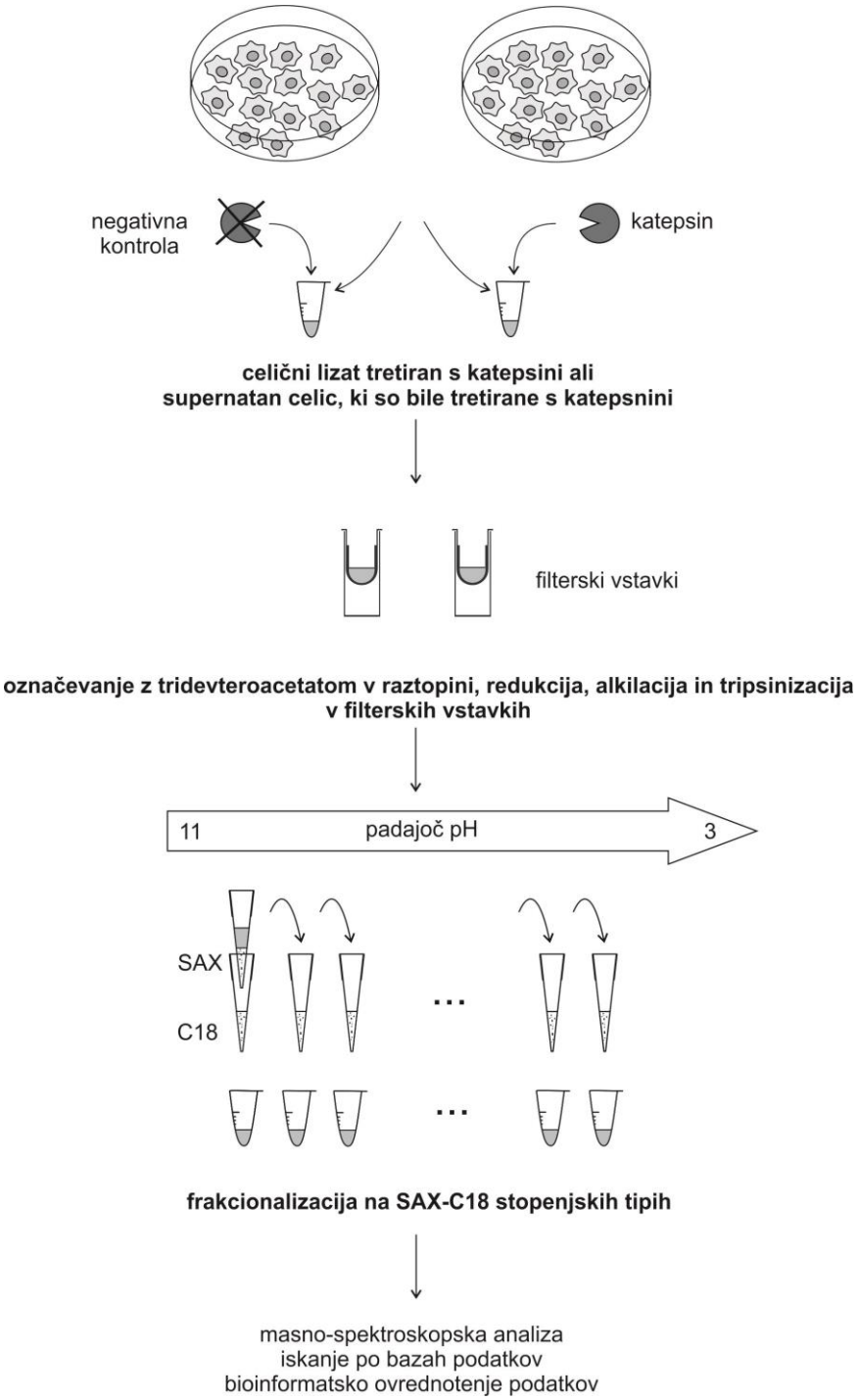
3.2.17.1 Označevanje prostih N-koncev z uporabo NHS-tridevtero-acetata za določevanje mest cepitve s katepsinoma L in S

Za določevanje cepitvenih mest smo uporabili novo metodo FPPS (*angl*. Fast Profiling of Protease Specificity), ki smo jo razvili v naši raziskovalni skupini [170]. Uporabili smo vzroce supernatanta z odcepljenimi zunajceličnimi domenami (postopek priprave vzorca je opisan v poglavju 3.2.16) in lizate celic MDA-MB-231, ki smo jih tretirali s katepsini.

Lizate smo pripravili tako, da smo celice odlepili z brezencimsko raztopino, sprali s pufrom PBS in lizirali 15 minut na ledu z ohlajenih lizirnim pufrom (20 mM natrijev fosfatni pufer pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05% NaSD; 0,05% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF), temu pa je sledila kratka sonifikacija (10 pulzov, 5 sekund). Netopen material smo nato odstranili s 5-minutnim centrifugiranjem na 14000 g. Lizate smo za tem dializirali proti 50 mM natrijevem fosfatnem pufru pH 6,0, z 150 mM NaCl in 2,5 mM DTT. Tako pripravljenim vzorcem smo dodali katepsina L ali S (ali predhodno inaktivirane katepsine z E-64 kot negativno kontrolo) v molarnem razmerju encim: substrat približno 1:100. Sledila je eno-urna inkubacija na 37 °C.

Pufer v vzorcih (supernatanta ali lizata) smo zamenjali z 100 mM natrijevim fosfatnim pufrom pH 8,5. Za izmenjavo smo uporabili filtrske vstavke MWCO 3.000, na katerih smo vzorce skoncentrirali do 100 μl. Vsakemu vzorcu smo dodali 3 mg NHS-tridevtero-acetata in inkubirali pri 30 °C. Postopek smo ponovili in po končani acetilaciji dodali še 4 μl NH_2OH, da bi preprečili morebitno treoninsko in serinsko O-trideutero-acetilacijo. Nato smo dodali 2 mg glicina v vsak vzorec, jih skoncentrirali na 100 μl in dodali 8 M ureo, tako je bila končna koncentracija večja kot 6 M. Nato smo dodali 1 M DTT do končne koncentracije 10 mM, inkubirali 1 uro pri 50 °C. Sledila je alkilacija z

jodoacetamidom končne koncentracije 55 mM 1 uro na sobni temperaturi v temi. Za tem smo dodali 1 M DTT končne koncentracije 5 mM in inkubirali 1 uro na sobni temperaturi. Pufer smo nato zamenjali z 25 mM NH_4HCO_3 pH 7,8, tako da končna koncentracija uree ni presegala 1 M. Sledila je prekonočna tripsinizacija pri 37 °C. Nato smo s centrifugiranjem na filtrskih vstavkih MWCO 10.000 izolirali peptidno frakcijo. Sledila je frakcionalizacija na SAX-C18-stopenjskih tipih (proben opis metode je naveden v publikaciji [170]) in koncentriranje v vakuumskem koncentratorju do končnega volumna 15 µl. Shema priprave vzorcev za določevanje cepitvenih mest je prikazana na sliki 10.



Slika 10: *Shema protokola za določitev cepitvenih mest cisteinskih katepsinov.*

3.2.18 Analiza vzorcev z nano LC-MS/MS

Tekočinsko kromatografijo s tandemsko masnospektroskopsko analizo (LC-MS/MS) smo izvedli z EASY-nanoLCII HPLC enoto (Thermo Scientific), ki je bila sklopljena z masnim spektrometrom Orbitrap LTQ Velos (Thermo Scientific). Peptidni vzorec smo najprej naložili na C_{18} lovilno kolono (Proxeon Easy-Column^{TM}, dolžina 2 cm, notranji premer 100 μm, 5 μm 120 Å, C_{18}-A1 kroglice) s pomočjo topila A (0,1% mravljična kislina). Nato smo ga ločili na 10 cm dolgi analitski koloni C_{18} PicoFritTM AQUASIL (notranji premer 75 μm, 5 μm 120 Å, C18 kroglice). Sledila je elucija peptidov z 90-minutnim linearnim gradientom 5-50% topila B (0,1% mravljinčna kislina v acetonitrilu), s pretokom mobilne faze 300 nl/min. Spektre MS smo posneli z analizatorjem orbitrap z masnim razponom 300-2000 m/z in z ločljivostjo 30000. Spektre MS/MS smo pridobili s HCD fragmentacijo devetih najbolj intenzivnih prekurzorskih ionov (z normalizirano kolizijsko energijo pri 35), pri analizi vzorcev za določevanje cepitenih mest pa smo uporabili fragmentacijo CID. Z dinamičnim izključevanjem smo vsak spekter peptida, ki je bil posnet dvakrat zaporedoma, za 120 sekund izločili iz postopka snemanja.

3.2.19 Analiza masnospektroskopskih podatkov

Za iskanje po bazi podatkov in kvantifikacijo s spektralnim štetjem smo uporabili proteomski programski paket MaxQuant (različica 2.0.18) z vgrajenim iskalnikom Andromeda [171, 172]. Iskanje zadetkov je potekalo v človeški IPI (mednarodni proteinski indeks) proteinski bazi podatkov, različica v.385. Specifičnost cepitev je bila nastavljena za tripsin z največ dvema zgrešenima mestoma cepitve. Kot stalno modifikacijo smo uporabili karbamidometilacijo cisteinov, medtem ko sta bili metioninska oksidacija in N-terminalna acetilacija opredeljeni kot variabilni modifikaciji.

Pri analizi vzorcev, kjer smo primarne amine označili z NHS-tridevtero-acetatom, smo uporabili semi-ArgC nastavitev specifičnosti, pri čemer smo dopustili eno zgrešeno cepitev. Nastavitve iskanja so vključevale D_3-acetilacijo N-koncev in oksidacijo metionina kot variabilno modifikacijo in D_3-acetilacijo lizinov in karbamidometilacijo cisteinov kot fiksno modifikacijo.

Toleranca za napako določitve mase prekurzorskih ionov in produktov fragmentacije je bila 6 oziroma 20 ppm. Stopnjo napačne prepoznave (*angl.* false discovery rate – FDR) pa smo postavili na 1% za identifikacije peptidov in proteinov. MaxQuant peptide dodeli skupinam in ne posameznim proteinom. Za pozitivno identifikacijo smo tako šteli vsako proteinsko skupino, ki sta ji bila dodeljena vsaj dva peptida.

Za relativno kvantifikacijo proteinov v vzorcih smo uporabili metodo spektralnega štetja [173]. Razmerje med številom spektrov (*angl.* spectral count ratio – SCR) smo izračunali kot število posnetih MS/MS spektrov proteina v vzorcu, tretiranim s katepsinom, ulomljeno s številom posnetih MS/MS spektrov proteina v negativni kontroli. Število MS/MS spektrov vseh proteinov smo med primerjavo podatkov povečali za ena, da smo se izognili deljenju s številom 0. Kot proteine s spremenjeno prisotnostjo v tretiranem vzorcu smo obravnavali le tiste, ki se jim je SCR spremenil za vsaj 3-krat glede na negativno kontrolo. Dodaten pogoj je bila ponovljiva določitev v vzorcih v vseh treh bioloških ponovitvah inkubacije s katepsini.

Pri določevanju cepitvenih mest katepsinov smo kot tarče upoštevali peptide z označevalcem na N-koncu (acetilacija z NHS-tridevtero-acetatom), ki so bili prisotni v tretiranih vzorcih, niso pa bili prisotni v negativni kontroli.

Analizo GeneOntology smo izvedli z g:Profiler web interface [174].

3.2.20 Diferenciacija monocitov U-937 v makrofage

V eno jamico plošče z dvanajstimi jamicami smo nasadili $7x10^5$ celic monocitnega limfoma U-937. Po 48-uri diferenciaciji z 30 nM forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA) v makrofage je sledila 24-urna regeneracija v mediju brez PMA.

3.2.21 Ko-kulture MDA-MB-231 in diferenciranih U-937

Celice U-937 smo po prehodno opisanem postopku diferencirali v makrofage. Celice raka dojke MDA-MB-231 smo gojili do konfluence, nato smo jih odlepili z raztopino za brezencimsko odlepljanje celic. $1,4x10^6$ celic smo resuspendirali v pufru PBS za cepitev proteinov s površine (pH 6,0; 0,5 mM DTT) in jih dodali v jamico plošče, iz katere smo predhodno odstranili medij in jo dvakrat sprali s pufrom PBS. Tumorske celice in makrofage smo ko-kultivirali 2 uri v inkubatorju. Pufer smo nato pobrali, centrifugirali 5 minut pri 500 rcf, zavrgli pelet in centrifugirali še enkrat 30 minut pri maksimalnih obratih. Prisotnost odcepljenih zunanjih domen membranskih proteinov v supernatantu smo nato dokazali z imunodetekcijo. Proteine smo ločili na poliakrilamidni gelski elektroforezi z dodanim denaturantom natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE) in jih z metodo western prenesli na nitrocelulozno membrano. Z uporabo specifičnih protiteles proti zunanjim domenam membranskih proteinov smo detektirali njihovo prisotnost v supernatantu, kot je opisano v poglavju 3.2.15. Uporabili smo pet negativnih kontrol: diferencirane celice U-937 (makrofagi) in celice MDA-MB-231, z ali brez dodanim 25 μM E-64 pred poskusom ter ko-kulturo z dodanim E-64 v končni koncentraciji 50 μM. Prav tako smo kot dodatno kontrolo inkubirali tudi diferencirane celice U-937 in celice MDA-MB-231 v pufru PBS za cepitev proteinov s površine (pH 6,0; 0,5 mM DTT).

3.2.22 Test migracije

Konfluentne celice MDA-MB-231 smo 48 ur stradali v mediju DMEM brez FBS-ja z dodatkom 1% nutridome in 1% glutamina. Celice smo nato odlepili z raztopino za brezencimsko odlepljanje celic. $4,2x10^4$ celic na posamezen vzorec smo inkubirali v 100 μl pufra PBS za cepitev proteinov s površine (pH 6,0 ali 7,4; 0,5 mM DTT) s katepsinom B, S ali L (0,2 ali 0,02 μM) ali inhibiranim katepsinom (0,2 μM katepsin, 1 uro predinkubiran z 20 μM E-64) kot negativno kontrolo. Po desetih minutah inkubacije na 37 °C smo pufer zamenjali z medijem DMEM brez FBS-ja z dodatkom 1% nutridome in 1% glutamina. Celice smo prenesli v vstavke za testiranje migracije v plošče s 24 jamicami. Vstavek ima na dnu PET membrano s porami premera 8 μm. Kot kemoatraktant smo uporabili 10% FBS. Po štiridesetih urah smo s hemocitometrom prešteli celice, ki so migrirale preko por vstavka na ploščo.

3.2.23 Test invazivnosti

Konfluentne celice MDA-MB-231 smo stradali 48 ur v mediju DMEM brez FBS-ja z dodatkom 1% nutridome in 1% glutamina. Celice smo nato odlepili z brezencimsko disociacijsko raztopino. $4,2x10^4$ celic na posamezen vzorec smo inkubirali v 100 μl pufra PBS za cepitev proteinov s površine (pH 6,0; 0,5 mM DTT) s katepsinom B, S ali L (0,2 μM) ali inhibiranim katepsinom (0,2 μM katepsin, 1 uro predinkubiran z 20 μM E-64) kot negativno kontrolo. Po desetih minutah inkubacije na 37 °C smo pufer zamenjali za medij DMEM brez FBS-ja z dodatkom 1% nutridome in 1% glutamina. Celice smo prenesli v vstavke za testiranje invazivnosti v ploščah s 24 jamicami. Vstavek ima na dnu polikarbonatno membrano s porami premera 8 μm, ki je prevlečena z ECMatrix™.

Slednji služi kot model zunajceličnega matriksa. Kot kemoatraktant smo uporabili FBS. Po šestih urah smo s fluorimetrom za mikrotitrske plošče (Tecan Infinite M1000 Pro) z barvilom CyQuant GR® detektirali celice, ki so prišle skozi membrano v ECMatrix™.

3.2.24 Svetlobna mikroskopija

Konfluentne celice MDA-MB-231 na plošči s 24 jamicami smo dvakrat sprali s PBS. Nato smo v vsako jamico dodali 500 µl pufra PBS z 0,5 mM DTT in katepsinom S ali L v končni koncentraciji 1 µM. V kontrolne jamice katepsina nismo dodali. Nato smo celice opazovali pod svetlobnim mikroskopom (Olympus IX81, 100x povečava). Slike smo posneli takoj po dodatku pufra s katepsinoma in po tri- in deset-minutni inkubaciji.

3.2.25 Test Ras GTP-azne aktivnosti

Celice MDA-MB-231 smo gojili do konfluentnosti. $3x10^4$ celic na paralelko smo inkubirali v 300 µl pufra PBS za cepitev proteinov s površine (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z rekombinantnima katepsinoma L ali S (končna koncentracija je bila 0,05 µM). Kot negativno kontrolo smo uporabili celice, inkubirane z 0,05 µM katepsinom, ki je bil predhodno eno uro inhibiran z 20 µM E-64. Po enourni inkubaciji na 37 °C smo pripravili popolne celične lizate. Uporabili smo 100 µg proteinov za ELISA kemiluminiscenčni test po navodilih proizvajalca (Active Motif). Imobiliziran protein Ras je bil označen z anti-Ras protitelesi (specifična za človeški H-Ras in K-Ras). Količino proteina Ras v vzorcih smo določili s kemiluminiscenčno meritvijo (Tecan Infinite M1000 Pro), vsak poskus pa je bil izveden v treh bioloških ponovitvah.

3.2.26 Priprava topnih ekstraktov nevroendokrinih tumorjev trebušne slinavke (tumorski model RIP1-Tag2), ki so se razvili v miših divjega tipa in v miših z izbitim genom za katepsin B ali S

Topni ekstrakti so bili pripravljeni iz tumorjev miši divjega tipa, miši z izbitim genom za katepsin B in miši z izbitim genom za katepsin S. Vsak tumor smo stehtali in ga homogenizirali na ledu v Douncejevem homogenizatorju v ledeno hladnem pufru PBS z 0,5 mM EDTA. Volumen pufra je bil odvisen od mase tumorja, dodan pa je bil v razmerju 700 µl pufra na 1 mg tumorja. Homogenizat smo nato centrifugirali 30 minut na maksimalnih obratih pri 4 °C. Sledila je detekcija odcepljenih zunanjih domen membranskih proteinov s specifičnimi protitelesi v supernatantu, kot je opisano v poglavju Detekcija proteinov s prenosom western. Aktin je bil uporabljen kot nanašalna kontrola.

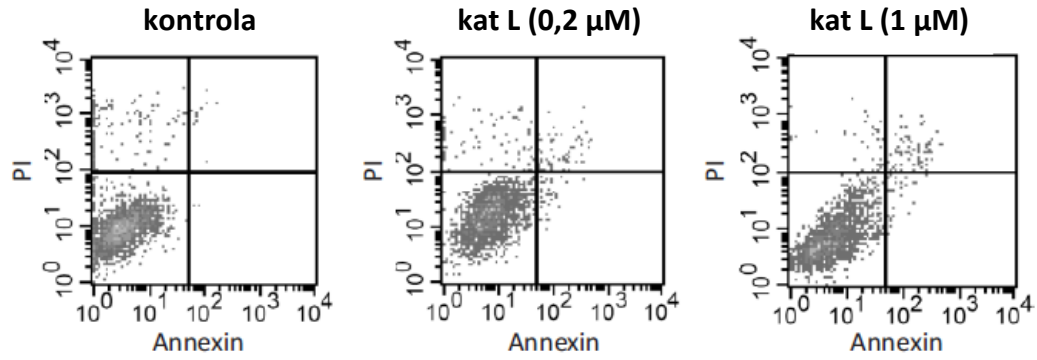
4 Rezultati

4.1 Zunajcelična vloga katepsinov

4.1.1 Procesiranje intaktnih celic MDA-MB-231 s katepsini L, S in B

Da bi lahko bolje razumeli, kakšno vlogo imajo cisteinski katepsini, potem ko se sprostijo v zunajcelični prostor, smo izdelali metodo za identifikacijo njihovih substratov, ki se nahajajo na zunanji strani celične membrane.

Najprej smo intaktne celice raka dojke MDA-MB-231 inkubirali s človeškimi rekombinantnimi katepsini L, S in B. Določili smo optimalni čas inkubacije (60 minut) in koncentracijo katepsinov (1 in 0,2 µM). S pretočno citometrijo, smo potrdili, da inkubacija v izbranih pogojih ne vpliva na viabilnost celic (slika 11).



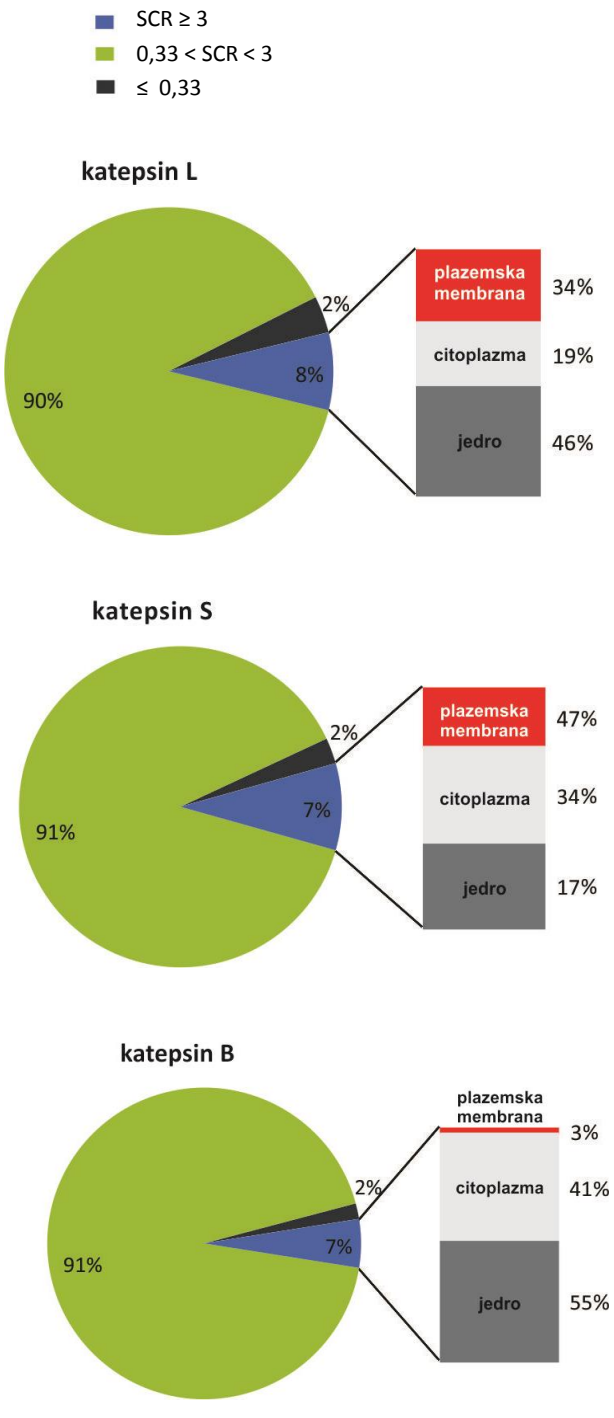
Slika 11: *Živost celic MDA-MB-231 po inkubaciji s katepsinom L.* Intaktne celice smo 1 uro inkubirali s katepsinom L (1 ali 0,2 µM) v PBS (pH 6,0; 0,5 mM DTT) pri 37 °C. Inhibiran katepsin (dodan 20 µM E-64) smo uporabili kot negativno kontrolo. Žive celice po inkubaciji so prikazane kot PI (propidijev jodid, ki se veže v DNA; obarva mrtve celice) in Annexin (barvilo Annexin-PE, ki se veže na fosfatidilserin na membranah; obarva apoptotske celice) negativne celice. Živost celic je skoraj popolnoma enaka v kontroli kot v vzorcih, tretiranih s katepsinom L.

Izvedli smo več neodvisnih bioloških ponovitev (tri za katepsina S in L ter dve za katepsin B), kot negativno kontrolo pa smo uporabili katepsine, ki so bili predhodno inhibirani s splošnim inhibitorjem cisteinskih proteaz E-64.

4.1.2 Določitev zunajceličnih substratov cisteinskih katepsinov L, S in B v celični liniji MDA-MB-231

Z masno spektrometrijo in z uporabo spektralnega štetja smo identificirali sproščene proteinske domene v supernatantu celic, ki smo jih inkubirali s katepsini. Število posnetih spektrov peptidov identificiranih proteinov v vzorcih je neposredno povezano s količino zunajceličnih domen, ki se sprostijo v supernatant. Zato je identifikacija zunajceličnih substratov izhajala iz relativnih razlik v številu posnetih spektrov (*angl.* spectral count ratio – SCR) med kontrolo in tretiranimi vzorci [173].

Potencialni kandidati za membranske substrate cisteinskih katepsinov so morali zadostiti dvema pogojema. Njihov SCR je moral biti višji od 3 (njihova prisotnost je morala biti znatno povečana v tretiranih vzorcih v primerjavi z negativno kontrolo) in morali so biti membranskega izvora (slika 12).



relativna razlika v razmerju preštetih spektrov (SCR)	število identificiranih proteinov
≥ 3	**26**
0,33<SCR<3	304
≤0,33	8

lokalizacija proteina	število identificiranih proteinov
plazemska membrana	**9**
citoplazma	5
jedro	12

relativna razlika v razmerju preštetih spektrov (SCR)	število identificiranih proteinov
≥ 3	**23**
0,33<SCR<3	283
≤0,33	5

lokalizacija proteina	število identificiranih proteinov
plazemska membrana	**11**
citoplazma	8
jedro	4

relativna razlika v razmerju preštetih spektrov (SCR)	število identificiranih proteinov
≥ 3	**34**
0,33<SCR<3	446
≤0,33	11

lokalizacija proteina	število identificiranih proteinov
plazemska membrana	**1**
citoplazma	14
jedro	19

Slika 12: *Določitev zunajceličnih substratov cisteinskih katepsinov z masno spektrometrijo*. Intaktne celice MDA-MB-231 smo tretirali z aktivnimi katepsini L, S ali B. Kot negativno kontrolo smo uporabili katepsine, inhibirane z E-64. Tortni diagrami za katepsine L, S in B prikazujejo razmerje med proteini z nespremenjeno prisotnostjo (z relativno razliko v razmerju preštetih spektrov (SCR) med 0,3 in 3), z znižano prisotnostjo (s SCR-jem manjšim ali enakim 0,33) in povišano prisotnostjo (s SCR-jem večjim ali enakim 3) v vzorcih po tretiranju s katepsini v primerjavi z negativno kontrolo. Proteini s SCR-jem večjim od 3 so dalje razdeljeni glede na njihovo lokalizacijo (membrana, citoplazma in jedro). Tabele pod ustreznim tortnim diagramom številčno prikazujejo število identificiranih proteinov, ki so razdeljeni glede na SCR, in proteine s SCR-jem nad 3, razdeljene glede na njihovo lokalizacijo v celici.

Z masno spektrometrijo smo določili 9 membranskih substratov katepsina L in 11 substratov katepsina S, ki so bili prisotni v vseh treh bioloških ponovitvah (tabela 9). S primerjavo podatkov smo nadalje ugotovili, da oba katepsina cepita isto skupino 13 membranskih proteinov. Štiri substrate katepsina L in dva substrata katepsina S smo detektirali v dveh od treh ponovitvah poskusa (tabela 9).

Tabela 9: *Seznam potencialnih substratov cisteinskih katepsinov, ki se nahajajo na membrani in imajo vsaj trikrat povečan SCR (relativna razlika v številu preštetih spektrov glede na kontrolo).* Za vsak protein je navedena teoretična molekulska masa zunajcelične domene in skupno število identificiranih peptidov. Sledi SCR za vsako posamezno biološko ponovitev. Eksperimenti s katepsinoma L in S so bili izvedeni v triplikatu, s katepsinom B pa v duplikatu. SCR substratov so v vseh replikatih višji od 3, kar kaže, da je procesiranje teh proteinov s katepsini zelo ponovljivo. Receptor za epidermalni rastni faktor in nektinu podoben protein nista bila identificirana v eni biološki ponovitvi. L1CAM in transferinski receptor sta imela vrednost SCR pod tri v dveh oziroma eni biološki ponovitvi.

ime proteina	molekulska masa zunajcelične domene [kDa]	število identificiranih peptidov	SCR kat L			SCR kat S			SCR kat B	
aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (ALCAM)	56	16	18	4,4	10	3,3	4,2	6,6	x	x
alkalna fosfodiesteraza 1 (ENPP1)	92	14	11,5	15	39	4,6	4,5	24	x	x
antigen CD44 (CD44)	70	3	15	4,4	4,2	5,25	20	26	x	x
celični površinski glikoprotein MUC18 (MUC18)	60	5	7	3	10	12	8	6	x	x
dejavnik pospeševanja razgradnje CD55 (CD55)	41	12	20	15	59	12	11	14	x	x
receptor epidermalnega rastnega faktorja (EGFR)	69	8	14	10	26	16	5	x	x	x
efrinski receptor tipa A2	57	6	25	41	53	5	35	15	x	x
celična adhezijska molekula L1 (L1CAM)	123	20	14	2	28,3	14	1	10,5	x	x
nektinu podoben protein 5	36	2	x	7	11	3,5	13	6	x	x
nevropilin 1	93	16	30	12,8	15,8	23	6	6,8	4,6	7,5
pleksin A1	135	9	14	12	23	8	6	8	x	x
pleksin B2	131	11	15	23	22	12	27	6	x	x
transferinski receptor 1	75	25	8	2	8,5	9	5,6	12,3	x	x

Identificirani peptidi posameznih substratov so izključno na njihovih zunajceličnih regijah (slika 13), kar še dodatno potrjuje, da izhajajo le iz odcepljenih zunajceličnih domen.

aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo *(izooblika 1)*

MESKGASSCRLLFCLLISATVFRPGLGWYTVNSAYGDTIIIPCRLDVPQNLMFGKWKYEKPDGSPVFIAFRSSTKKSVQYDDV
PEYKDRLNLSENYTLSISNARISDEKRFVCMLVTEDNVFEAPTIVKVFKQPSKPEIVSKALFLETEQLKKLGDCISEDSYPDGNI
TWYRNGKVLHPLEGAVVIIFKKEMDPVTQLYTMTSTLEYKTTKADIQMPFTCSVTYYGPSGQKTIHSEQAVFDIYYPTEQVTI
QVLPPKNAIKEGDNITLKCLGNGNPPPEEFLFYLPGQPEGIRSSNTYTLTDVRRNATGDYKCSLIDKKSMIASTAITVHYLDLSL
NPSGEVTRQIGDALPVSCTISASRNATVVWMKDNIRLRSSPSFSSLHYQDAGNYVCETALQEVEGLKKRESLTLIVEGKPQIK
MTKKTDPSGLSKTIICHVEGFPKPAIQWTITGSGSVINQTEESPYINGRYYSKIIISPEENVTLTCTAENQLERTVNSLNVSAISIPE
HDEADEISDENREKVNDQAKL***IVGIVVGLLLAALVAGVVYWL***YMKKSKTASKHVNKDLGNMEENKKLEENNHKTEA

alkalna fosfodiesteraza 1

MERDGCAGGGSRGGEGGRAPREGPAGNGRDRGRSHAAEAPGDPQAAASLLAPMDVGEEPLEKAARARTAKDPNTYK***VLSL
VLSVCVLTTILGCIFGL***KPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSL
CACSDDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTK
NMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVE
INGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKEL
NLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKH
FLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCD
LLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYG
RPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQ
LNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSLENLRQKRRVIRNQEILI
PTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDIL
KLKTHLPTFSQED

antigen CD44 *(izooblika 1)*

QIDLNITCRFAGVFHVEKNGRYSISRTEAADLCKAFNSTLPTMAQMEKALSIGFETCRYGFIEGHVVIPRIHPNSICAANNTGV
YILTSNTSQYDTYCFNASAPPEEDCTSVTDLPNAFDGPITITIVNRDGTRYVQKGEYRTNPEDIYPSNPTDDDVSSGSSSERSSTS
GGYIFYTFSTVHPIPDEDSPWITDSTDRIPATTLMSTSATATETATKRQETWDWFSWLFLPSESKNHLHTTTQMAGTSSNTISA
GWEPNEENEDERDRHLSFSGSGIDDDEDFISSTISTTPRAFDHTKQNQDWTQWNPSHSNPEVLLQTTTRMTDVDRNGTTAYE
GNWNPEAHPPLIHHEHHEEEETPHSTSTIQATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPKEDSHSTTGTAAASAHTSHPMQ
GRTTPSPEDSSWTDFFNPISHPMGRGHQAGRRMDMDSSHSITLQPTANPNTGLVEDLDRTGPLSMTTQQSNSQSFSTSHEGLE
EDKDHPTTSTLTSSNRNDVTGGRRDPNHSEGSTTLLEGYTSHYPHTKESRTFIPVTSAKTGSFGVTAVTVGDSNSNVNRSLSG
DQDTFHPSGGSHTTHGSESDGHSHGSQEGGANTTSGPIRTPQIPE***WLIILASLLAL***ALILAVCIAVNSRRRCGQKKKLVINSGNG
AVEDRKPSGLNGEASKSQEMVHLVNKESSETPDQFMTADETRNLQNVDMKIGV

celični površinski glikoprotein MUC 18

VPGEAEQPAPELVEVEVGSTALLKCGLSQSQGNLSHVDWFSVHKEKRTLIFRVRQGQGQSEPGEYEQRLSLQDRGATLALTQ
VTPQDERIFLCQGKRPRSQEYRIQLRVYKAPEEPNIQVNPLGIPVNSKEPEEVATCVGRNGYPIPQVIWYKNGRPLKEEKNRVH
IQSSQTVESSGLYTLQSILKAQLVKEDKDAQFYCELNYRLPSGNHMKESREVTVPVFYPTEKVWLEVEPVGMLKEGDRVEIR
CLADGNPPPHFSISKQNPSTREAEEETTNDNGVLVLEPARKEHSGRYECQGLDLDTMISLLSEPQELLVNYVSDVRVSPAAPE
RQEGSSLTLTCEAESSQDLEFQWLREETGQVLERGPVLQLHDLKREAGGGYRCVASVPSIPGLNRTQLVNVAIFGPPWMAFK
ERKVWVKENMVLNLSCEASGHPRPTISWNVNGTASEQDQDPQRVLSTLNVLVTPELLETGVECTASNDLGKNTSILFLELVN
LTTLTPDSNTTTGLSTSTASPHTRANSTSTERKLPEPESRG***VVIVAVIVCILVLAVLGAVLYFLY***KKGKLPCRRSGKQEITLPPSR
KSELVVEVKSDKLPEEMGLLQGSSGDKRAPGDQGEKYIDLRH

dejavnik pospeševanja razgradnje CD55 *(izooblika 2)*

MTVARPSVPAALPLLGELPRLLLLVLLCLPAVWGDCGLPPDVPNAQPALEGRTSFPEDTVITYKCEESFVKIPGEKDSVICLKG
SQWSDIEEFCNRSCEVPTRLNSASLKQPYITQNYFPVGTVVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCKKKSCPNPG
EIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYAC
NKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPTTEVSPTSQKTTTKTTTPNAQATRSTPVSRTT
KHFHETTPNKGSGTTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT

receptor epidermalnega rastnega dejavnika

LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLENLQIIR
GNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQK
CDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPLMLY
NPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSI
NATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFS
LAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPR
DCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGEN
NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPS***IATGMVGALLLLLVVALGIGLFM***RRRHIVRKRTLRRLLQE
RELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASV
DNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQH
VKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERL
PQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADE
YLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNGLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPA
GSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKP
NGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA

efrinski receptor tipa A2

QGKEVVLLDFAAAGGELGWLTHPYGKGWDLMQNIMNDMPIYMYSVCNVMSGDQDNWLRTNWVYRGEAERIFIELKFTVR
DCNSFPGGASSCKETFNLYYAESDLDYGTNFQKRLFTKIDTIAPDEITVSSDFEARHVKLNVEERSVGPLTRKGFYLAFQDIGA
CVALLSVRVYYKKCPELLQGLAHFPETIAGSDAPSLATVAGTCVDHAVVPPGGEEPRMHCAVDGEWLVPIGQCLCQAGYEK
VEDACQACSPGFFKFEASESPCLECPEHTLPSPEGATSCECEEGFFRAPQDPASMPCTRPPSAPHYLTAVGMGAKVELRWTPP
QDSGGREDIVYSVTCEQCWPESGECGPCEASVRYSEPPHGLTRTSVTVSDLEPHMNYTFTVEARNGVSGLVTSRSFRTASVSI
NQTEPPKVRLEGRSTTSLSVSWSIPPPQQSRVWKYEVTYRKKGDSNSYNVRRTEGFSVTLDDLAPDTTYLVQVQALTQEGQG
AGSKVHEFQTLSPEGSGN***LAVIGGVAVGVVLLLVLAGVGFFI***HRRRKNQRARQSPEDVYFSKSEQLKPLKTYVDPHTYEDPN
QAVLKFTTEIHPSCVTRQKVIGAGEFGEVYKGMLKTSSGKKEVPVAIKTLKAGYTEKQRVDFLGEAGIMGQFSHHNIIRLEGV
ISKYKPMMIITEYMENGALDKFLREKDGEFSVLQLVGMLRGIAAGMKYLANMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSR
VLEDDPEATYTTSGGKIPIRWTAPEAISYRKFTSASDVWSFGIVMWEVMTYGERPYWELSNHEVMKAINDGFRLPTPMDCPS
AIYQLMMQCWQQERARRPKFADIVSILDKLIRAPDSLKTLADFDPRVSIRLPSTSGSEGVPFRTVSEWLESIKMQQYTEHFMA
AGYTAIEKVVQMTNDDIKRIGVRLPGHQKRIAYSLLGLKDQVNTVGIPI

celična adhezijska molekula L1 *(izooblika 1)*

IQIPEEYEGHHVMEPPVITEQSPRRLVVFPTDDISLKCEASGKPEVQFRWTRDGVHFKPKEELGVTVYQSPHSGSFTITGNNSN
FAQRFQGIYRCFASNKLGTAMSHEIRLMAEGAPKWPKETVKPVEVEEGESVVLPCNPPPSAEPLRIYWMNSKILHIKQDERVT
MGQNGNLYFANVLTSDNHSDYICHAHFPGTRTIIQKEPIDLRVKATNSMIDRKPRLLFPTNSSSHLVALQGQPLVLECIAEGFP
TPTIKWLRPSGPMPADRVTYQNHNKTLQLLKVGEEDDGEYRCLAENSLGSARHAYYVTVEAAPYWLHKPQSHLYGPGETA
RLDCQVQGRPQPEVTWRINGIPVEELAKDQKYRIQRGALILSNVQPSDTMVTQCEARNRHGLLLANAYIYVVQLPAKILTAD
NQTYMAVQGSTAYLLCKAFGAPVPSVQWLDEDGTTVLQDERFFPYANGTLGIRDLQANDTGRYFCLAANDQNNVTIMANL
KVKDATQITQGPRSTIEKKGSRVTFTCQASFDPSLQPSITWRGDGRDLQELGDSDKYFIEDGRLVIHSLDYSDQGNYSCVASTE
LDVVESRAQLLVVGSPGPVPRLVLSDLHLLTQSQVRVSWSPAEDHNAPIEKYDIEFEDKEMAPEKWYSLGKVPGNQTSTTLK
LSPYVHYTFRVTAINKYGPGEPSPVSETVVTPEAAPEKNPVDVKGEGNETTNMVITWKPLRWMDWNAPQVQYRVQWRPQG
TRGPWQEQIVSDPFLVVSNTSTFVPYEIKVQAVNSQGKGPEPQVTIGYSGEDYPQAIPELEGIEILNSSAVLVKWRPVDLAQVK
GHLRGYNVTYWREGSQRKHSKRHIHKDHVVVPANTTSVILSGLRPYSSYHLEVQAFNGRGSGPASEFTFSTPEGVPGHPEAL
HLECQSNTSLLLRWQPPLSHNGVLTGYVLSYHPLDEGGKGQLSFNLRDPELRTHNLTDLSPHLRYRFQLQATTKEGPGEAIVR
EGGTMALSGISDF***GNISATAGENYSVVSWVPKEGQC***NFRFHILFKALGEEKGGASLSPQYVSYNQSSYTQWDLQPDTDYEIHL
FKERMFRHQMAVKTNGTGRVRLPPAGFATE

nektinu-podoben protein 5

WPPPGTGDVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMAVFHQTQGPSYSESKRLEFVAARLG
AELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVDIWLRVLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHS
DLGGMPNTSQVPGFLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSISGYDNNWYLGQNEAT
LTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPINTTLICNVTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGISRN***AIIF
LVLGILVFLILLGIGIYFYW***SKCSREVLWHCHLCPSSTEHASASANGHVSYSAVSRENSSSQDPQTEGTR

nevropilin 1

FRNDKCGDTIKIESPGYLTSPGYPHSYHPSEKCEWLIQAPDPYQRIMINFNPHFDLEDRDCKYDYVEVFDGENENGHFRGKFC
GKIAPPPVVSSGPFLFIKFVSDYETHGAGFSIRYEIFKRGPECSQNYTTPSGVIKSPGFPEKYPNSLECTYIVFVPKMSEIILEFESF
DLEPDSNPPGGMFCRYDRLEIWDGFPDVGPHIGRYCGQKTPGRIRSSSGILSMVFYTDSAIAKEGFSANYSVLQSSVSEDFKC
MEALGMESGEIHSDQITASSQYSTNWSAERSRLNYPENGWTPGEDSYREWIQVDLGLLRFVTAVGTQGAISKETKKKYYVK
TYKIDVSSNGEDWITIKEGNKPVLFQGNTNPTDVVVAVFPKPLITRFVRIKPATWETGISMRFEVYGCKITDYPCSGMLGMVS
GLISDSQITSSNQGDRNWMPENIRLVTSRSGWALPPAPHSYINEWLQIDLGEEKIVRGIIIQGGKHRENKVFMRKFKIGYSNNG
SDWKMIMDDSKRKAKSFEGNNNYDTPELRTFPALSTRFIRIYPERATHGGLGLRMELLGCEVEAPTAGPTTPNGNLVDECDD
DQANCHSGTGDDFQLTGGTTVLATEKPTVIDSTIQSEFPTYGFNCEFGWGSHKTFCHWEHDNHVQLKWSVLTSKTGPIQDHT
GDGNFIYSQADENQKGKVARLVSPVVYSQNSAHCMTFWYHMSGSHVGTLRVKLRYQKPEEYDQLVWMAIGHQGDHWKE
GRVLLHKSLKLYQVIFEGEIGKGNLGGIAVDDISINNHISQEDCAKPADLDKKNPEIKIDETGSTPGYEGEGEGDKNISRKPGN
VLKTLDP***ILITIIAMSALGVLLGAVCGVVL***YCACWHNGMSERNLSALENYNFELVDGVKLKKDKLNTQSTYSEA

pleksin A1

EAGLPRAGGGSQPPFRTFSASDWGLTHLVVHEQTGEVYVGAVNRIYKLSGNLTLLRAHVTGPVEDNEKCYPPPSVQSCPHGL
GSTDNVNKLLLLDYAANRLLACGSASQGICQFLRLDDLFKLGEPHHRKEHYLSSVQEAGSMAGVLIAGPPGQGQAKLFVGTP
IDGKSEYFPTLSSRRLMANEEDADMFGFVYQDEFVSSQLKIPSDTLSKFPAFDIYYVYSFRSEQFVYYLTLQLDTQLTSPDAAG
EHFFTSKIVRLCVDDPKFYSYVEFPIGCEQAGVEYRLVQDAYLSRPGRALAHQLGLAEDEDVLFTVFAQGQKNRVKPPKESA
LCLFTLRAIKEKIKERIQSCYRGEGKLSLPWLLNKELGCINSPLQIDDDFCGQDFNQPLGGTVTIEGTPLFVDKDDGLTAVAAY
DYRGRTVVFAGTRSGRIRKILVDLSNPGGRPALAYESVVAQEGSPILRDLVLSPNHQYLYAMTEKQVTRVPVESCVQYTSCE
LCLGSRDPHCGWCVLHSICSRRDACERADEPQRFAADLLQCVQLTVQPRNVSVTMSQVPLVLQAWNVPDLSAGVNCSFEDF
TESESVLEDGRIHCRSPSAREVAPITRGQGDQRVVKLYLKSKETGKKFASVDFVFYNCSVHQSCLSCVNGSFPCHWCKYRHV
CTHNVADCAFLEGRVNVSEDCPQILPSTQIYVPVGVVKPITLAARNLPQPQSGQRGYECLFHIPGSPARVTALRFNSSSLQCQN
SSYSYEGNDVSDLPVNLSVVWNGNFVIDNPQNIQAHLYKCPALRESCGLCLKADPRFECGWCVAERRCSLRHHCAADTPAS
WMHARHGSSRCTDPKILKLSPETGPRQGGTRLTITGENLGLRFEDVRLGVRVGKVLCSPVESEYISAEQIVCEIGDASSVRAH
DALVEVCVRDCSPHYRALSPKRFTFVTPTFYRVSPSRGPLSGGTWIGIEGSHLNAGSDVAVSVGGRPCSFSWRNSREIRCLTPP
GQSPGSAPIIININRAQLTNPEVKYNYTEDPTILRIDPEWSINSGGTLLTVTGTNLATVREPRIRAKYGGIERENGCLVYNDTTM
VCRAPSVANPVRSPPELGERPDELGFVMDNVRSLLVLNSTSFLYYPDPVLEPLSPTGLLELKPSSPLILKGRNLLPPAPGNSRLN
YTVLIGSTPCTLTVSETQLLCEAPNLTGQHKVTVRAGGFEFSPGTLQVYSDSLLTLPLYAKDIPNYKSWVERYYADIAKMPAI
SDQDMSAYLAEQSRLHLSQFNSMSALHEIYSYITKYKDEILAALEKDEQARRQRLRSKLEQVVDTMALSS***AIVGIGGGGGLLL
LVIVAVLI***AYKRKSRDADRTLKRLQLQMDNLESRVALECKEAFAELQTDIHELTNDLDGAGIPFLDYRTYAMRVLFPGIEDHP
VLKEMEVQANVEKSLTLFGQLLTKKHFLLTFIRTLEAQRSFSMRDRGNVASLIMTALQGEMEYATGVLKQLLSDLIEKNLES
KNHPKLLLRRTESVAEKMLTNWFTFLLYKFLKECAGEPLFMLYCAIKQQMEKGPIDAITGEARYSLSEDKLIRQQIDYKTLTL
NCVNPENENAPEVPVKGLDCDTVTQAKEKLLDAAYKGVPYSQRPKAADMDLEWRQGRMARIILQDEDVTTKIDNDWKRL
NTLAHYQVTDGSSVALVPKQTSAYNISNSSTFTKSLSRYESMLRTASSPDSLRSRTPMITPDLESGTKLWHLVKNHDHLDQRE
GDRGSKMVSEIYLTRLLATKGTLQKFVDDLFETIFSTAHRGSALPLAIKYMFDFLDEQADKHQIHDADVRHTWKSNCLPLRF
WVNVIKNPQFVFDIHKNSITDACLSVVAQTFMDSCSTSEHKLGKDSPSNKLLYAKDIPNYKSWVERYYADIAKMPAISDQDM
SAYLAEQSRLHLSQFNSMSALHEIYSYITKYKDEILAALEKDEQARRQRLRSKLEQVVDTMALSS

pleksin B2

LRPRKLDFFRSEKELNHLAVDEASGVVYLGAVNALYQLDAKLQLEQQVATGPALDNKKCTPPIEASQCHEAEMTDNVNQLL
LLDPPRKRLVECGSLFKGICALRALSNISLRLFYEDGSGEKSFVASNDEGVATVGLVSSTGPGGDRVLFVGKGNGPHDNGIIVS
TRLLDRTDSREAFEAYTDHATYKAGYLSTNTQQFVAAFEDGPYVFFVFNQQDKHPARNRTLLARMCREDPNYYSYLEMDL
QCRDPDIHAAAFGTCLAASVAAPGSGRVLYAVFSRDSRSSGGPGAGLCLFPLDKVHAKMEANRNACYTGTREARDIFYKPF
HGDIQCGGHAPGSSKSFPCGSEHLPYPLGSRDGLRGTAVLQRGGLNLTAVTVAAENNHTVAFLGTSDGRILKVYLTPDGTSS
EYDSILVEINKRVKRDLVLSGDLGSLYAMTQDKVFRLPVQECLSYPTCTQCRDSQDPYCGWCVVEGRCTRKAECPRAEEAS
HWLWSRSKSCVAVTSAQPQNMSRRAQGEVQLTVSPLPALSEEDELLCLFGESPPHPARVEGEAVICNSPSSIPVTPPGQDHVA
VTIQLLLRRGNIFLTSYQYPFYDCRQAMSLEENLPCISCVSNRWTCQWDLRYHECREASPNPEDGIVRAHMEDSCPQFLGPSP
LVIPMNHETDVNFQGKNLDTVKGSSLHVGSDLLKFMEPVTMQESGTFAFRTPKLSHDANETLPLHLYVKSYGKNIDSKLHVT
LYNCSFGRSDCSLCRAANPDYRCAWCGGQSRCVYEALCNTTSECPPPVITRIQPETGPLGGGIRITILGSNLGVQAGDIQRISVA
GRNCSFQPERYSVSTRIVCVIEAAETPFTGGVEVDVFGKLGRSPPNVQFTFQQPKPLSVEPQQGPQAGGTTLTIHGTHLDTGSQ
EDVRVTLNGVPCKVTKFGAQLQCVTGPQATRGQMLLEVSYGGSPVPNPGIFFTYRENPVLRAFEPLRSFASGGRSINVTGQGF
SLIQRFAMVVIAEPLQSWQPPREAESLQPMTVVGTDYVFHNDTKVVFLSPAVPEEPEAYNLTVLIEMDGHRALLRTEAGAFE
YVPDPTFENFTGGVKKQVNKLIHARGTNLNKAMTLQEAEAFVGAERCTMKTLTETDLYCEPPEVQPPPKRRQKRDTTHNLP
EFIVKFGSREWVLGRVEYDTRVSDVP*LSLILPLVIVPMVVVIAVSVV*CYWRKSQQAEREYEKIKSQLEGLEESVRDRCKKEFT
DLMIEMEDQTNDVHEAGIPVLDYKTYTDRVFFLPSKDGDKDVMITGKLDIPEPRRPVVEQALYQFSNLLNSKSFLINFIHTLEN
QREFSARAKVYFASLLTVALHGKLEYYTDIMHTLFLELLEQYVVAKNPKLMLRRSETVVERMLSNWMSICLYQYLKDSAGE
PLYKLFKAIKHQVEKGPVDAVQKKAKYTLNDTGLLGDDVEYAPLTVSVIVQDEGVDAIPVKVLNCDTISQVKEKIIDQVYR

transferinski receptor 1

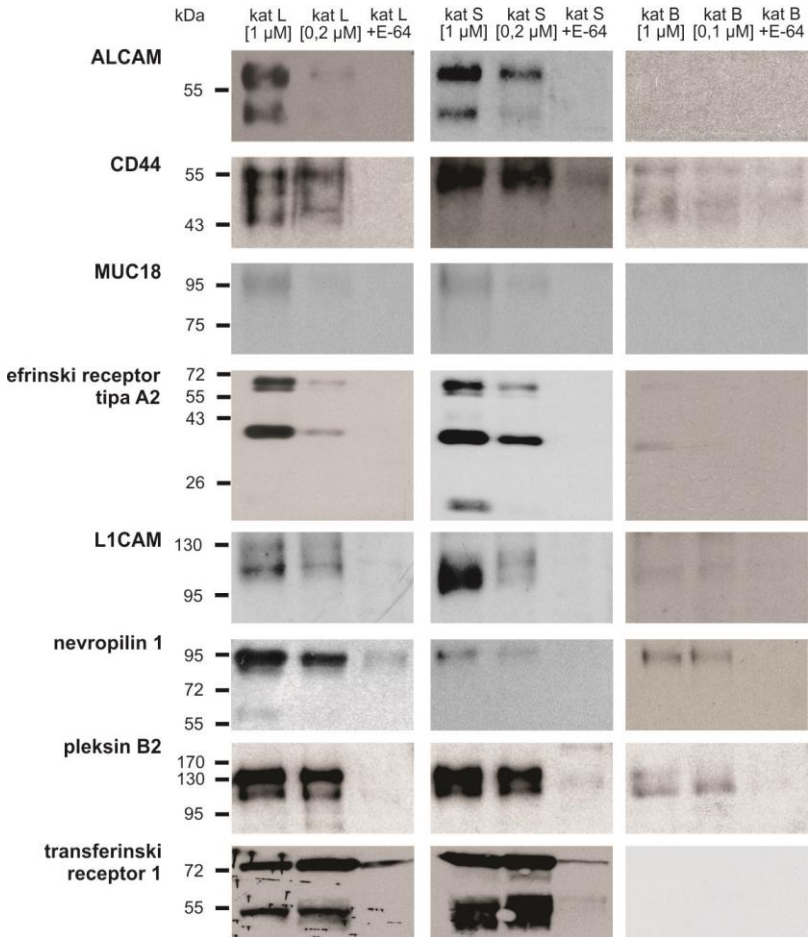
MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSIC*YGTIAVIVFFLIGFM
IGYLGY*CKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENL
ALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFED
LYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLP
NIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAW
GPGAAKSGVGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNF
KVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKEL
IERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTT
DFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQLALAT
WTIQGAANALSGDVWDIDNEF

Slika 13: *Pokritost aminokislinskega zaporedja substratov s peptidi, ki smo jih identificirali z masno spektrometrijo*. Peptidi so na zaporedju označeni zasenčeno. Znotrajceličen del in transmembranska regija, ki je tudi podčrtana, sta rdeče barve. Za vsak substrat smo identificirali več peptidov in vsi so bili izključno na ekstracelularni domeni proteinov. To dodatno potrjuje, da je do cepitve prišlo na površini celice.

Med membranskimi substrati je več predstavnikov imunoglobulinske superdružine molekul za adhezijo celic (*angl*. cell adhesion molecules – CAMs) in številni receptorji. Medtem ko katepsina L in S cepita vse potencialne substrate, pa katepsin B cepi le nevropilin 1. V kontrolah, kjer so katepsini inhibirani z E-64, procesiranja nismo zaznali, kar nakazuje, da so katepsini odgovorni za odstranitev zunajceličnih domen.

Prisotnost cepljenih domen substratov smo neodvisno potrdili tudi z imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi, ki prepoznajo zunajcelične domene proteinov. Tako je za 8 od 13 identificiranih proteinov razvidno, da katepsina L in S na zelo podoben način odcepita stabilne proteinske fragmente z membranskih proteinov (slika 14), velikost večjih fragmentov pa se ujema z velikostjo celotne zunajcelične domene tarčnih proteinov (tabela 9). Nasprotno pa katepsin B ne procesira tarčnih proteinov s cepitvijo zunajceličnih domen (izjema je nevropilin 1).

Zaradi težav s komercialno dostopnostjo ali ustrezno specifičnostjo določenih protiteles dodatna potrditev na imunološkem nivoju za 5 substratov trenutno še ni bila mogoča (za alkalno fosfodiesterazo 1, CD55, EGFR, nektinu podoben protein 5 in pleksin A1).



Slika 14: *Imunodetekcija substratov v celični liniji MDA-MB-231*. Intaktne celice MDA-MB-231 so bile tretirane v PBS-ju (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z aktivnimi katepsini L, S in B ali katepsini, inhibiranimi z E-64 kot negativna kontrola. Odcepljene domene ALCAM-a, CD44, efrinskega receptorja tipa A2, L1CAM-a, MUC18, nevropilina 1, pleksina B2 in transferinskega receptorja 1 smo detektirali s prenosom western in imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi v supernatantu tretiranih celic.

4.1.3 Določitev zunajceličnih substratov cisteinskih katepsinov L in S v drugih celičnih linijah

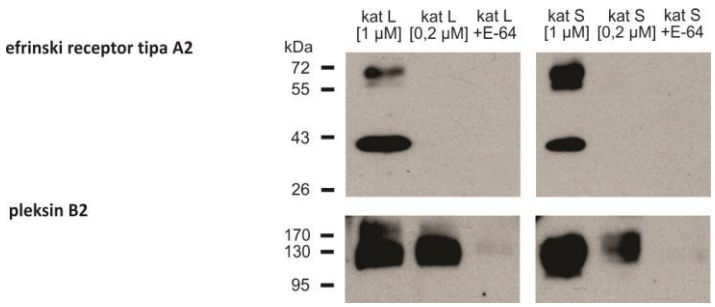
Da bi preverili, kako splošen je proces procesiranja določenih tarč zunajceličnih domen s cisteinskimi katepsini, smo testirali še druge človeške tumorske linije različnega izvora (adenokarcinom trebušne slinavke PANC-1, maligni melanom HT-144, glioblastom multiforme T98-G in adenokarcinom dojke MCF-7). Z masnospektroskopsko metodo in z imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi smo opazili zelo podobne ali identične cepitve s katepsinoma L in S za številne tarče (tabele 11 - 16 in slike 15 - 18), ki smo jih predhodno identificirani na celicah MDA-MB-231 (tabela 9). V ostalih celičnih linijah smo identificirali tudi druge membranske substrate (skupno jih je 45, tabela 17), vključno z drugimi predstavniki iz družine nevropilinov, efrinskih receptorjev in molekul CAM.

Tabela 10: *Seznam substratov cisteinskih katepsinov v celični liniji MDA-MB-231, ki smo jih z masno spektrometrijo določili tudi v drugih celičnih linijah*. Tri substrate, ki smo jih identificirali v liniji MDA-MB-231, smo določili tudi v liniji PANC-1, pet v liniji HT-144, sedem v liniji T98-G in tri v liniji MCF-7. Opazili smo tudi procesiranje sorodnih receptorjev iz iste družine (nevropilinov 1 in 2, efrinskih receptorjev tipa A2 in B4), kar nakazuje, da katepsini preferenčno cepijo nekatere funkcijsko sorodne proteine.

ime proteina	PANC-1	HT-144	T98-G	MCF-7
aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (ALCAM)		x	x	x
antigen CD44 (CD44)		x		
celični površinski glikoprotein MUC18 (MUC18)		x	x	
efrinski receptor tipa A2	x		x	
efrinski receptor tipa B4	x	x		x
celična adhezijska molekula L1 (L1CAM)			x	x
nevropilin 1			x	
nevropilin 2		x		
pleksin B2	x	x	x	x
transferinski receptor 1		x	x	

Tabela 11: *Seznam potencialnih substratov cisteinskih katepsinov v liniji PANC-1, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Za vsak protein je navedeno število identificiranih peptidov in SCR v posameznem poskusu.

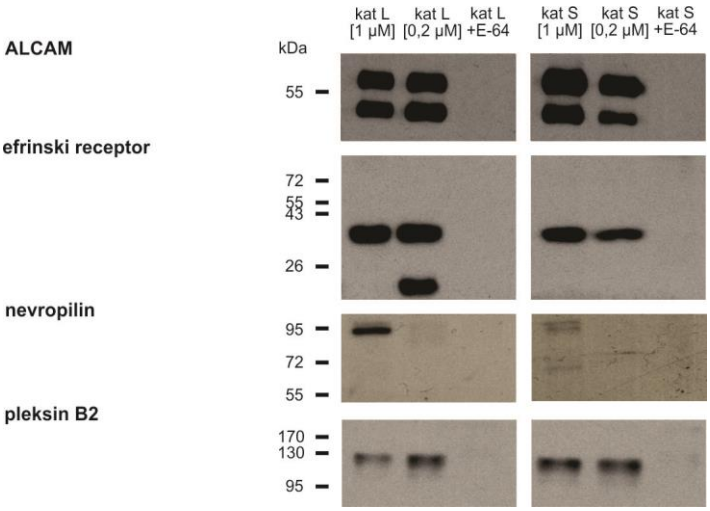
ime proteina	št. identificiranih peptidov		SCR	
	kat L	kat S	kat L	kat S
efrinski receptor tipa A2	2	6	4	13
efrinski receptor tipa B4	2	3	5	6
pleksin B2	3	4	5	8



Slika 15: *Imunodetekcija substratov v celični liniji PANC-1, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Intaktne celice PANC-1 so bile tretirane v PBS-ju (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z aktivnima katepsinoma L in S ali s katepsinoma, inhibiranima z E-64 kot negativna kontrola. Odcepljene domene efrinskega receptorja tipa A2 in pleksina B2 smo detektirali s prenosom western in imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi v supernatantu tretiranih celic.

Tabela 12: *Seznam potencialnih substratov cisteinskih katepsinov v liniji HT-144, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Za vsak protein je navedeno število identificiranih peptidov in SCR v posameznem poskusu. Z masno spektrometrijo smo identificirali efrinski receptor B4 in nevropilin 2, ki sta zelo homologna z efrinskim receptorjem A2 oz. nevropilinom 1.

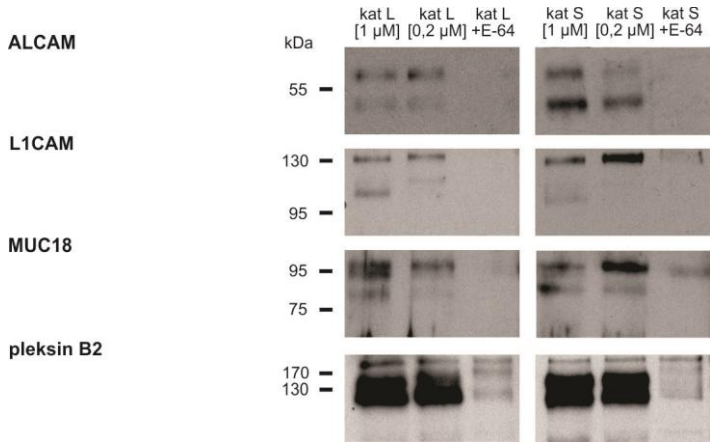
ime proteina	št. identificiranih peptidov		SCR	
	kat L	kat S	kat L	kat S
ALCAM	4	2	10	4
efrinski receptor tipa B4	3	5	7	6
nevropilin 2	7	7	18	14
pleksin B2	10	9	28	23



Slika 16: *Imunodetekcija substratov v celični liniji HT-144, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Intaktne celice HT-144 so bile tretirane v PBS-ju (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z aktivnima katepsinoma L in S ali s katepsinoma inhibiranima z E-64 kot negativna kontrola. Odcepljene domene ALCAM-a, efrinskega receptorja, nevropilina in pleksina B2 smo detektirali s prenosom western in imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi v supernatantu tretiranih celic.

Tabela 13: *Seznam potencialnih substratov cisteinskih katepsinov v liniji T98-G, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Za vsak protein je navedeno število identificiranih peptidov in SCR v posameznem poskusu.

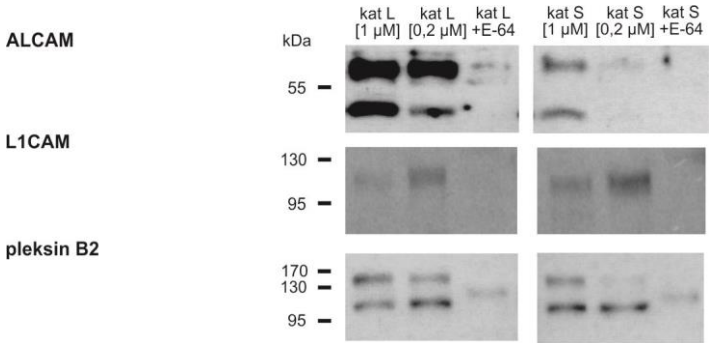
ime proteina	št. identificiranih peptidov		SCR	
	kat L	kat S	kat L	kat S
ALCAM	2	1	6	-
L1CAM	8	7	6	3
MUC18	2	2	5	4
pleksin B2	12	7	21	16



Slika 17: *Imunodetekcija substratov v celični liniji T98-G, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Intaktne celice T-98G so bile tretirane v PBS-ju (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z aktivnima katepsinoma L in S ali s katepsinoma, inhibiranima z E-64 kot negativna kontrola. Odcepljene domene ALCAM-a, L1CAM-a, MUC18 in pleksina B2 smo detektirali s prenosom western in imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi v supernatantu tretiranih celic.

Tabela 14: *Seznam potencialnih substratov cisteinskih katepsinov v liniji MCF-7, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Za vsak protein je navedeno število identificiranih peptidov in SCR v posameznem poskusu.

ime proteina	št. identificiranih peptidov		SCR	
	kat L	kat S	kat L	kat S
ALCAM	4	2	14	8
L1CAM	7	6	13	14
pleksin B2	2	0	4	-



Slika 18: *Imunodetekcija substratov v celični liniji MCF-7, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Intaktne celice MCF-7 so bile tretirane v PBS-ju (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z aktivnima katepsinoma L in S ali s katepsinoma, inhibiranima z E-64 kot negativna kontrola. Odcepljene domene ALCAM-a, L1CAM-a, MUC18 in pleksina B2 smo detektirali s prenosom western in imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi v supernatantu tretiranih celic.

Tabela 15: Celoten s*eznam membranskih proteinov, ki jih katepsina L in S cepita s površine celičnih linij.* A) PANC-1. B) HT-144. C) T98-G. D) MCF-7. Število identificiranih peptidov in ustrezno razmerje med številom posnetih spektrov (SCR) med kontrolo in tretiranim vzorcem je navedeno za posamezni poskus s katepsinoma L in S.

A)
PANC-1

ime proteina	št. peptidov (kat L)	št. peptidov (kat S)	SCR (kat L)	SCR (kat S)
alkalna fosfodiesteraza 1	2	2	4	4
znotrajcelična adhezijska molekula 1	5	2	5	4
efrinski receptor tipa A2	6	2	4	13
perlekan	4	19	6	21,5
nidogen 1	3	15	6	18,5
antigen CD109	31	8	6,5	5
efrinski receptor tipa B4	3	2	5	6
leucil-cistinil aminopeptidaza	6	3	5	7
agrin	2	4	4	7
alfa 5 podenota laminina	13	56	10	85
pleksin B2	4	3	5	8

B)
HT-144

ime proteina	št. peptidov (kat L)	št. peptidov (kat S)	SCR (kat L)	SCR (kat S)
težka veriga celičnega antigena 4F2	5	3	8	5,7
aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (ALCAM)	4	2	10	4
antigen CD44	1	2	127	191
površinski glikoprotein MUC18	6	6	5,25	28
protein 2, ki vsebuje domene diskoidin, CUB in LCCL	3	3	6	8
EMILIN1	8	7	7	7
endoglin	3	4	11	14
efrinski receptor tipa B4	3	5	7	6
melanotransferin	14	10	23,7	41
protein, podoben L-1 nevralni molekuli za celično adhezijo	2	4	3,3	19
nevralna molekula za celično adhezijo	8	9	5,5	27
nevropilin 2	7	7	18	14
perlekan	27	37	8,25	55,5
pleksin B2	10	9	28	23
receptor tipa tirozin-protein fosfataza	13	17	23	67
roundabout homolog 1	4	7	5	7,5
tenascin	13	12	23	45
teneurin 3	10	6	12	12
transferinski receptor 1	3	2	12	7
protein ig-h3, ki ga sproži dejavnik spreminjanjočega dejavnika rasti	3	3	11	5

C)

T98-G

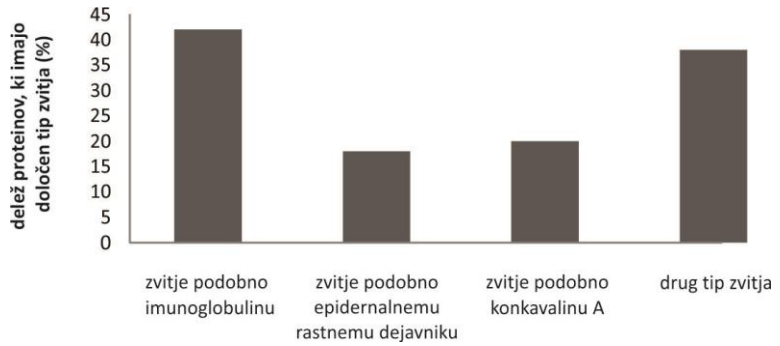
ime proteina	št. peptidov (kat L)	št. peptidov (kat S)	SCR (kat L)	SCR (kat S)
težka veriga celičnega antigena 4F2	10	8	6,1	4,6
aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (ALCAM)	2	1	6	-
veriga kolagen alfa-1(XII)	8	11	12	7
manozni receptor 2 tipa C	10	12	4,2	6,75
efrinski receptor tipa A2	2	2	5	5
fibronektin	32	45	7,2	3,6
protein, ki veže galektin-3	11	8	4,2	14
podenota laminina alfa 4	10	7	5	15
nevropilin 1	10	6	27	12
perlekan	30	31	69	68
pleksin B2	12	7	11	8,5
receptor tipa tirozin-protein fosfataza F	7	6	7,5	13
receptor tipa tirozin-protein fosfataza gama	3	3	9	14
ko-prenašalec natrijevega bikarbonata 3	3	3	11	7
transferinski receptor 1	7	6	4,75	4,75
vazorin	10	9	27	40

D)
MCF-7

ime proteina	št. peptidov (kat L)	št. peptidov (kat S)	SCR (kat L)	SCR (kat S)
aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (ALCAM)	4	2	14	8
receptor za kadherin EGF LAG 2	11	12	23	27
efrinski receptor tipa B4	4	3	10	7
protein zunajceličnega matriksa 2, ki je povezan s FRAS-1	2	4	5	6
protein, ki veže galektin-3	3	2	10	6
celična adhezijska molekula L1	7	6	13	14
nevronska celična adhezijska molekula	2	6	6	6,5
pleksin B2	2	0	4	-
receptor tipa tirozin-protein fosfataza F	13	12	27	23

4.1.4 Strukturna podobnost identificiranih substratov cisteinskih katepsinov

Po sistematičnem pregledu membranskih substratov smo ugotovili, da je veliko proteinov med seboj zelo podobnih oziroma so celo predstavniki iste družine. Zato smo primerjali njihove proteinske domene v bazi podatkov Interpro in ugotovili, da ima več kot 60% procesiranih proteinov imunoglobulinu-, EGF- ali konkavalinu A-podobno zvitje zunajceličnega dela (slika 19).



Slika 19: *Deleži identificiranih proteinov, ki imajo določen tip zvitja*. Več kot 60% substratov katepsinov ima imunoglobulinu-podoben, EGF-podoben ali konkavalinu-A-podoben tip zvitja ali kombinacijo naštetega. Le pri 40% najdemo drugačno strukturo domen.

4.1.5 Določitev mest cepitve katepsinov L in S

Po tem, ko je primerjava tipov zvitja membranskih katepsinskih substratov nakazala, da katepsini preferenčno cepijo določene strukturno podobne skupine proteinov, nas je zanimalo, kje do teh cepitev pride. Takšni podatki, predvsem primarna mesta cepitve, bi nam lahko dali prve informacije o naravi spremembe substratov zaradi procesiranja s katepsini.

Katepsini s svojo proteolitsko aktivnostjo v supernatant sprostijo zunajcelične domene z *neo* N- ali *neo* C-koncem, odvisno od orientacije proteina v membrani. Da bi lahko peptide z *neo* N-kocem, ki so nastali kot posledica katepsinske aktivnosti, ločili od triptičnih peptidov (ki nastanejo po razgradnji proteinov s tripsinom v postopku priprave vzorca), smo po inkubaciji vzorca s katepsini vse proste amino skupine označili z NHS-tridevtero-acetatom. Pri tem se poleg *neo* N-koncev acetelirajo tudi stranske skupine lizinov in N-konci vseh prisotnih proteinov. Zato iz novonastalega N-konca, ki je posledica katepsinske aktivnosti, izvirajo le tridevteroacetilirani poročevalski peptidi, ki so prisotni v tretiranih vzorcih, ne pa tudi v negativni kontroli.

Uporabljen masnospektroskopski pristop FPPS (*angl*. Fast Profiling of Protease Specificity) [170], ki smo ga razvili v naši raziskovalni skupini, omogoča določevanje cepitvenih mest z tridevteroacetilacijo v visoko-kompleksnih vzorcih z majhno količino izhodiščnega materiala. Pomemben korak v postopku je dodatna ločba tripsiniziranih peptidov na SAX-C18- tipih pred analizo z nano LC-MSMS, kar omogoča boljšo identifikacijo z nano LC-MS/MS.

Pri analizi vzorca supernatanta z odcepljenimi proteinskimi domenami s takšno metodo detektiramo primarno cepitev (najbližje membrani) pri proteinih, ki imajo C-konec zunaj celice. V tem primeru katepsini s cepitvijo sprostijo zunajcelično domeno z novonastalim N-koncem v supernatant. Pri proteinih z obratno orientacijo (N-konec zunaj celice) pa lahko določimo le sekundarne cepitve bolj distalno na zunajceličnem delu, saj prva cepitev, ki je najbližje membrani, sprosti novonastali C-konec, novonastali N-konec pa ostane v celični membrani. Da bi zaobšli takšno izgubo novonastalih N-koncev, smo uporabili tudi vzorce celotnih celičnih lizatov, ki so bili inkubirani s katepsinoma L in S.

V tabeli 16 so navedena mesta cepitve substratov linije MDA-MB-231 s katepsinoma L in S, ki smo jih določili z metodo FPPS.

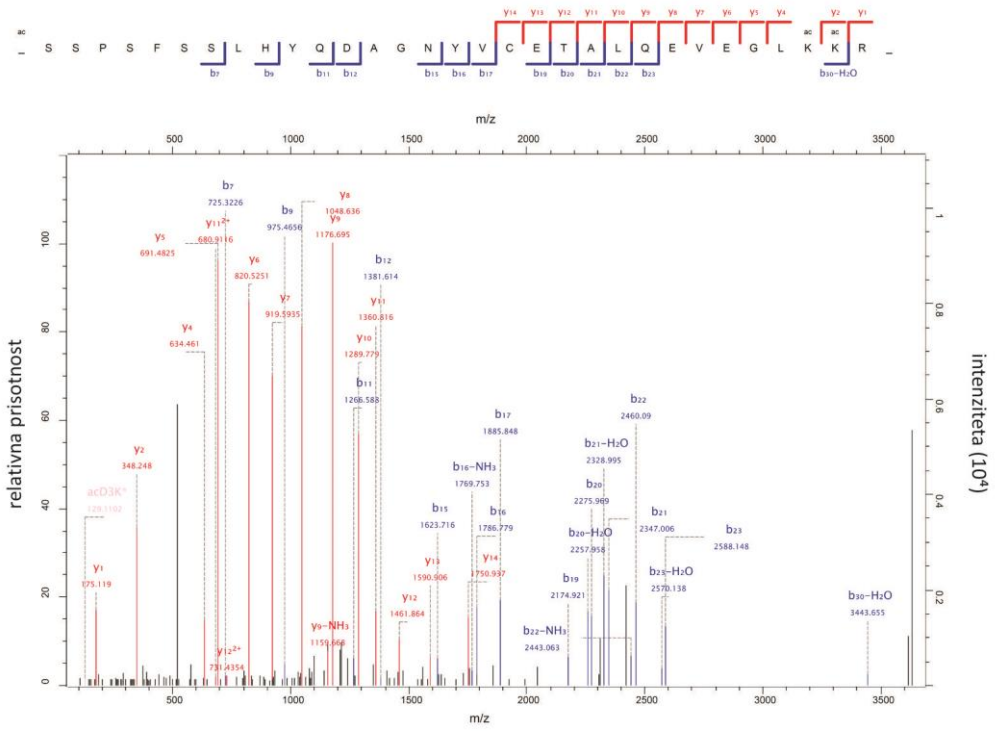
Tabela 16: *Identificirana mesta cepitve substratov za katepsina L in S z uporabo NHS-tridevtero-acetata, ki označi proste N-konce*. Mesto cepitve je označeno s črtkano črto. Na levi strani je šest aminokislin pred cepitvenim mestom. Na desni strani je celotno aminokislinsko zaporedje identificiranega poročevalskega peptida, ki je bil označen z NHS-tridevtero-acetatom. Število nad zaporedjem pomeni mesto cepitve glede na celotno zaporedje proteina. Označeno je tudi, ali smo poročevalski peptid določili v vzorcu supernatanta ali popolnega celičnega lizata.

protein	**mesto cepitve**		**supernatant**	**lizat**
ALCAM	DNIRLR	375 SSPSFSSLHYQDAGNYVCETALQEV	kat L, kat S	/
alkalna fosfodiesteraza 1	TPKHPK	607 EVHPLVQCPFTR	kat L	/
efrinski receptor tipa A2	SDFEAR	160 HVKLNVEER	kat L, kat S	/
	DAPSLA	224 TVAGTCVDHAVVPPGGEEPR	/	kat S
transferinski receptor 1	KESPFR	699 HVFWGSGSHTLPALLENLKLR	kat S	kat S
EGFR	NSCKAT	502 GQVCHALCSPEGCWGPEPR	/	kat L
CD44	GFETCR	78 YGFIEGHVVIPR	/	kat S

Sledijo MS/MS spektri poročevalskih peptidov, posneti v vzorcih supernatanta (slika 20) in vzorcih popolnega celičnega lizata (slika 21) z numeričnimi kazalci zanesljivosti določitve. Slednji potrjujejo visoko kakovost posnetega spektra in zanesljivost identifikacije. Tako je pri vseh napaka pri določitvi mase peptida manjša od 20 ppm, numerična vrednost zanesljivosti identifikacije (*angl*. peptide score) večja od 100 in verjetnost posteriorne napake (*angl*. posterior error probability − PEP) manjša od 0,05.

A)

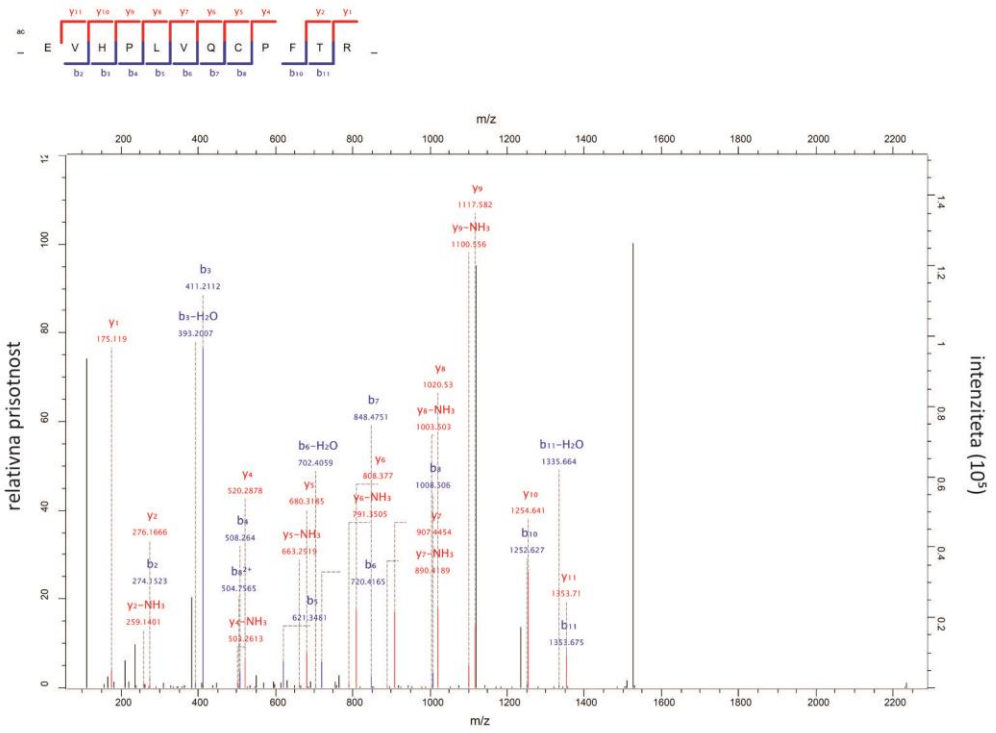
aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (ALCAM)



masa peptida	napaka določitve mase [ppm]	verjetnost posteriorne napake (*angl.* PEP-posterior error probability)	numerična vrednost zanesljivosti (*angl.* peptide score)
3634.7699	-2.32	3.9288×10^{-14}	175.11

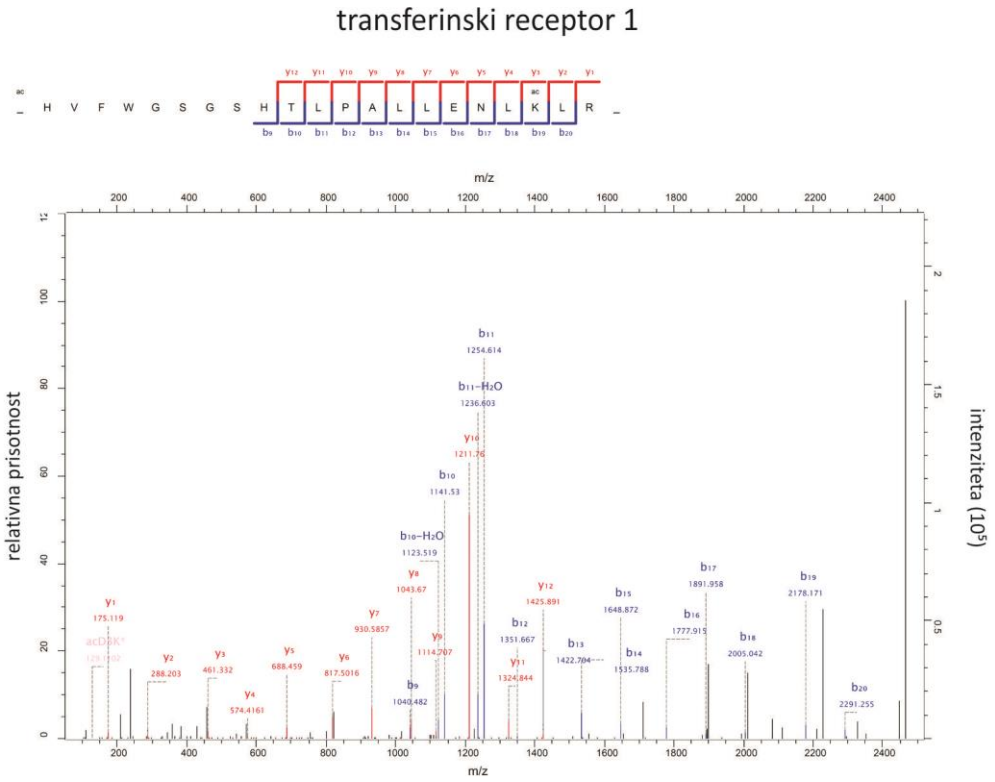
B)

alkalna fosfodiesteraza 1



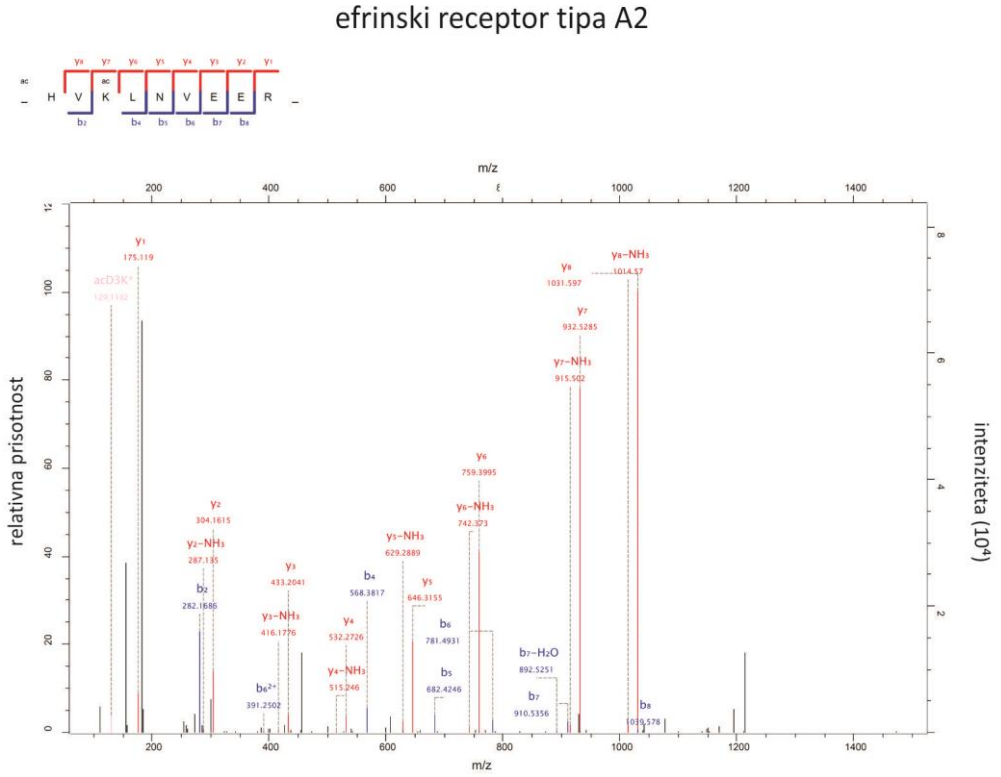
masa peptida	napaka določitve mase [ppm]	verjetnost posteriorne napake (PEP-posterior error probability)	numerična vrednost zanesljivosti (peptide score)
1526.779	-0.97151	$3.8239*10^{-7}$	176.18

C)



masa peptida	napaka določitve mase [ppm]	verjetnost posteriorne napake (PEP-posterior error probability)	numerična vrednost zanesljivosti (peptide score)
2464.3591	-0.273	$6.35*10^{-13}$	166.91

D)

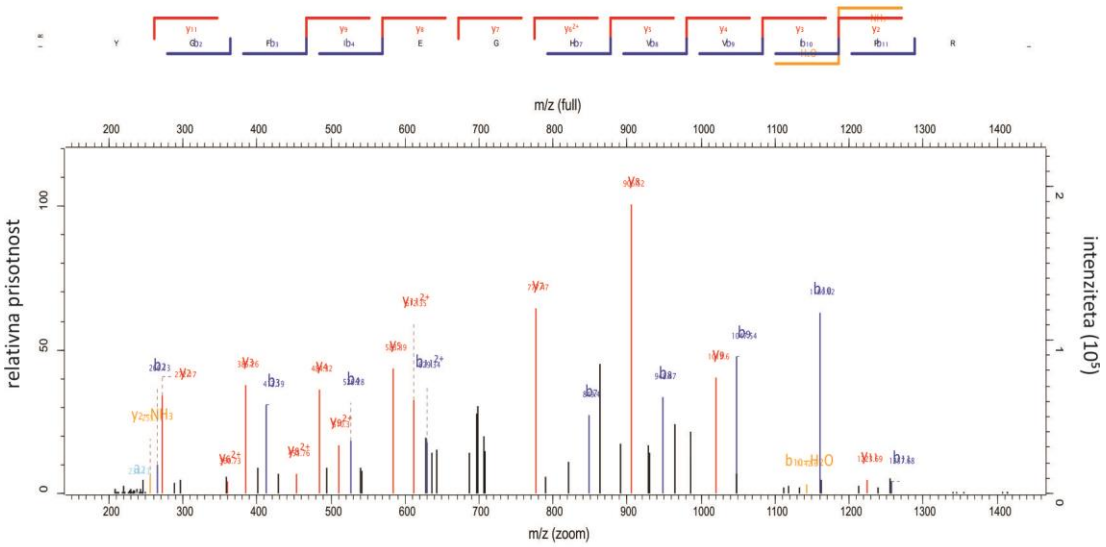


masa peptida	napaka določitve mase [ppm]	verjetnost posteriorne napake (PEP-posterior error probability)	numerična vrednost zanesljivosti (peptide score)
1212.6826	-5.1842	$2.6926*10^{-5}$	164.46

Slika 20: *MS/MS spektri poročevalskih peptidov za mesto cepitve nekaterih substratov, posnetih v vzorcih supernatanta*. A) ALCAM. B) Alkalna fosfodiesteraza. C) Transferinski receptor. D) Efrinski receptor tipa A2. Supernatant z odcepljenimi zunanjimi domenami membranskih peptidov smo ločili na SDS-PAGE. Pred razgradnjo s tripsinom smo proste N-konce blokirali in označili z NHS-tridevtero-acetatom. Tako smo po tripsinizaciji dobili označene poročevalske peptide. Ob njihovi detekciji smo sklepali na mesto cepitve le, če niso bili prisotni v negativni kontroli. Za pozitivno identifikacijo je bila prav tako potrebna visoka kvaliteta MS/MS spektra in zanesljivost identifikacije (numerična vrednost zanesljivosti > 100 in verjetnost posteriorne napake < 0,05). Vsak MS/MS spekter vsebuje podatke o masi peptida, napaki določitve mase, verjetnosti posteriorne napake in numerični vrednosti zanesljivosti pravilne določitve peptida.

A)

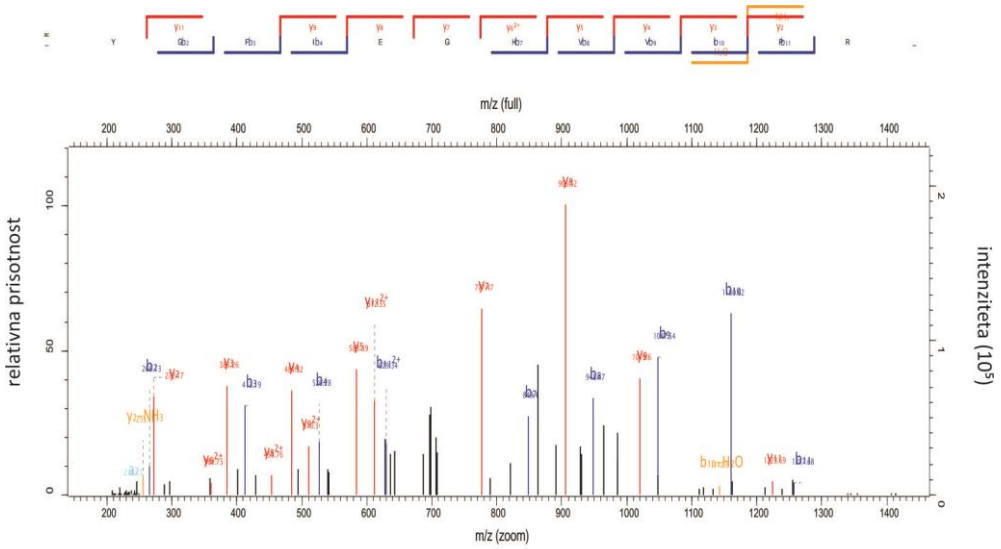
efrinski receptor tipa A2



masa peptida	napaka določitve mase [ppm]	verjetnost posteriorne napake (PEP-posterior error probability)	numerična vrednost zanesljivosti (peptide score)
2092,0133	3,0434	0,0054713	121,77

B)

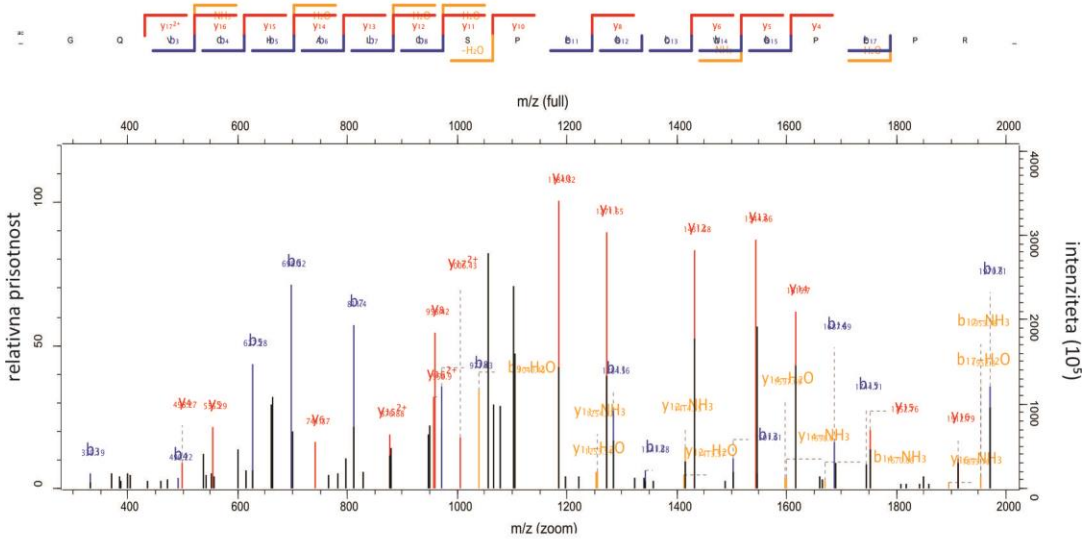
CD 44



masa peptida	napaka določitve mase [ppm]	verjetnost posteriorne napake (PEP-posterior error probability)	numerična vrednost zanesljivosti (peptide score)
1430,7796	0,36136	0,00064443	172,8

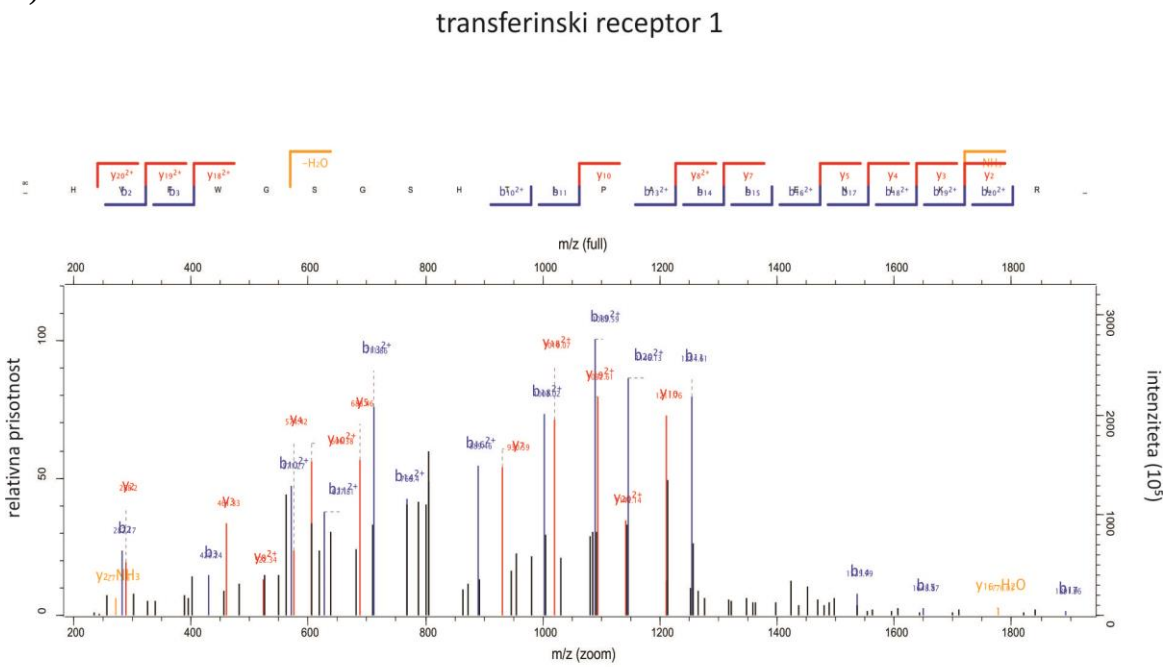
C)

EGFR



masa peptida	napaka določitve mase [ppm]	verjetnost posteriorne napake (PEP-posterior error probability)	numerična vrednost zanesljivosti (peptide score)
2240,964	1,0052	0,00066769	180,31

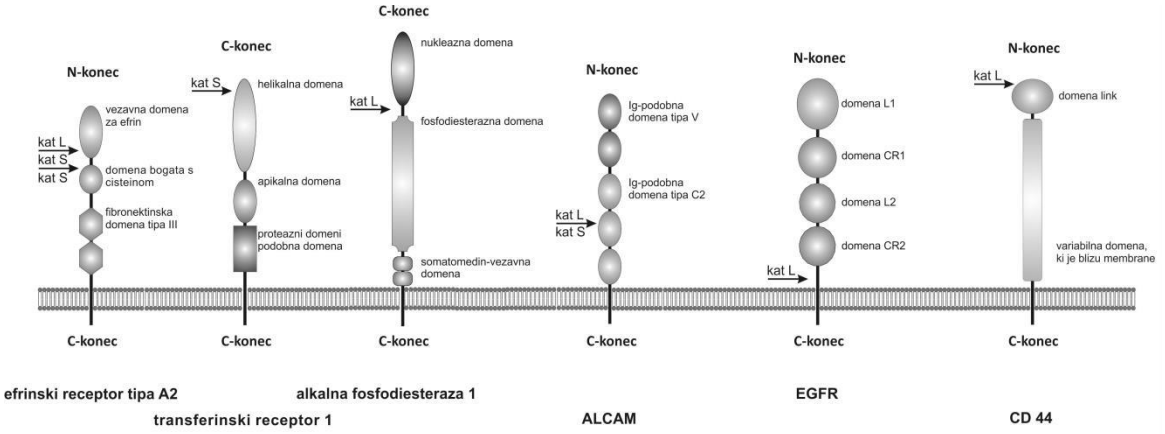
D)



masa peptida	napaka določitve mase [ppm]	verjetnost posteriorne napake (PEP-posterior error probability)	numerična vrednost zanesljivosti (peptide score)
2464,3591	-0,17415	$3{,}18*10^{-8}$	168,07

Slika 21: *MS MS/MS spektri poročevalskih peptidov za mesto cepitve nekaterih substratov, posnetih v vzorcih popolnega celičnega lizata*. A) Efrinski receptor tipa A2. B) CD 44. C) EGFR. D) Transferinski receptor 1. Lizat, ki je bil inkubiran s katepsinom, smo ločili na SDS-PAGE. Pred razgradnjo s tripsinom smo proste N-konce blokirali in označili z NHS-tridevtero-acetatom. Tako smo po tripsinizaciji dobili označene poročevalske peptide. Ob njihovi detekciji smo sklepali na mesto cepitve le, če niso bili prisotni v negativni kontroli. Za pozitivno identifikacijo je bila prav tako potrebna visoka kvaliteta MS/MS spektra in zanesljivost identifikacije (numerična vrednost zanesljivosti > 100 in verjetnost posteriorne napake < 0,05). Vsak MS/MS spekter vsebuje podatke o masi peptida, napaki določitve mase, verjetnosti posteriorne napake in numerični vrednosti zanesljivosti pravilne določitve peptida.

Mesta, kjer katepsina procesirata zunajcelični domene substratov, smo shematsko prikazali na sliki 22.

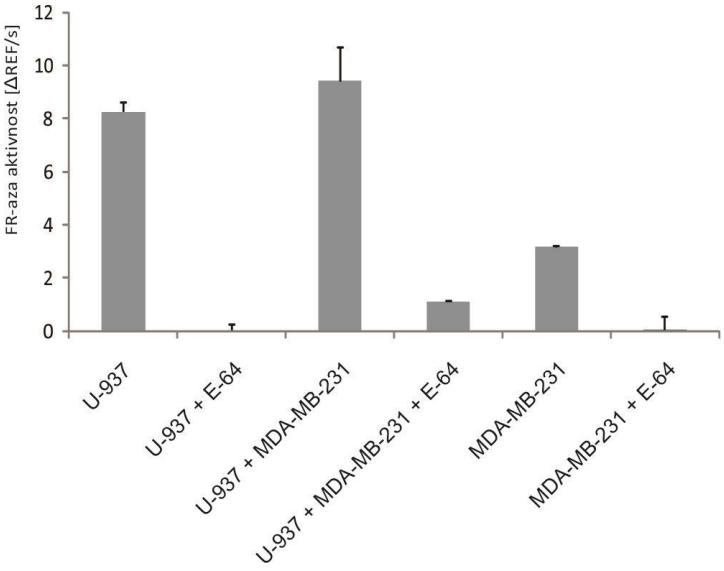


Slika 22: *Shematska ponazoritev identificiranih mest cepitev na zunajceličnih domenah substratov.*

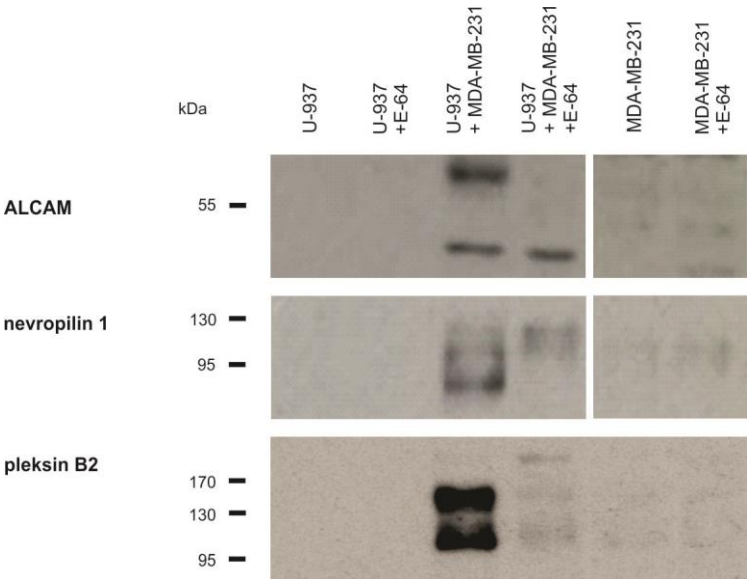
4.1.6 Cepitev zunajceličnih domen v ko-kulturi celic MDA-MB-231 in U-937

Znano je, da so imunske celice, posebej makrofagi, glavni vir katepsinov v tumorskem mikrookolju, kjer s svojim delovanjem pripomorejo k napredovanju tumorja [46, 71]. Zato smo v naslednjem koraku hoteli preveriti, če v bolj fizioloških pogojih z endogenimi katepsini, ki jih izločajo makrofagi, opazimo enake rezultate procesiranja zunajceličnih domen, kot smo jih pridobili pri tretiranju celic z rekombinantnimi katepsini.

V ta namem smo uporabili enostavni model tumorskega mikrookolja, kjer smo ko-kultivirali tumorske celice MDA-MB-231 in makrofage, ki smo jih pripravili z diferenciacijo monocitne linije U-937. Z uporabo splošnega substrata za cisteinske katepsine (N-benzoiloksikarbonil-fenilalanil-arginil-7-amino-4-metilkumarin – Z-FR-AMC) smo potrdili katepsinsko aktivnost v supernatantih ko-kultur, ki v največji meri izvira iz makrofagov (slika 23). Z imunološko detekcijo smo zaznali procesiranje zunanjih domen ALCAM-a, nevropilina 1 in pleksina B2, ki so se sprostile v supernatant ko-kulture. Sproščene zunajcelične domene substratov opazimo le v ko-kulturi tumorskih celic in makrofagov, dodatek E-64 pa procesiranje skoraj popolnoma prepreči (slika 24).

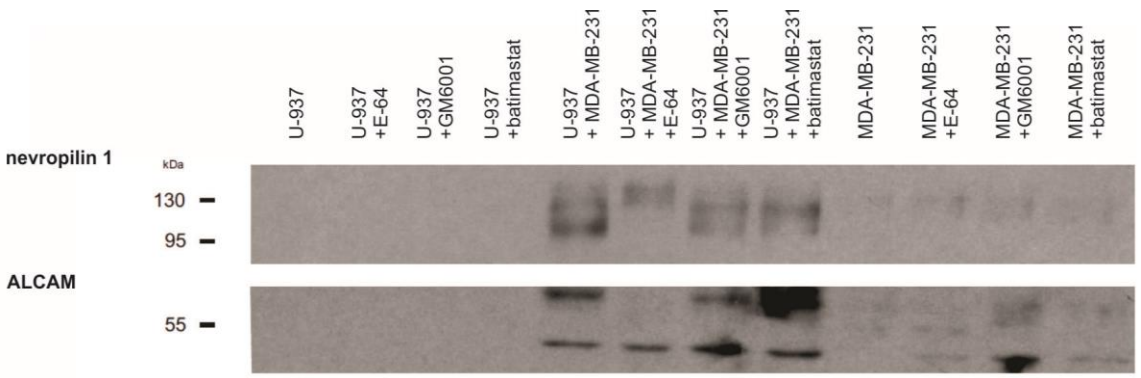


Slika 23: *Aktivnost cisteinskih katepsinov v supernatantu ko-kultur*. Določena je bila kot hidroliza fluorogenega substrata Z-FR-AMC. Stolpični diagrami prikazujejo povprečje ± SD dveh neodvisnih poskusov.



Slika 24: *Imunodetekcija odcepljenih domen v supernatantu ko-kultur*. Celice U-937 smo diferencirali v makrofage in ko-kultivirali s celicami MDA-MB-231. Opazili smo cepitev ALCAM-a, nevropilina 1 in pleksina B2. Velikost odcepljenih domen je v skladu s tistimi, ki jih opazimo po inkubaciji celic MDA-MB-231 z rekombinantnima katepsinoma L in S. Dodatek inhibitorja cisteinskih proteaz (50 μM E-64) prepreči cepitev. Kot dodatni negativni kontroli smo uporabili monokulturi celic U-937 ali MDA-MB-231 z ali brez dodanega E-64. V njih procesiranja nismo zaznali.

Želeli smo izključiti možnost, da metaloproteaze, ki so ene najpomembnejših proteaz, ki sodelujejo pri odcepljanju zunajceličnih domen proteinov [52], pripomorejo k procesiranju katepsinskih substratov na membrani celic. Z uporabo dveh splošnih inhibitorjev metaloproteaz, GM6001 in batimastata, smo pokazali, da inhibicija metaloproteaz nima vpliva na cepitve izbranih substratov, dodatek E-64 pa to deloma ali v celoti prepreči (slika 25). Tako lahko sproščanje ektodomen membranskih proteinov zanesljivo povežemo z aktivnostjo cisteinskih katepsinov.



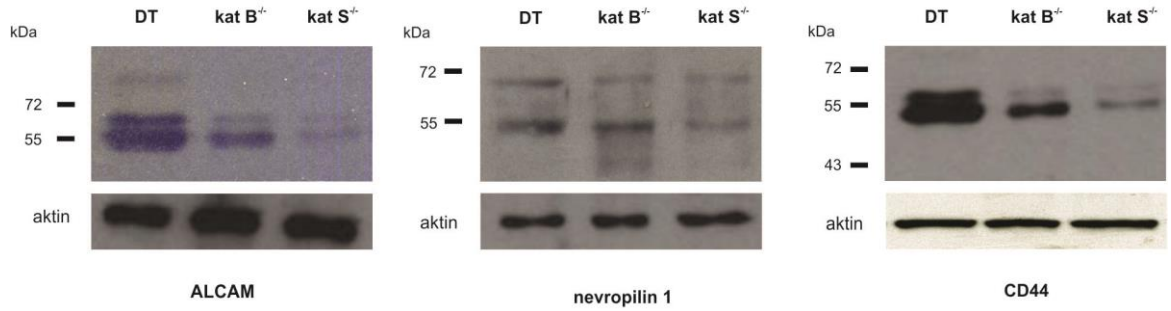
Slika 25: *Imunodetekcija odcepljenih domen v supernatantu ko-kultur*. Celice U-937 so bile diferencirane v makrofage in ko-kultivirane s celicami MDA-MB-231. Opazili smo cepitve ALCAM-a in nevropilina 1. Velikost odcepljenih domen je v skladu s tistimi, ki jih dobimo po inkubaciji MDA-MB-231 celic z rekombinantnima katepsinoma L in S. Dodatek inhibitorja cisteinskih proteaz (50 μM E-64) prepreči cepitev. Kot dodatni negativni kontroli smo uporabili monokulturi celic U-937 ali MDA-MB-231 z ali brez dodanega E-64. V njih cepitev nismo zaznali. Dodatek splošnih inhibitorjev metaloproteaz GM6001 (10 μM) in batimastata (10 μM) ne prepreči cepitev.

4.1.7 Detekcija cepitev substratov *in vivo* v topnih ekstraktih nevroendokrinih tumorjev trebušne slinavke v glodalskem modelu RIP1-Tag2

Po potrditvi procesiranja zunanjih domen proteinov s katepsini v modelu ko-kulture kot osnovnega modela tumorskega okolja *in vitro* smo hoteli preveriti, ali se to dogaja tudi v mikrookolju tumorja *in vivo*. Zato smo izbrali uveljavljen glodalski model RIP1-Tag2 nevroendokrine neoplazije trebušne slinavke [93].

S prenosom western in imunodetekcijo smo zaznali cepitve treh substratov (nevropilina 1, ALCAM-a in CD44) v topnih ekstraktih tumorjev RIP1-Tag2. Velikosti cepljenih fragmentov ALCAM-a in CD44 so bile v skladu z rezultati, ki smo jih dobili na celični liniji MDA-MB-231, le pri nevropilinu 1 so bili detektirani fragmenti manjši.

Izbitje genov za katepsine B, L in S v modelu RIP1-Tag2 znatno zmanjša invazivnost, rast, angiogenezo in zasevanje tumorjev [44]. Zato smo primerjali količino cepitev v tumorjih miši divjega tipa (DT) s tumorji miši z izbitim genom za katepsin B ali katepsin S (slika 26). Izbitje gena za katepsin S v celoti prepreči cepitev ALCAM-a in CD44 ter zmanjša procesiranje nevropilina 1. Medtem pa ima izbitje gena za katepsin B precej manjši vpliv. To je v skladu z majhno sposobnostjo katepsina B za cepitve zunajceličnih domen, ki smo jo opazili v predhodnih *in vitro* poskusih (slika 26).



Slika 26 : *Imunodetekcija odcepljenih domen v tumorjih RIP1-Tag2.* V topnih ekstraktih tumorjev RIP1-Tag2 smo s prenosom western identificirali odcepljene domene ALCAM-a, CD44 in nevropilina 1. Velikost procesiranih zunajceličnih domen je v veliki meri v skladu s podatki, pridobljenimi s tretiranjem celic MDA-MB-231 s katepsinoma S in L. Aktin je bil uporabljen kot nanašalna kontrola.

4.1.8 Funkcijska podobnost identificiranih substratov cisteinskih katepsinov

Funkcijska analiza genov membranskih substratov katepsinov v podatkovni zbirki Gene Ontology (GO anotacija) je pokazala, da je večina genov tarčnih proteinov udeležena v procesih, kot sta migracija in pritrjanje celic, med molekulskimi vlogami pa izstopa signalizacija preko semaforinskih receptorjev. To velja tako za linijo MDA-MB-231 (tabela 17) kot tudi za vse preostale analizirane tumorske linije (tabela 18).

Tabela 17: *GO anotacija identificiranih membranskih substratov za celično linijo MDA-MB-231.* Določili smo jo z mrežnim vmesnikom g:Profiler. Biološki procesi (BP) in vloge molekul (VM) so navedeni po naraščajoči p-vrednosti. Analiza je izvedena za substrate linije MDA-MB-231(13 substratov).

ime pogoja	ID pogoja	vrsta pogoja	št. z njim povezanih genov	delež genov	p-vrednost
migracija celic	GO:0016477	BP	8	0,62	$8{,}0\text{x}10^{-5}$
aktivnost semaforinskih receptorjev	GO:0017154	VM	3	0,23	$3{,}2\text{x}10^{-5}$
receptorska aktivnost	GO:0004872	VM	9	0,69	$1{,}4\text{x}10^{-4}$
pritrjanje celic	GO:0007155	BP	8	0,62	$1{,}1\text{x}10^{-4}$
transmembranska protein tirozin kinazna receptorska aktivnost	GO:0004714	VM	3	0,23	$1{,}7\text{x}10^{-2}$

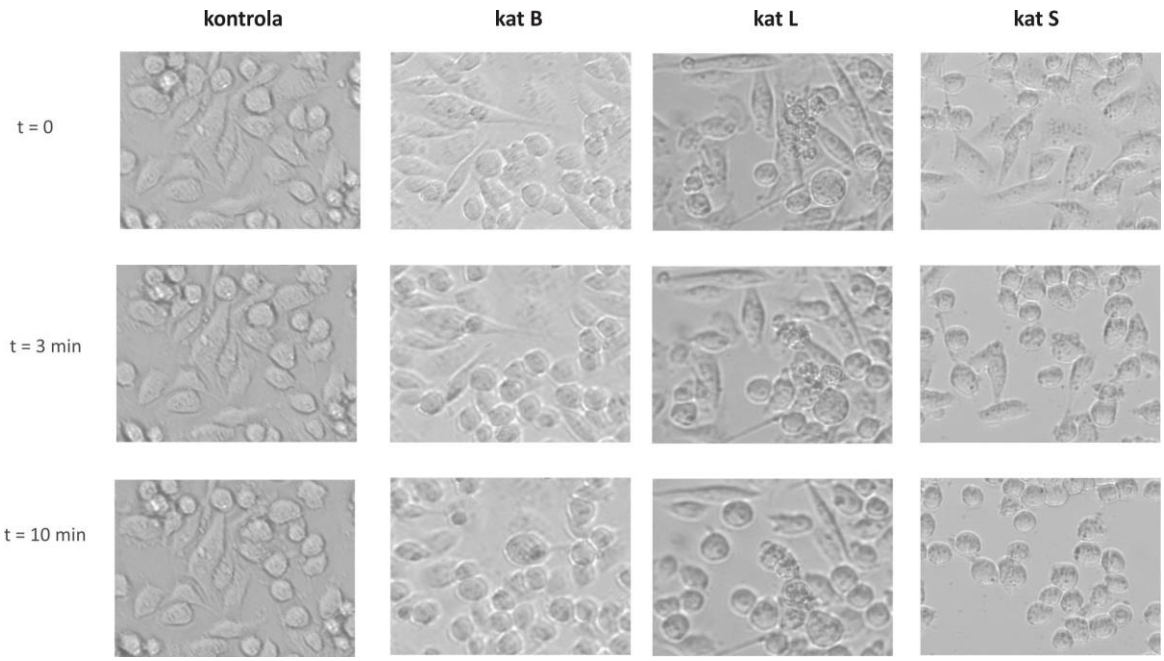
Tabela 18: *GO anotacija genov identificiranih membranskih substratov v vseh analiziranih tumorskih celičnih linijah*. Določili smo jo z mrežnim vmesnikom g:Profiler. Biološki procesi (BP) in vloge molekul (VM) so navedeni po naraščajoči p-vrednosti. Analiza je izvedena za 45 substratov vseh petih analiziranih linij.

ime pogoja	ID pogoja	vrsta pogoja	št. z njim povezanih genov	delež genov	p-vrednost
pritrjanje celic	GO:0007155	BP	8	0,62	$1{,}13 \times 10^{-4}$
nastajanje struktur, vpletenih v morfogenezo	GO:0048646	BP	24	0,56	$4{,}9 \times 10^{-12}$
migracija celic	GO:0016477	BP	17	0,38	$4{,}5 \times 10^{-4}$
aktivnost semaforinskih receptorjev	GO:0017154	VM	4	0,09	$4{,}1 \times 10^{-6}$
vezava glikozaminoglikanov	GO:0005539	VM	6	0,14	$6{,}9 \times 10^{-3}$
signalne poti receptorjev na površini celic	GO:0007166	BP	17	0,38	$2{,}6 \times 10^{-2}$

4.1.9 Vpliv inkubacije tumorskih celic s katepsini na njihovo stopnjo migracije in invazivnost

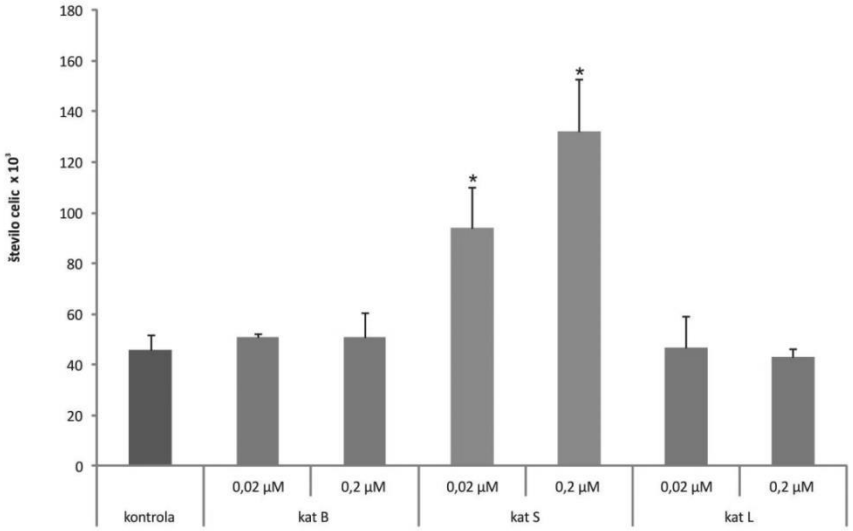
Rezultati GO anotacije substratov katepsinov so pokazali močno povezavo s celično adhezijo in migracijo. To ne preseneča, saj je bilo med identificiranimi substrati več molekul CAM, ki sodelujejo pri pritrjanju celic in v medceličnih stikih. Zato smo preučili ali ima tretiranje površine rakastih celic MDA-MB-231 s cisteinskimi katepsini vpliv na hitrost njihove migracije in invazije.

Najprej smo preverili, ali lahko pride do zmanjšanja medceličnih stikov in adhezije celic. Po dodatku katepsinov B, L ali S (1 μM) pri nevtralnem pH v pufru PBS vidimo, da pri katepsinu S pride do hitrega zaokrožanja celic in zmanjšane adhezivnosti, medtem ko ima katepsin B najšibkejši vpliv (slika 27).



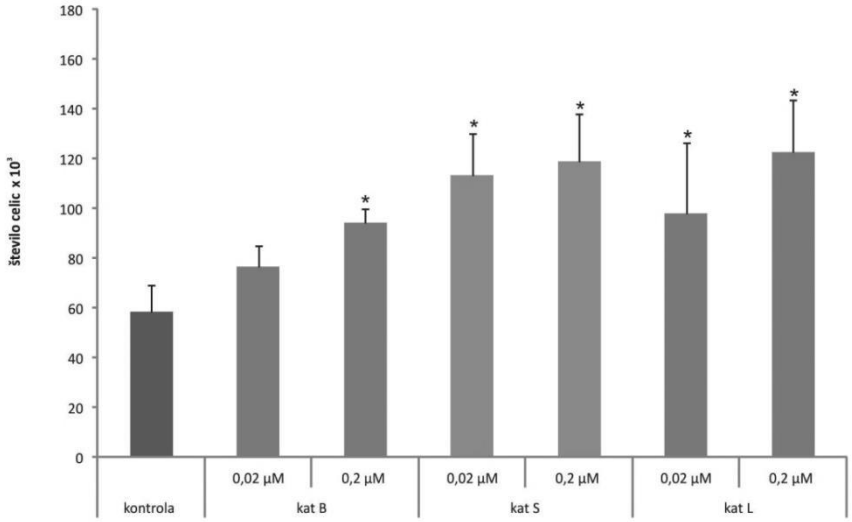
Slika 27: *Zmanjšana adhezija celic po tretiranju s katepsini B, L in S*. Po spiranju konfluentnih celic MBA-MB-231 s PBS smo dodali katepsini B, L ali S (1 μM) v pufru PBS (pH 7,4; 0,5 mM DTT). Negativni kontroli katepsinov nismo dodali. Pod svetlobnim mikroskopom smo posneli slike takoj po zamenjavi medija s PBS (t = 0) ter po 3 in 10 minutah inkubacije z aktivnimi katepsini. Katepsin L, še močneje pa katepsin S, sproži odlepljanje celic že po treh minutah. Celice v kontroli v tem času ostanejo nespremenjene.

Hitro zaokroževanje in odlepljanje celic po dodatku katepsinov nakazuje, da imajo lahko take celice zaradi zvečane mobilnosti višji migracijski in invazivni potencial. Zato smo v naslednjem koraku preverili hitrost migracije skozi membrane PET (polietilen tereftalat). Po inkubaciji s katepsini pri nevtralnem pH je samo katepsin S zvišal nivo migracije (slika 28). To lahko razložimo z večjo stabilnostjo tega encima v nevtralnem pH območju v primerjavi z ostalima dvema katepsinoma [22].



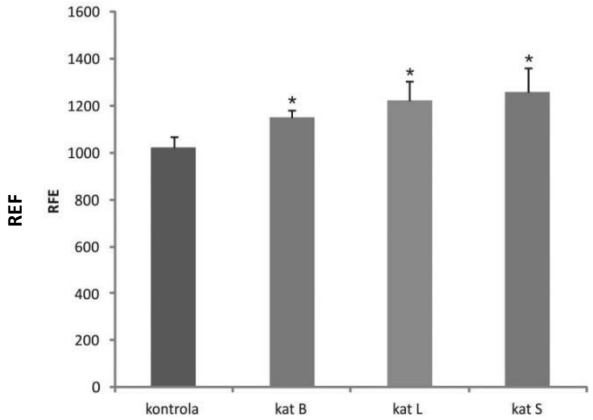
Slika 28: *Migracija celic MDA-MB-231 pri pH 7,4*. Celice MDA-MB-231 (1,4 x 10^6 celic na jamico plošče) smo tretirali z aktivnimi katepsini (0,2 in 0,02 μM) v PBS (pH 7,4; 0,5 mM DTT). V negativno kontrolo nismo dodali katepsina. Po 40 urah smo prešteli celice, ki so prišle skozi PET membrano. *p < 0,05; v primerjavi s kontrolo. Stolpčni diagrami prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

Poskus smo ponovili pri nižjem pH (pH 6), ki bolje ustreza razmeram v rahlo zakisanem tumorskem mikrookolju. Tukaj tako inkubacija s katepsinom S kot tudi s katepsinom L znatno zviša migracijo, medtem ko je učinek katepsina B manjši in značilno različen le pri višji koncentraciji (slika 29).



Slika 29: *Migracija celic MDA-MB-231 pri pH 6,0.* Celice MDA-MB-231 (1,4 x 10^6 celic na jamico plošče) smo tretirali z aktivnimi katepsini (0,2 in 0,02 µM) 10 minut v PBS (pH 6,0; 0,5 mM DTT). V negativno kontrolo nismo dodali katepsina. Po 40 urah smo prešteli celice, ki so prišle skozi PET membrano. *p < 0,05; v primerjavi s kontrolo. Stolpčni diagrami prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

Ker je zvišana migracija lahko povezana z zvišano invazivnostjo celic, smo želeli preveriti vpliv katepsinov tudi na ta proces. Za ta test smo uporabili polikarbonatne membrane, prevlečene z umetnim zunajceličnim matriksom (ECMatrix). Vsi trije katepsini so po inkubaciji v rahlo kislem okolju (pH 6) povečali migracijski potencial celic. Največji vpliv je imel katepsin S, sledi mu L, najmanjši vpliv pa je imel katepsin B (slika 30).



Slika 30: *Invazija celic MDA-MB-231*. Celice MDA-MB-231 (1,4 x 10^6 celic na jamico plošče) smo tretirali z aktivnimi katepsini (0,2 µM) 10 minut v PBS (pH 6,0; 0,5 mM DTT). V negativno kontrolo nismo dodali katepsina. Po 6 urah smo z uporabo fluorescenčnega barvila CyQuant GR kvantificirali celice, ki so prodrle v umetni ekstracelularni matriks s čitalcem mikrotiterskih plošč. *p < 0,05; v primerjavi s kontrolo. Stolpčni diagrami prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

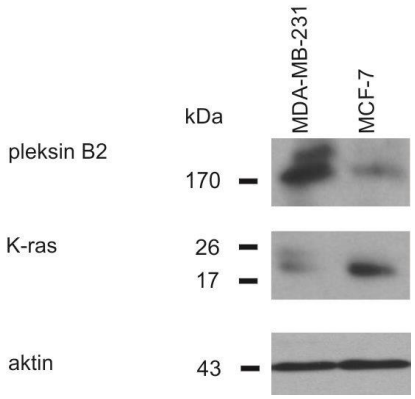
4.1.10 Vpliv tretiranja tumorskih celic s katepsini L in S na aktivnost Ras GTP-az

Nazadnje smo preverili, ali ima procesiranje zunajceličnih domen s katepsini vpliv tudi na znotrajcelične signalizacijske poti. Osredotočili smo se na s pleksini posredovano Ras GTP-azno signaliziranje, saj so pleksini oz. njihovi koreceptorji predstavljali kar polovico identificiranih receptorjev, ki jih katepsini procesirajo.

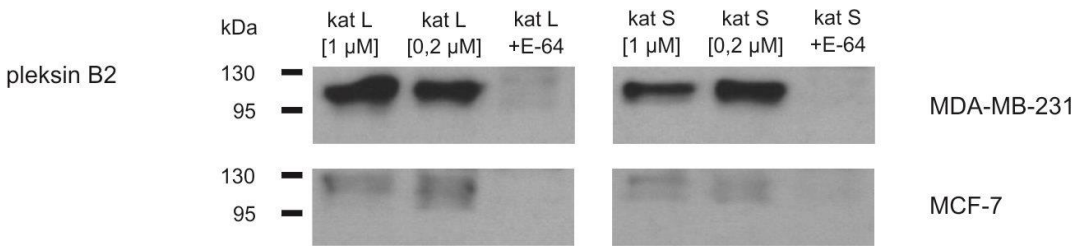
Pleksini pa niso edini membranski substrati katepsinov, ki vplivajo na GTP-azno aktivnost. Tudi EGFR ravno uravnava aktivnost Ras GTP-az, zato moramo biti pri interpretaciji rezultatov previdni in dosledni.

Pleksini skupaj s koreceptorji nevropilini vežejo semaforinske ligande, kar aktivira njihove citosolne domene GAP (*angl.* GTP-ase activating domain), te pa inaktivirajo signalne proteine iz družine Ras GTP-az [175]. Ker izražanje pleksinov brez zunajcelične domene vodi v njihovo trajno aktivacijo [176], smo želeli ugotoviti, ali bi tudi proteolitska odstranitev imela enak učinek.

Uporabili smo dve celični liniji, MDA-MB-231, ki izraža veliko semaforinskih receptorjev (pleksin A1, pleksin B2 in nevropilin), in MCF-7, kjer je njihovo izražanje dosti nižje (prisoten le pleksin B2 na meji zaznave z masno spektrometrijo, jasno je vidna tudi razlika med linijama z detekcijo s protitelesi (slika 31)). Naprej smo primerjali raven procesiranja pleksina B2 s katepsini na površini obeh celičnih linij. Sproščanje zunajceličnih domnev je v skladu z nivojem izražanja večje v liniji MDA-MB-231 (slika 32). Zato smo pričakovali, da bo cepitev pleksinov s katepsini v veliki meri zavrla aktivnost Ras GTP-az v MDA-MB-231 in da bo ta učinek v liniji MCF-7 veliko manjši.

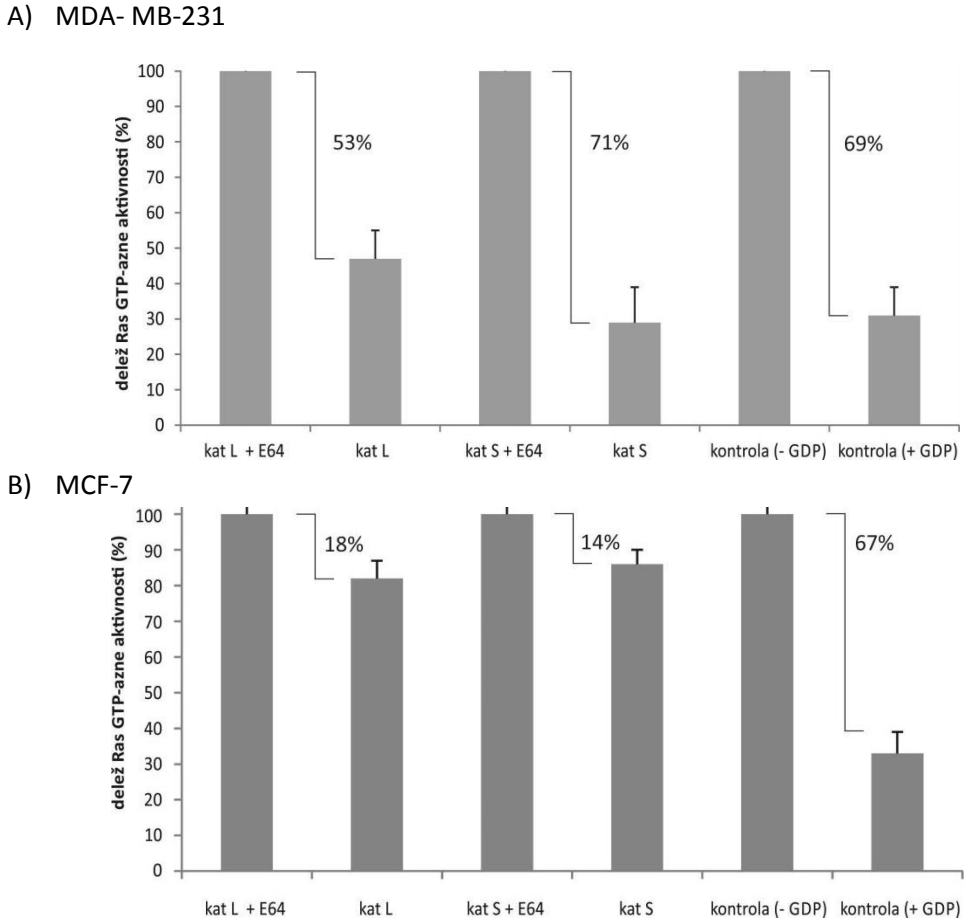


Slika 31: *Detekcija pleksina B2 in K-ras v popolnih celičnih lizatih celic MDA-MB-231 in MCF-7 s specifičnimi protitelesi*. Aktin smo uporabili kot nanašalno kontrolo.



Slika 32: *Detekcija odcepljenih zunajceličnih domen pleksina B2 v supernatantu celic MDA-MB-231 in MCF-7, po tretmaju s katepsinoma L in S, s specifičnimi protitelesi*. Prisotnost proteinskih fragmentov pleksina B2 je v liniji MCF-7 komaj zaznavna, kar je v skladu s proteomskimi podatki.

Pri proučevanju Ras GTP-azne aktivnosti smo se osredotočili na K-Ras in H-Ras, dva znana onkogena [177]. Z uporabo kemiluminiscenčnega testa ELISA smo opazili velik upad aktivnosti K-Ras in H-Ras v liniji MDA-MB-231, ki se je znižala na bazalni nivo (nivo aktivnosti Ras v kontroli po dodatku GDP, ki inhibira GTP-azno aktivnost). Medtem pa je bila sprememba v liniji MCF-7 zelo majhna, kar nakazuje možnost, da katepsini preko cepitev zunajceličnih receptorskih domen pleksinov deloma uravnavajo aktivnost Ras GTP-az (slika 33).

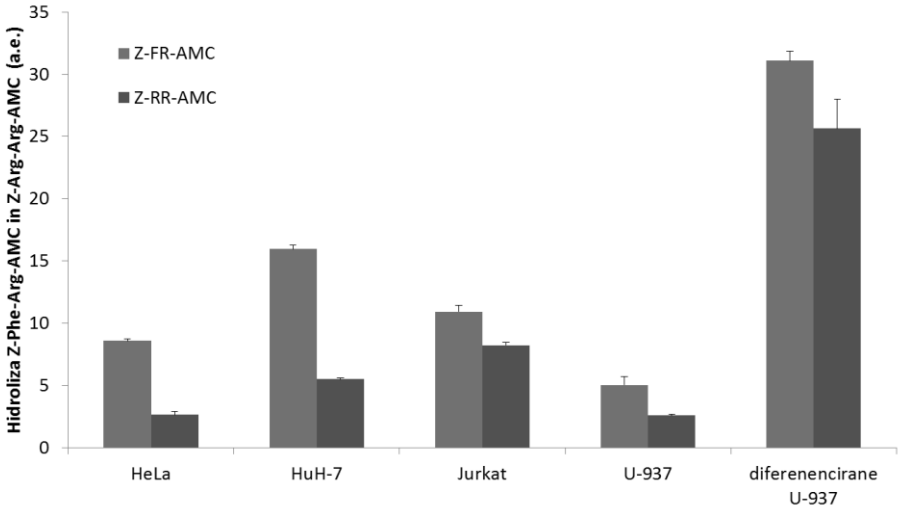


Slika 33: *Ras GTP-azno aktivnost*. Ras GTP-azno aktivnost (H-Ras in K-ras) smo določili v celičnih lizatih MDA-MB-231 (A) in MCF-7 (B) po tretiranju intaktnih celic s katepsinoma L in S (0,05 μM; 1 ura, pH 6,0). Kot negativno kontrolo smo uporabili katepsine, ki so bili predhodno inhibirani z E-64. V kontrolnem poskusu so bili celični lizati netretiranih celic inkubirani z GTPγS (sproži GTP-azno aktivnost) ali GDP (inhibira GTP-azno aktivnost). Test GTP-azne aktivnosti je pokazal, da cepitve zunajceličnih domen s katepsinoma L in S le rahlo zniža Ras GTP-azno aktivnost v liniji MCF-7, medtem ko je v liniji MDA-MB-231 učinek zelo izrazit. Tukaj ima procesiranje zunajceličnih domen podoben učinek kot inhibicija z GDP.

4.2 Vloga katepsinov pri apoptozi, sproženi z anti-APO-1, v človeških celičnih linijah

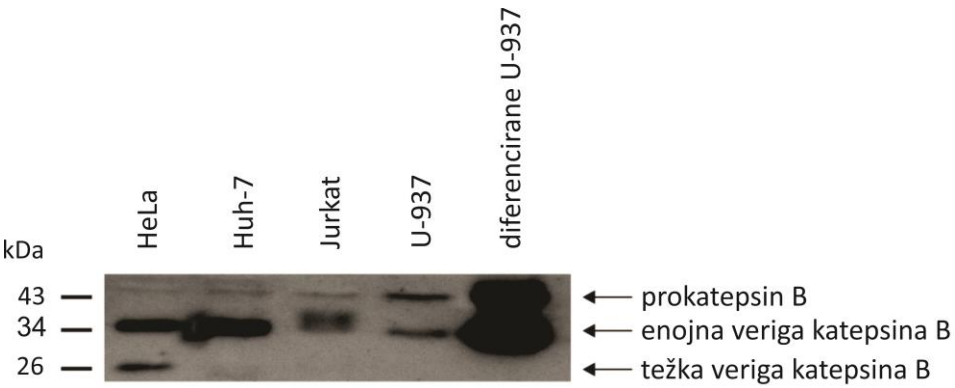
4.2.1 Anti-APO-1 sproži od kaspaz odvisno apoptozo, ki je neodvisna od aktivnosti cisteinskih katepsinov

Preučevali smo tudi vlogo cisteinskih katepsinov, predvsem katepsina B, pri zunanji poti apoptoze, ki poteka preko receptorja Fas (APO-1). Celično smrt smo sprožili z vezavo specifičnih protiteles (anti-APO-1) na ta receptor smrti. Dodali smo jim protein A v razmerju 1:1, ker oligomerizira ligande in močno poveča njihov učinek. Izbrali smo štiri različne človeške celične linije (HeLa, HuH-7, Jurkat in U-937). V preliminarnih poskusih smo ocenili nivo katepsinov v posamezni liniji na podlagi hidrolize splošnega katepsinskega substrata (N-benzoiloksikarbonil–fenilalanil–arginil–7–amino–4-metil kumarin – Z-FR-AMC) in substrata, specifičnega za katepsin B (N-benzoiloksikarbonil-arginil-arginil-7-amino-4-metilkumarin – Z-RR-AMC [178]). Monocitno linijo U-937 smo tudi diferencirali v makrofage, saj je znano, da vsebujejo veliko katepsinov, še posebej katepsin B [179, 180]. Kot je prikazano na sliki 34, imajo makrofagi najvišjo Z-FR-AMC-hidrolizirajočo aktivnost in primerljivo Z-RR-AMC aktivnost, kar je v skladu s prejšnjimi rezultati. Celice HuH-7 imajo drugo najvišjo Z-FR-AMC aktivnost, sledijo jim Jurkat in HeLa. Nediferencirane U-937 imajo 10-krat nižjo katepsinsko aktivnost v primerjavi z diferenciranimi makrofagi in 3-krat nižjo aktivnost kot HuH-7 celice. Če primerjamo Z-FR-AMC in Z-RR-AMC–hidrolizirajočo aktivnost, je razvidno, da lahko večino katepsinske aktivnosti v imunskih celicah (U-937 in Jurkat) pripišemo katepsinu B, za razliko od celic HeLa in HuH-7.



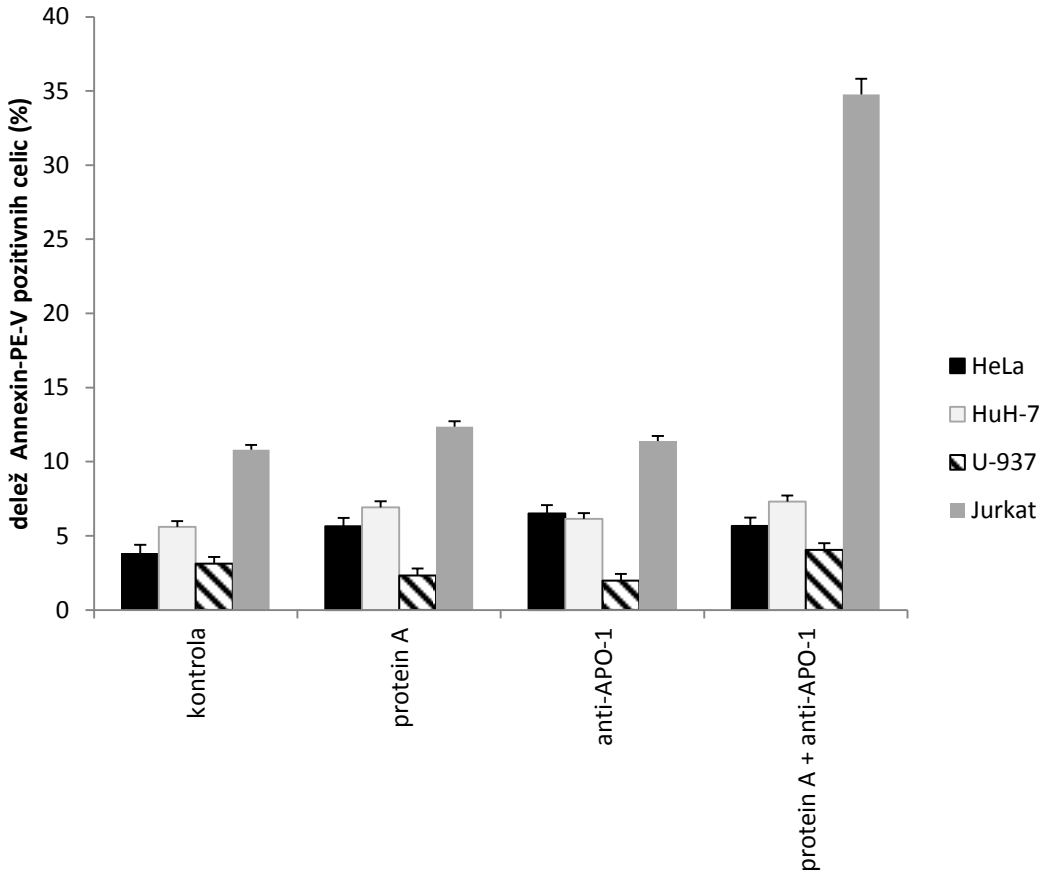
Slika 34*: Aktivnost cisteinskih katepsinov v celotnih celičnih lizatih pri izbranih celičnih linijah*. Določena je bila kot hidroliza fluorogenega substrata Z-FR-AMC in Z-RR-AMC. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

Ta rezultat smo potrdili z imunodetekcijo katepsina B s prenosom western (slika 35) v celičnih lizatih.



Slika 35: *Imunodetekcija katepsina B v celotnih celičnih lizatih pri izbranih celičnih linijah*.

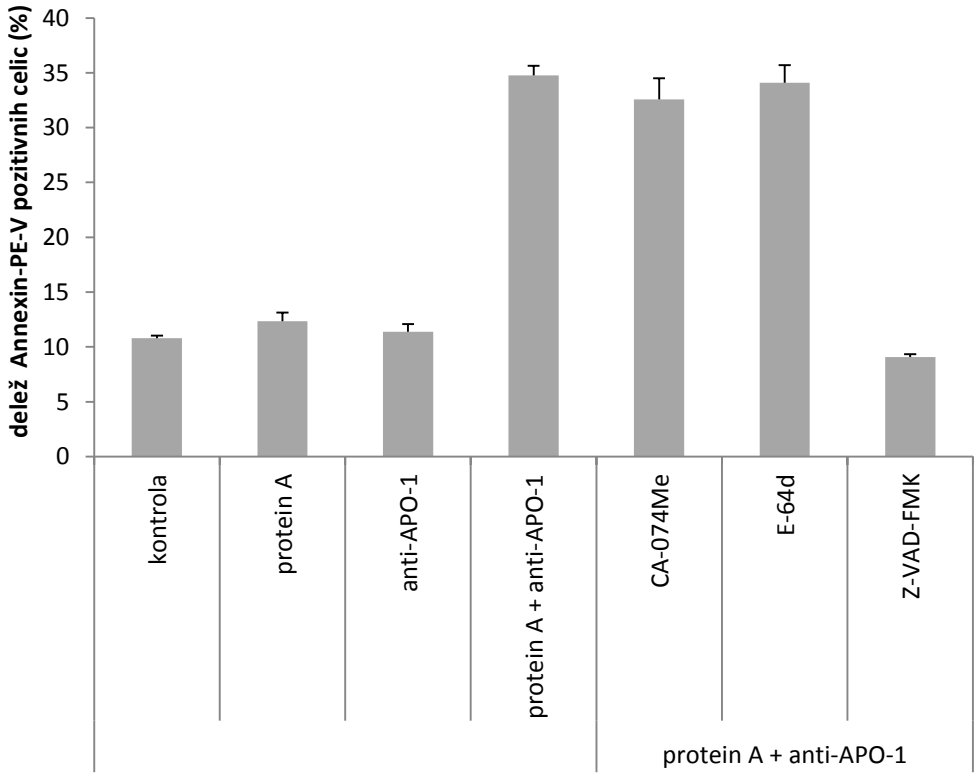
V naslednjem koraku smo testirali občutljivost izbranih linij na indukcijo apoptoze z APO-1. To smo lahko sprožili le pri celicah Jurkat (0,3 ng/ml APO-1 v kombinaciji s proteinom A, po 18-urni inkubaciji). Ostale tri linije pa so se izkazale za neobčutljive na APO-1 sproženo apoptozo, celo pri koncentraciji 1000 ng/ml in 24-urni inkubaciji (slika 36). Zato smo vse nadaljnje študije izvedli le na liniji Jurkat.



Slika 36: *Apoptoza, sprožena z anti-APO-1, je prikazana kot delež Annexin V-PE pozitivnih celic, kar vključuje tudi Annexin V-PE in PI pozitivne celice*. Celične linije HeLa, HuH-7 in U-937 so bile tretirane z 1000 ng/nl anti-APO-1 in proteinom A 24 ur, Jurkat celice pa z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

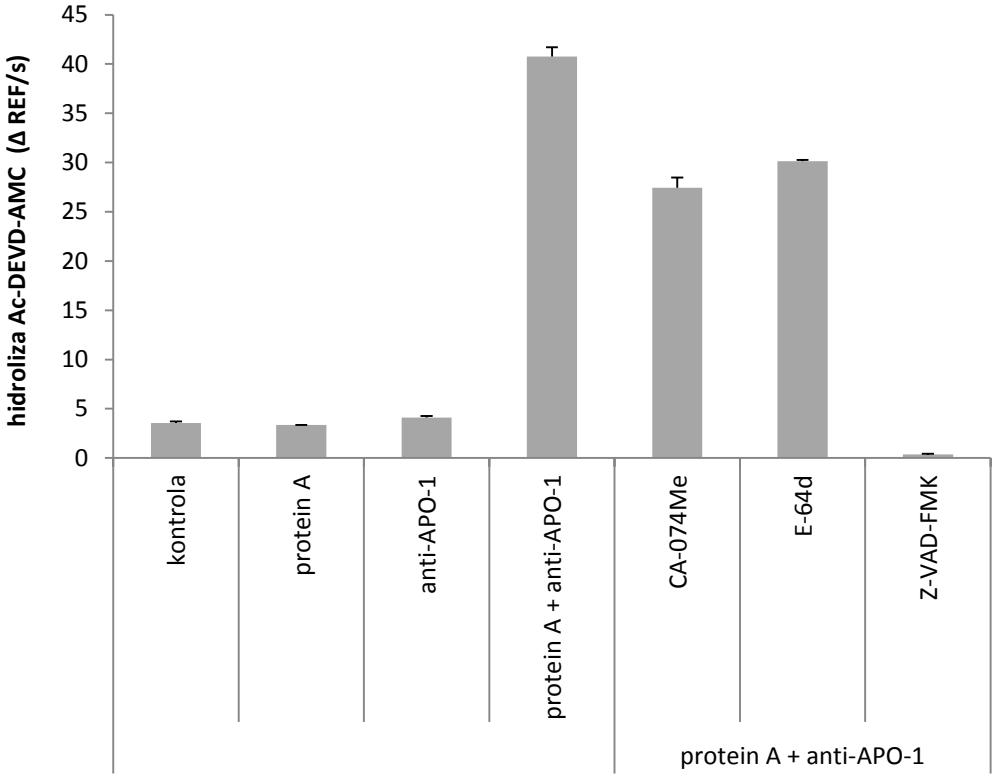
Enak set poskusov smo ponovili v prisotnosti inhibitorjev E-64d, ki je širokospektralni inhibitor cisteinskih katepsinov, ali CA-074Me, ki je specifični inhibitor katepsina B, ali Z-VAD-FMK, širokospektralnega inhibitorja kaspaz, ki je služil kot pozitivna kontrola

(slika 37). Noben inhibitor pri koncentraciji, uporabljeni v poskusu, ni bil citotoksičen (podatek ni prikazan). Uporabljena inhibitorja cisteinskih proteaz nista preprečila apoptoze, medtem ko je kaspazni inhibitor Z-VAD-FMK celice popolnoma zaščitil. To nakazuje, da katepsini niso kritični pri indukciji ali napredovanju apoptotske kaskade.



Slika 37: *Apoptoza, sprožena z anti-APO-1, je prikazana kot delež Annexin V-PE pozitivnih celic, kar vključuje tudi Annexin V-PE in PI pozitivne celice*. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

Nadalje smo želeli preveriti, ali je apoptoza, sprožena z anti APO-1, od kaspaz odvisen proces. Kaspazna aktivnost v celotnem celičnem lizatu, merjena kot hidroliza substrata Ac-DEVD-AMC (N-acetil-aspartil-glutamil-valil-aspartil-7-amino-4-trifluorometil kumarin, je bila povišana po tretiranju z anti-APO-1, kar je v skladu z vodilno vlogo kaspaz v celični smrti, sproženi preko receptorjev smrti (slika 38). Inhibitorja cisteinskih katepsinov nista imela večjega vpliva na kaspazno aktivnost. V nasprotju s tem pa je inhibitor kaspaz Z-VAD-FMK uspešno preprečil DEVD-azno aktivnost.

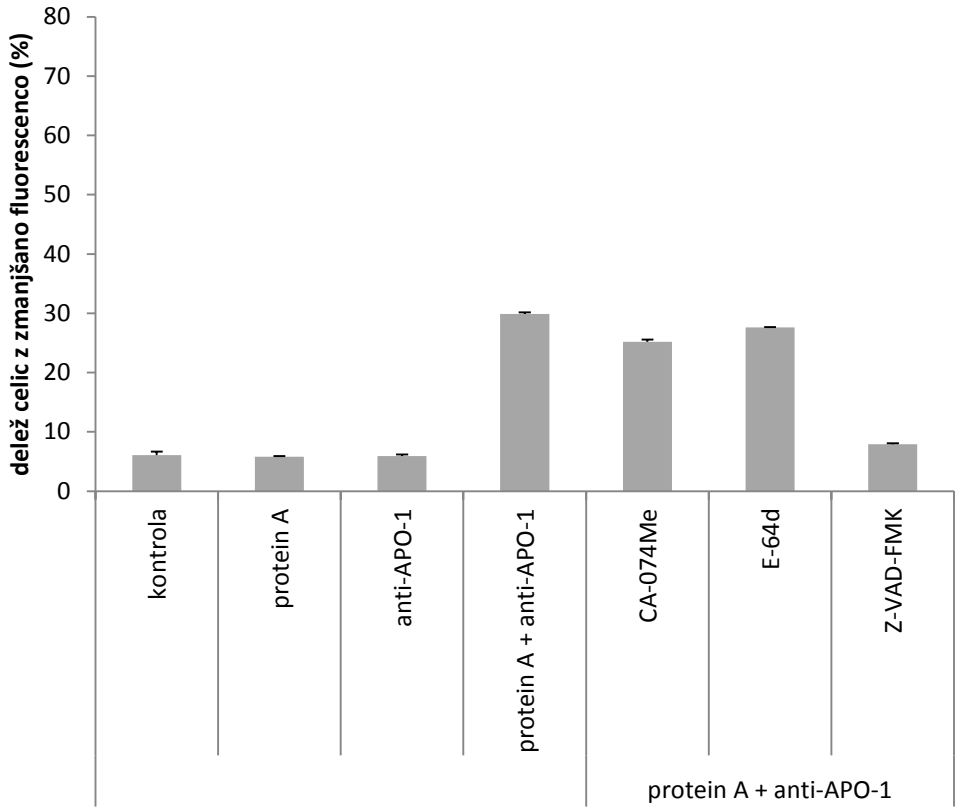


Slika 38: *Kaspazna aktivnost po apoptozi, inducirani z anti-APO-1, je bila določena z uporabo fluorogenega substrata Ac-DEVD-AFC*. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

4.2.2 Mitohondriji in lizosomi se poškodujejo med apoptozo, sproženo z anti-APO-1

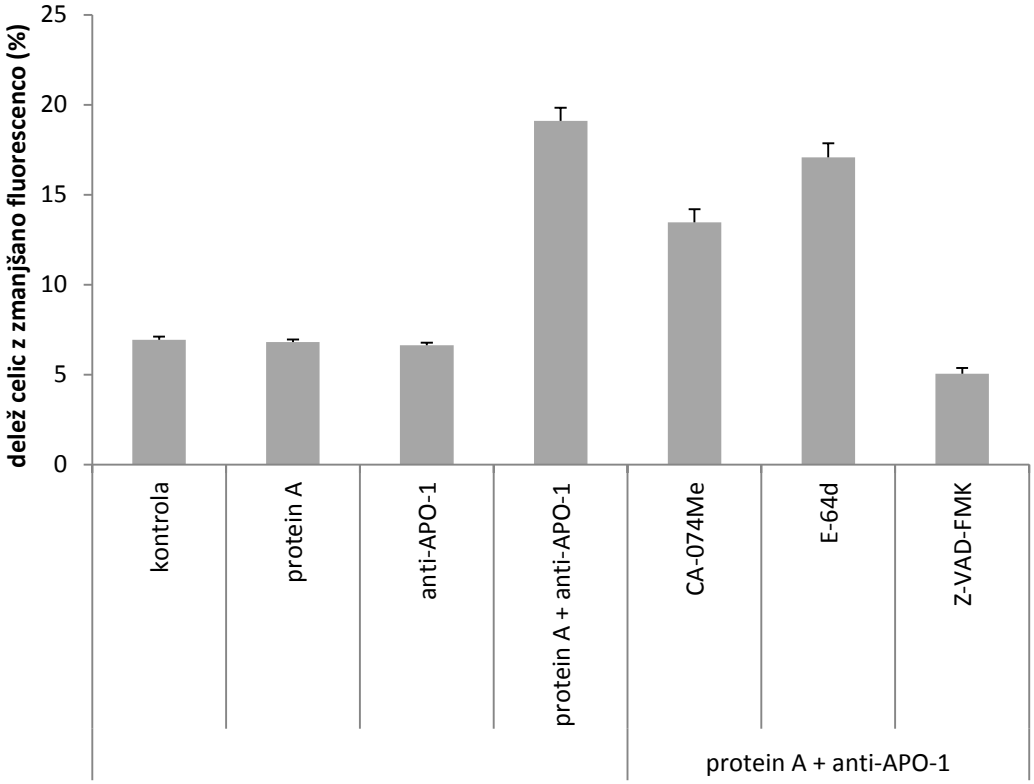
V naslednjem koraku smo spremljali stabilnost lizosomskih in mitohondrijskih membran med apoptozo, sproženo z anti-APO-1, in vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov in kaspaz na integriteto teh organelov. Permeabilizacijo lizosomske membrane (LMP) in zunanje mitohondrijske membrane (MOMP) smo določili po 16 urah, kjer smo že v predhodnih poskusih opazili znatno stopnjo apoptoze.

Največji delež poškodovanih mitohondrijev so po pričakovanjih imele celice, kjer smo sprožili apoptozo z anti-APO-1. Cisteinska inhibitorja nista zaščitila mitohondrijev, nasprotno pa dodatek Z-VAD-FMK ohrani delež celic s poškodovanimi mitohondriji skoraj na kontrolni ravni (slika 39).



Slika 39: *Mitohondrijska integriteta po apoptozi, inducirani z anti-APO-1*. Privzem MitoTracker Red CMX-Ros v mitohondrije pokaže delež celic z zmanjšano fluorescenco. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

Anti-APO-1 je sprožil LMP v približno 20% celic, cisteinska inhibitorja ponovno nista zaščitila lizosomov, nasprotno pa je dodatek Z-VAD-FMK preprečil poškodbe lizosomske membrane (slika 40). Delež celic s poškodovanimi lizosomi (~20%) je manjši v primerjavi s poškodbami mitohondrijev (~30%).

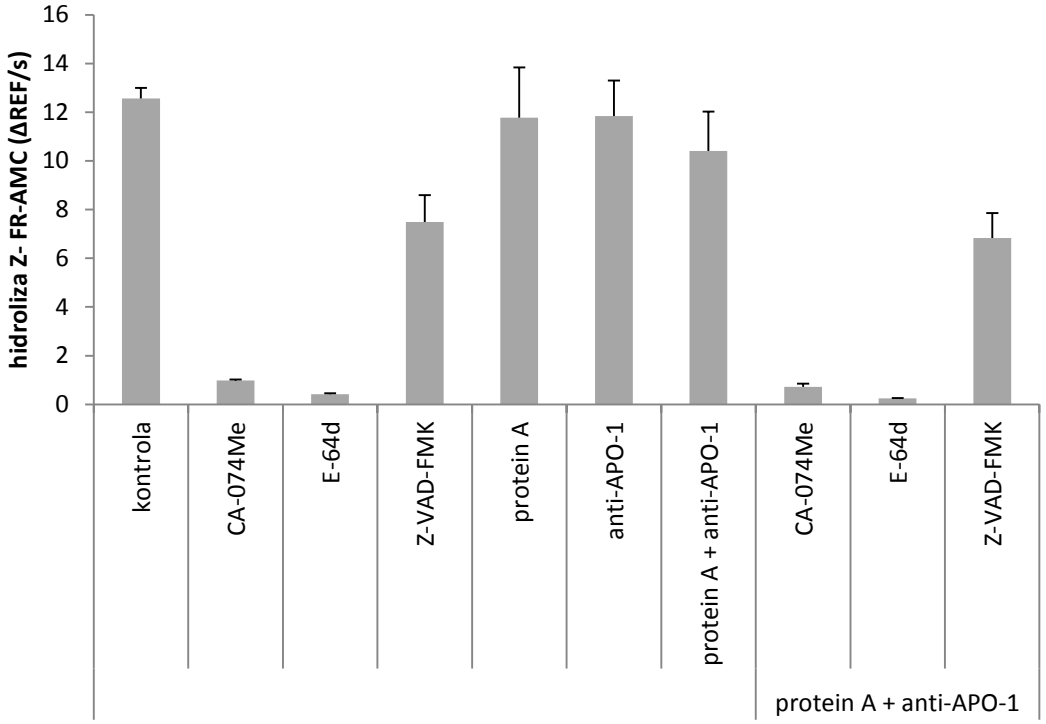


Slika 40: *Lizosomska integriteta pri apoptozi, inducirani z anti-APO-1*. Privzem Akridin oranža v lizosome pokaže delež celic z zmanjšano fluorescenco. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

4.2.3 Katepsinska aktivnost v citosolu je povišana med apoptozo, sproženo z anti-APO-1

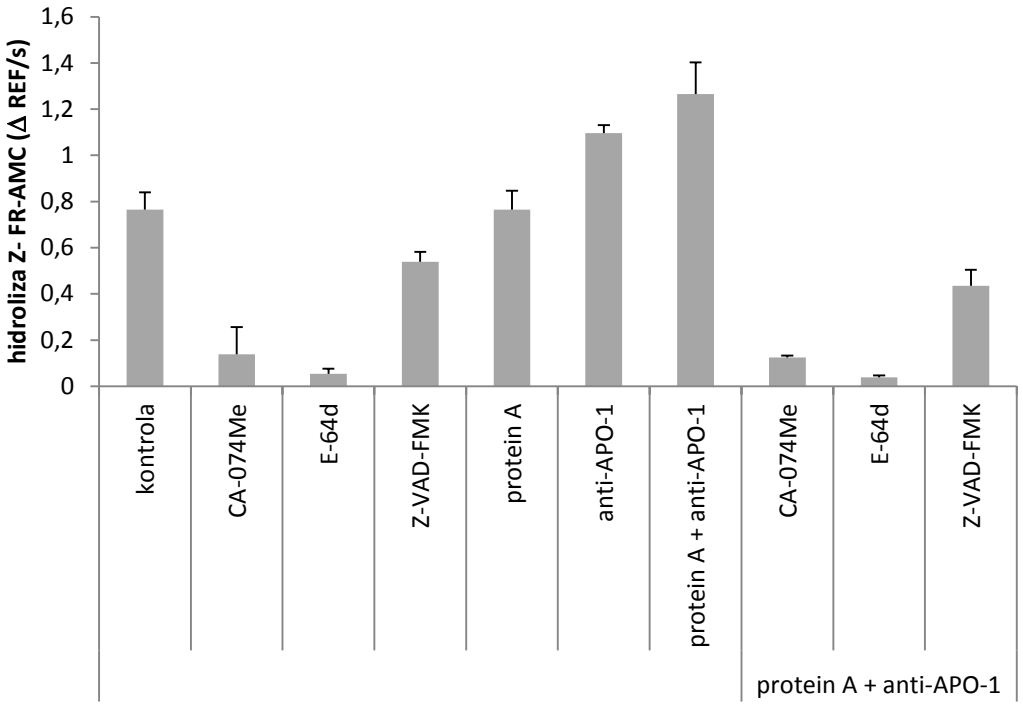
Ker se je izkazalo, da anti-APO-1-inducirano apoptozo spremlja LMP, smo hoteli preveriti, če pride do izpusta katepsinov v citosol, kakšen je obseg le-tega, v kolikšni meri so katepsini tam še aktivni in ali aktivnost katepsinov preneha ob dodatku inhibitorjev.

Najprej smo spremljali katepsinsko aktivnost s hidrolizo splošnega katepsinskega substrata Z-FR-AMC v celotnem celičnem lizatu. Jasno je razvidno, da oba katepsinska inhibitorja zavreta aktivnost katepsinov tako v kontroli kot tudi v celicah, tretiranih z anti-APO-1. Prav tako pride do 20% zmanjšanja aktivnosti ob dodatku kaspaznega inhibitorja Z-VAD-FMK, kar je v skladu z njegovo delno navzkrižno inhibicijo cisteinskih proteaz. Aktivnost je rahlo zmanjšana tudi v celicah z anti-APO-1, kjer najverjetneje pride do izgube katepsinske aktivnosti zaradi puščanja katepsinov iz lizosomov v citosol, kjer se počasi inaktivirajo (slika 41).



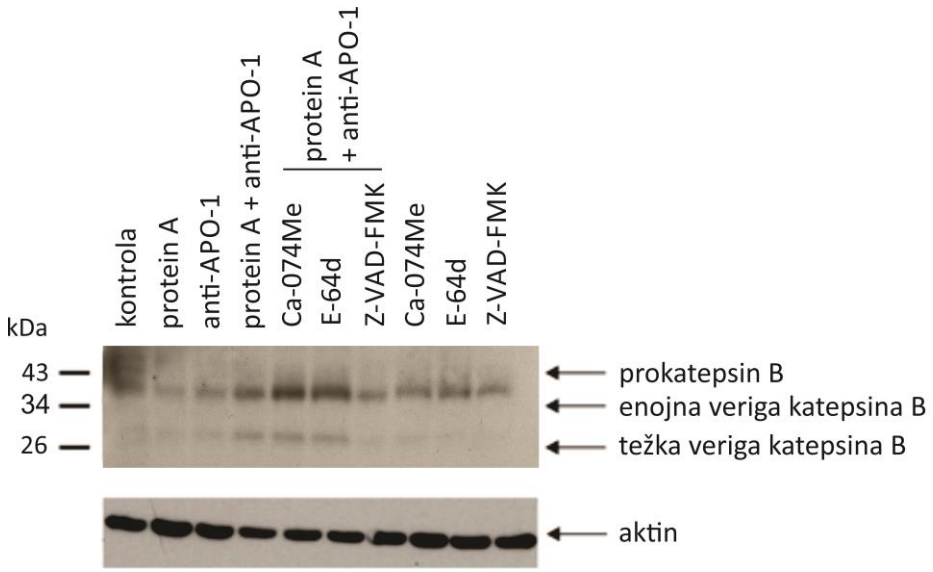
Slika 41: *Katepsinska aktivnost v celotnih celičnih lizatih po apoptozi, inducirani z anti-APO*-1. Določena je bila z uporabo fluorogenega substrata Z-FR-AMC. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

Nato smo določili koncentracijo aktivnih katepsinov v citosolnih ekstraktih. V primerjavi z aktivnostjo v celotnih lizatih je bila detektirana zelo majhna količina aktivnih katepsinov v citosolu (~15%). V skladu s prej opazovano LMP je bila najvišja aktivnost v citosolu celic, kjer je bila sprožena apoptoza z anti-APO-1, kjer sta cisteinska inhibitorja popolnoma zavrla aktivnost, Z-VAD-FMK pa jo je samo delno zmanjšal zaradi že prej omenjene navzkrižne inhibicije (slika 42).



Slika 42: *Katepsinska aktivnost v citosolnih ekstraktih po apoptozi, inducirani z anti-APO-1*. Določena je bila z uporabo fluorogenega substrata Z-FR-AMC. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov.

Prisotnost katepsinov v citosolu smo dodatno potrdili še s prenosom western in imunodetekcijo katepsina B v citosolnih ekstraktih celic po tretmaju z anti-APO-1 (slika 43).



Slika 43: *Imunodetekcija katepsina B v citosolnih celičnih ekstraktih po indukciji apoptoze z anti-APO-1(0,3 ng/ml anti-APO-1, 18 ur).* Inhibitorje (CA-074Me, E-64-d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM.

5 Razprava

Zadnja desetletja raziskav na področju cisteinskih katepsinov, ki so sprva veljali za nespecifične lizosomalne proteaze, so pokazala, da se lahko v določenih fizioloških in patoloških procesih prenesejo na membrano celic ter izločijo v zunajcelični prostor ali se sprostijo v citosol, kjer kljub manj ugodnim razmeram še vedno ohranijo del svoje aktivnosti [36, 65, 181]. Tako med drugim sodelujejo v zunajcelični proteolizi [84] kot tudi v znotrajceličnih procesih, kot je programirana celična smrt [32, 138], oba procesa pa imata močno povezavo s tumorigenimi procesi [62]. Kljub temu je malo znanega o molekularnih mehanizmih delovanja katepsinov, kar velja predvsem za področje zunajcelične signalizacije. Zato težišče doktorskega dela prestavlja raziskava vloge cisteinskih katepsinov v zunajcelični proteolizi, dodatno pa tudi razjasnitev nasprotujočih si poročil o vpletenosti cisteinskih katepsinov v znotrajcelično regulacijo apoptoze, posredovane z receptorji smrti Fas.

5.1 Cisteinski katepsini v zunajcelični proteolizi

Cisteinski katepsini sodelujejo v pomembnih stopnjah prehoda iz premalignega v maligno stanje [42-44], kljub temu pa je zelo malo znanega o molekularnih mehanizmih njihovega delovanja. Proteolitsko procesiranje je eden izmed najpomembnejših post-translacijskih mehanizmov. Razvoj visokozmogljivih masnospektroskopskih metod je omogočil velik napredek na področju degradomike, tj. odkrivanje nabora proteinov, ki jih cepi določena proteaza [182, 183]. Določevanje membranskega degradoma sekretornih ali membransko vezanih proteaz z masno spektrometrijo je uveljavljeno orodje, ki dopolnjuje klasične biokemijske študije s proteaznimi inhibitorji ter mišje modele z izbitimi geni. Tako omogoča celostni vpogled v substrate določene proteaze in s tem v funkcije, ki jih opravlja [184, 185]. Metode v teh raziskavah temeljijo na študiju proteaz, ki se primarno izločajo ali so vezane na površini celic (npr. metaloproteaze), tak pristop pa za študijo mehanizma cisteinskih katepsinov, ki so izvorno lizosomalne proteaze, ni primeren. Posnemanje izločanja katepsinov, do katerega prihaja večinoma v patoloških procesih, tako predstavlja velik izziv. Da bi se približali pogojem, v katerih se nahajajo rakaste celice v tumorskem mikrookolju, smo načrtovali novo *semi in vitro* metodo, kjer smo intaktne tumorske celice inkubirali z zunajcelično dodanimi cisteinskimi katepsini, odcepljene domene membranskih proteinov pa smo identificirali z masno spektrometrijo. To nam je omogočilo prvi vpogled, kako katepsini z zunajcelično proteolizo vplivajo na tumorigenezo. Uporaba tega pristopa predstavlja doslej prvo sistematsko študijo membranskih substratov cisteinskih katepsinov.

Z masno-spektroskopsko identifikacijo smo tako določili okoli 500 proteinov v posameznem vzorcu supernatanta intaktnih celic MDA-MB-231, ki smo jih inkubirali s katepsini B, L in S. Glavnino identificiranih proteinov so predstavljali naravno številčni citoplazemski proteini. To ni presenetljivo, saj je znano, da rakaste celice izločajo znatne količine citoplazemskih proteinov [186]. Nedavna študija sekretoma celic MDA-MB-231 celo poroča, da po 24 urah znotrajcelični proteini predstavljajo 55% vseh proteinov, prisotnih v supernatantu [187]. Prav tako se ti sprostijo tudi iz majhnega deleža celic, ki so bile poškodovane med postopkom priprave (manj kot 5%, slika 11). Potrebno je tudi

upoštevati, da se lahko zaradi kratkega inkubacijskega časa zveča delež teh proteinov v primerjavi s proteini, ki se že konstitutivno izločajo. Citoplazemske proteine smo obravnavali kot ozadje, saj se njihov SCR v primerjavi z negativno kontrolo ni bistveno spremenil (slika 12).

Nasprotno pa je imelo le zelo majhno število identificiranih proteinov SCR nad 3, kar je pomenilo, da je bila njihova prisotnost pomembno povišana v vzorcih, kjer so bile celice inkubirane s katepsini. Proteine, ki so zadostili še pogoju, da so membranskega izvora, smo šteli za potencialne substrate cisteinskih katepsinov. Identificirani peptidi membranskih proteinov s SCR nad 3 so se nahajali samo na zunajceličnih delih, kar še dodatno dokazuje, da smo identificirali izključno odcepljene zunajcelične proteinske domene (slika 13). Nizko število substratov nakazuje na usmerjeno omejeno proteolizo, kar je v nasprotju s splošnim prepričanjem, da katepsini le neselektivno razgradijo širok nabor substratov. To odpira možnost, da njihovo procesiranje membranskih domen pomembno uravnava celične procese.

Ugotovili smo, da katepsina L in S cepita isto skupino membranskih proteinov, kar lahko razložimo z visoko strukturno podobnostjo in podobno specifičnostjo teh dveh katepsinov. Pri tretiranju celic s katepsinom B pa smo identificirali le en substrat. To lahko pojasni strukturna posebnost (zaporna zanka) katepsina, ki omejuje dostop substrata do vezavnega mesta na encimu, in povzroči, da prednostno deluje kot karboksidipeptidaza [188]. Zato z zunajceličnega konca proteinov odceplja le kratke dipeptide, teh pa z uporabljeno masno-spektroskopsko metodo ne moremo dodeliti k ustreznemu proteinu, iz katerega izvirajo (slika 12, tabela 9).

Te podatke smo dodatno potrdili z imunološko detekcijo procesiranih ektodomen membranskih proteinov. Tako opazimo, da katepsina L in S na enem ali več specifičnih mestih odcepita proteinske domene, njihova velikost pa se sklada z velikostjo zunajceličnih delov membranskih proteinov (slika 14). To nakazuje, da do cepitve pride blizu membrane, temu pa lahko sledi še dodatna cepitev sproščene domene.

Mesto cepitve nam bi lahko dalo prve podatke o naravi spremembe substratov zaradi cepitve s katepsini. Številni proteomski pristopi omogočajo visokozmogljivo iskanje mest cepitve proteaznih substratov. Te metode gradijo na dejstvu, da je rezultat vsake proteolitične cepitve nov N- ali C-konec, razne metode označevanja pa omogočajo določitev mest, kjer je cepila proteaza [189]. Čeprav zgleda ta strategija na prvi pogled enostavna, pa je določevanje cepitvenih mest v zelo kompleksnih vzorcih izredno zahtevno. Vzorec za analizo namreč vsebuje največ notranjih, triptičnih peptidov, ki nastanejo v postopku predanalitske priprave vzorca (~90%). Delež peptidov z novonastalimi C- ali N-konci (nastalimi zaradi aktivnosti preučevane proteaze), ki so bistvenega pomena, je tako izredno majhen, s tem pa tudi verjetnost, da takšen peptid identificiramo z masnim spektrometrom.

Obstajajo različni pristopi C- ali N-terminalnega označevanja z namenom obogatitve *neo*-N ali C-peptidov v končnem vzorcu [190-195]. Opisane metode so večinoma časovno in metodološko zelo zahtevne, kar jih pogosto omejuje na izvedbo v laboratorijih, kjer so bile razvite, številni koraki v pripravi vzorcev pa lahko predstavljajo znatno izgubo izhodiščnega materiala. Zato smo na podlagi kemijskega označevanja iz postopka kombinirane frakcijske diagonalne kromatografije − COFRADIC [195] razvili poenostavljen postopek za identifikacijo mest cepitve, ki smo ga poimenovali FPPS (*angl*. Fast Profiling of Protease Specificity) [170]. Temelji na N-terminalnem izotopskem označevanju s tridevtero-acetilacijo in na sledečem ločevanju peptidov na ionskih izmenjevalcih ter nosilcih za reverzno-fazno kromatografijo. Tako omogoča hitrejšo in enostavnejšo pripravo vzorca z manjšo količino izhodiščnega materiala. Z zmanjšanim številom korakov priprave smo bistveno poenostavili postopek in se izognili večjim izgubam med pripravo vzorca.

Določevanje cepitvenih mest v vzorcu supernatanta omogoča spremljanje cepitev v nativnih pogojih, kjer je 3D struktura membranskih proteinov popolnoma ohranjena. Vendar pa se pojavi težava pri določevanju primarnih mest cepitve pri proteinih, ki imajo N-konec zunaj celice (takšno orientacijo ima večina substratov). V tem primeru domena z *neo* N-koncem, ki nastane zaradi katepsinske aktivnosti, ostane v membrani in je s FPPS ne moremo identificirati. Določimo lahko le sekundarne cepitve, ki se zgodijo na sproščeni zunajcelični domeni. Tak primer so mesta cepitve na transferinskemu receptorju 1, ALCAM-u in efrinskemu receptorju tipa A2. Da bi se izognili temu problemu, smo za določevanje mest cepitve uporabili tudi popolni lizat celic. Čeprav smo med njegovo pripravo uporabili detergenta NP-40 in NaDS, ki bi lahko spremenila konformacijo proteinov, je bila njuna koncentracija dovolj nizka, da najverjetneje ni vplivala na proteazno aktivnost. V teh vzorcih smo določili mesto cepitve EGFR-ja v neposredni bližini membrane, zato sklepamo, da gre tu za primarno cepitev, ki je posledica aktivnosti katepsina L (tabela 16). Razlogi za le eno identifikacijo primarne cepitve so poleg že prej omenjenega nizkega deleža *neo*-N terminov v vzorcih lahko tudi v naravi peptidov z novimi N-konci. Ti so lahko po razgradnji s tripsinom prekratki, predolgi, preveč hidrofobni, slabo ionizirajo ali slabo fragmentirajo, kar posledično onemogoča njihovo analizo z LC-MS/MS.

Kljub vsem omejitvam, so določena mesta cepitve s katepsinoma S in L skladna z njuno znano specifičnostjo za substrate in kažeta na visoko kvaliteto masno-spektroskopskih podatkov. Katepsina L in S imata kot tudi drugi cisteinski katepsini široko substratno specifičnost, ki jo določa predvsem oblika in elektrostatske značilnosti S2 vezavnega žepa za substrat, kamor se prednostno vežejo hidrofobni in aromatski aminokislinski preostanki substrata [10, 12, 196]. Tega cepita v ali v neposredni bližini njegovih povezovalnih domen, kjer je najmanj steričnih ovir in so mesta najlažje dostopna (slika 22). S tem je najverjetneje povezano tudi dejstvo, da katepsini preferirajo določen tip zvitja pri njihovih membranskih substratih, saj je večina le-teh med sabo strukturno zelo podobnih (slika 19). Njihov tip zvitja najverjetneje nudi boljši dostop za proteolitsko cepitev in so zato preferenčne tarče katepsinskega procesiranja.

Strukturno podobni potencialni substrati katepsina L in S pa niso bili omejeni samo na eno celično linijo, saj smo jih identificirali tudi v drugih tumorskih celičnih linijah heterogenega izvora, kjer vidimo enak vzorec procesiranja (slike 15–18). Prav tako smo opazili procesiranje sorodnih receptorjev iz iste družine (nevropilina 1 in 2, efrinska receptorja tipa A2 in B4), kar kaže, da katepsini preferenčno cepijo nekatere funkcijsko sorodne proteine (tabele 10–15). Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da gre pri procesiranju membranskih proteinov s katepsinoma L in S za splošen proces, ki ni omejen samo na eno celično linijo ali tip tumorja.

Izhodiščni *semi in vitro* pristop z eksogeno dodanimi katepsini v mikromolarnem območju smo uporabili z namenom produciranja velikega števila odcepljenih zunajceličnih domen, kar je omogočilo njihovo optimalno masno-spektroskopsko detekcijo in pripravo seznama potencialnih substratov. Nato smo preverili, ali do teh cepitev prihaja tudi v *in vivo* pogojih. Ker območje koncentracije katepsinov *in vivo* v tumorskem mikrookolju do sedaj ni poznano, je obstajala možnost, da fiziološke koncentracije, v kolikor bi bile te veliko nižje od mikromolarnih, ne bi imele podobnega učinka. To smo ovrgli tako v *in vitro* modelu tumorskega mikrookolja, kjer so bili makrofagi glavni vir nativnih katepsinov (slika 24), kot tudi *in vivo* v mišjem modelu tumorja trebušne slinavke RIP1-Tag2 (slika 26). S tem smo pokazali, da tudi *in vivo* koncentracije nativnih katepsinov povzročijo procesiranje zunajceličnih domen tarčnih proteinov.

Večina proteaz, ki je vključena v cepitve zunajceličnih domen večinoma blizu membrane, pripada družinama metaloproteaz celičnega matriksa in disintegrinskega tipa

ter serinskim proteazam [52]. Zato ni presenetljivo, da katepsina L in S nista edina, ki procesirata identificirane membranske substrate. Tako pleksin B2 cepi serinska proteaza preprotein konvertaza [54], nevropilin 1 cepi metaloproteaza ADAM10 [197], zunanje domene adhezijskih proteinov CD44, ALCAM, L1CAM in MUC18 pa lahko odcepi metaloproteaza ADAM 17 [53]. S cepitvami istih tarč kot serinske in metaloproteaze katepsini najverjetneje izzovejo enake/podobne fiziološke odzive. Rahlo kisel pH v mikrookolju tumorja je ugoden za ohranjanje aktivnosti teh lizosomskih proteaz, po drugi strani pa omejuje delovanje drugih encimov, ki procesirjao zunajcelične domene, kot so metalo in serinske proteaze, ki najbolje delujejo v nevtralnem območju pH. Zato sklepamo, da katepsini v zakisanem okolju prevzamejo del vlog drugih proteaz ali jih celo nadomestijo. To lahko podkrepimo z opažanji cepitev substratov v ko-kulturah tudi v prisotnosti inhibitorjev metaloproteaz širokega spektra (GM6001 in batimastat) (slika 25) in z *in vivo* rezultati iz tumorjev RIP1-Tag2 z izbitim genom za katepsin S (slika 26), ki celo kažejo, da so katepsini nenadomestljivi za cepitve določenih substratov. Tako ne preseneča, da za nekatere naše tarče ni poročil o zunajceličnem procesiranju s katerokoli drugo proteazo (pleksin A1, efrinski receptor tipa A2, EGFR, nektinu podoben protein 5 in E-NPP 1). Na podlagi zbranih podatkov tako sklepamo, da katepsini na edinstven način vplivajo na procese v celicah.

Da bi lahko preučili fiziološki pomen procesiranja membranskih proteinov in vpliv na celične procese, smo najprej sistematično pregledali seznam substratov cisteinskih katepsinov in opravili funkcijsko analizo z Gene Ontology (GO anotacija). Rezultati so pokazali, da je večina proteinov povezana s procesi, kot sta pritrjanje celic in migracija, med molekulskimi vlogami pa je izstopala signalizacija preko semaforinskih receptorjev (tabela 17), ki je med drugim odgovorna za ključne procese pri razvoju tumorja. Odstranitev ektodomen teh molekul bi tako lahko razložila povezavo med zunajcelično katepsinsko aktivnostjo in kancerogenimi procesi, kot so invazija, metastaziranje in nastajanje novih žil. Med katepsinskimi substrati samo dva proteina nista direktno povezana z rakom: transferinski receptor 1 in fosfodiesteraza 1. Prvi zagotavlja privzem železa v celice, slednja pa ureja mineralizacijo tkiv in diferenciacijo osteoblastov [198, 199]. Tudi membranski protein CD55, ki sicer primarno ščiti celice pred nespecifičnim imunskim odzivom z inhibicijo komplementnega sistema, lahko preko aktivacije tirozin-kinazne poti dodatno zveča migracijo in metastaziranje tumorjev [200].

Ker je bilo več kot 60% katepsinskih substratov povezanih z migracijo in celično adhezijo (tabela 17), smo najprej preverili, kakšno vlogo imajo katepsini v teh dveh procesih. Med molekulami, ki služijo pritrjanju celic, smo v liniji MDA-MB-231 identificirali 4 člane imunoglobulinske superdružine celičnih adhezijskih molekul (CAM) (ALCAM, L1CAM, MUC18 in nektinu-podoben protein 5). Poleg njih je med identificiranimi substrati tudi CD44, ki uravnava vezavo celic na zunajcelični matriks. Njegov glavni vezavni ligand je hialuran, ki je najbolj številčna komponenta ECM. Vsi ti membranski proteini vplivajo na migracijo in invazijo tumorskih celic preko vzpostavljanja/porušenja celičnih stikov in tudi preko sprožitve endo- in parakrine signalizacije ob cepitvi zunajceličnih domen [201-206]. Do sedaj je veljalo, da katepsini pospešujejo celično migracijo in invazijo preko cepitev komponent ECM in aktivacije drugih proteolitskih kaskad. Ker pa procesiranje molekul na celični površini s katepsini povzroči zmanjšano adhezijo (slika 27), povečano migracijo (sliki 28 in 29) in invazijo (slika 30), ti rezultati prinašajo nova spoznanja o mehanizmih, s katerimi katepsini pospešujejo vdor rakastih celic v okoliško tkivo. Molekule, ki služijo pritrjanju celic, so zelo verjetno povezane z zgoraj navedenimi procesi, vendar niso nujno edine, saj so lahko tudi drugi katepsinski substrati udeleženi pri regulaciji migracije in invazije.

Adhezijske molekule tako niso edine, preko katerih katepsini lahko vplivajo na celične procese, saj so med membranskimi substrati tudi celični receptorji (GO anotacija je

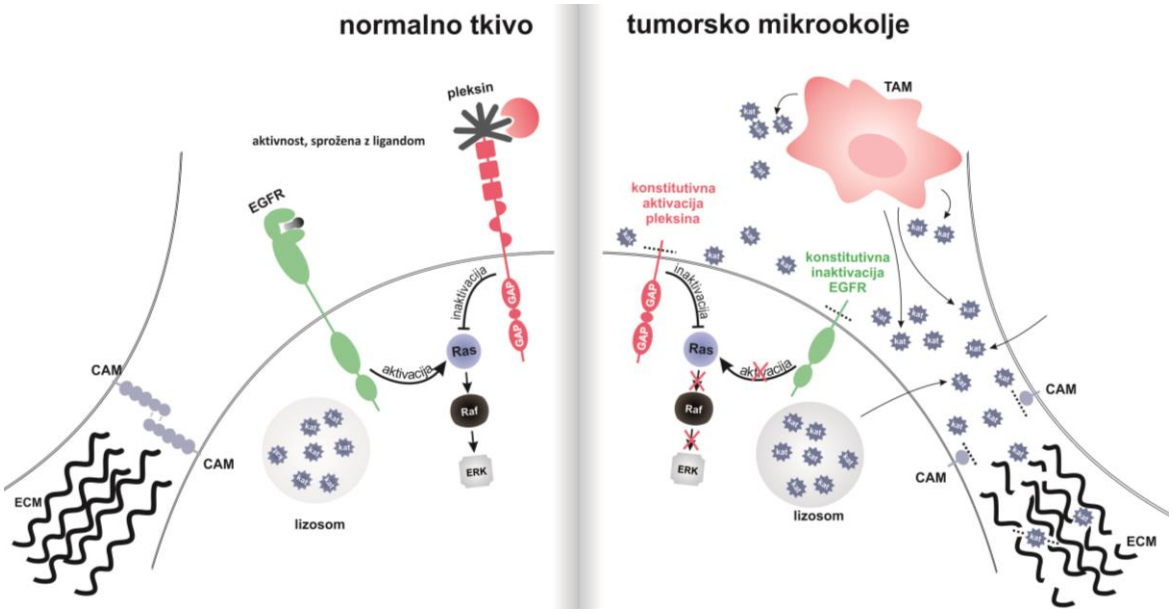
povezala skoraj 70% proteinov z receptorsko aktivnostjo). S signalizacijo sta povezana receptor epidermalnega rastnega dejavnika (EGFR) in efrinski receptor tipa A2. EGFR je onkogena molekula, vpletena v pritrjanje, angiogenezo, proliferacijo in metastaziranje tumorskih celic [207, 208]. Protitelesa proti EGFR-ju so bila odobrena tudi kot terapija pri zdravljenju določenih tipov raka [209]. Druga obetavna terapevtska tarča so receptorji iz družine efrinov. Povišano izražanje efrinskega receptorja tipa A2 zmanjša migracijo in invazivnost pri številnih tipih rakastih celic. To je bilo potrjeno tudi na mišjem rakastem modelu [210]. Proteolitska inaktivacija predstavnikov efrinske družine bi tako lahko privedla do povečanega tumorigenega potenciala.

Med receptorji, ki so substrati katepsina L in S, pa najbolj izstopajo molekule, ki so vpletene v semaforinsko signalizacijo. To so pleksin A1, pleksin B2 in nevropilin 1. Slednji deluje kot pleksinski ko-receptor pri signalizaciji, ki jo sproži vezava semaforinov. Kot ko-receptor pomaga tudi pri vezavi ligandov družine VEGF na receptor VEGF [204, 211]. Pleksini tipa B lahko vežejo semaforine neposredno, pleksini tipa A pa za to nujno potrebujejo nevropilin. Vezava semaforinskih in VEGF ligandov ureja angiogenezo, migracijo celic in druge sorodne procese v mikrookolju tumorja [175, 212]. Te signalne poti potekajo večinoma preko aktivacije/inaktivacije malih GTP-az [213]. Vezava semaforinov tako aktivira citosolno domeno pleksinov z aktivnostjo GAP (*angl*. GTPase activating protein) ali proteine GAP ter GEF (*angl*. guanine nucleotide exchange factor), kar aktivira oziroma inaktivira male GTP-aze, ki preko uravnavanja rasti, migracije in adhezije vplivajo na rakotvorne procese [213]. Pleksini lahko vplivajo na delovanje dveh družin malih GTP-az, Rho in Ras [214]. Posledice interakcije z Rho GTP-azami so odvisne od tipa pleksina in celotnega biološkega konteksta, saj lahko v različnih okoliščinah tako aktivirajo kot inaktivirajo Rho GTP-azno aktivnost [215, 216]. V nasprotju pa interakcija z Ras GTP-azami vedno vodi do njihove inaktivacije. Pleksina A1 in B1 tako inaktivirata R-Ras, B1 pa tudi M-Ras [216-218], povezava med pleksini in proteini Ras, ki so udeleženi pri kancerogenezi (K-Ras, H-Ras in N-Ras), pa do sedaj še ni bila raziskana. Študije so prav tako pokazale, da so konstrukti pleksina A1 brez vezavne domene za semaforin ali brez celotne zunajcelične domene konstitutivno aktivirani [176], kar nakazuje možnost, da bi tudi proteolitska odstranitev zunajcelične domene s katepsini lahko imela enake posledice, torej bi vodila v zmanjšano aktivnost Ras GTP-az. Meritve aktivnosti K-Ras in H-Ras v liniji MDA-MB-231 po tretmaju s katepsini potrjujejo to hipotezo, ki je še podkrepljena z dejstvom, da je ta učinek dosti manjši v liniji MCF-7, kjer je izražanje pleksinov na meji zaznave (slike 31–33).

Pleksini pa niso edini substrati katepsinov, ki bi lahko vplivali na GTP-azno aktivnost. Med njimi je tudi receptor EGFR, ki po vezavi ustreznega liganda sproži aktivacijo proteinov Ras. Ardito in sod. so pokazali, da njegova odstranitev zmanjša aktivnost K-Ras v adenokarcinomu trebušne slinavke [219]. To se sklada z idejo, da bi odstranitev njegove zunajcelične domene s katepsini zmanjšala aktivnost Ras v celicah, kar bi bil komplementarni učinek proteolitske aktivacije pleksinov. Potrebno pa se je zavedati, da je signalizacija z Ras proteini zelo kompleksen in široko reguliran proces, saj je vanj vpletenih tudi več drugih receptorjev, na male GTP-aze pa lahko dodatno vplivajo tudi drugi znotrajcelični proteini nižje v signalizacijski verigi [213, 214, 217, 220].

Na podlagi zbranih rezultatov lahko predlagamo molekularni model delovanja cisteinskih katepsinov, ki se izločajo v zunajcelični prostor tumorskega mikrookolja (slika 44). Tukaj ne razgrajujejo le delov ECM, ampak tudi cepijo številne molekule za celično adhezijo, kar poruši celične stike in zveča mobilnost celic. Tako se celice lažje ločijo iz primarne tumorske mase, vstopijo v krvni obtok in tvorijo metastaze. Dodatno lahko vplivajo na znotrajcelično signalizacijo s cepitvami receptorjev, kot so pleksini in EGFR, kar ima za posledico spremenjeno aktivnost molekul Ras, kar posledično spremeni celično fiziologijo. Potrebno pa je poudariti, da gre tukaj za enostaven osnovni model, ki

ne more v celoti razložiti kompleksne vloge katepsinov v tumorskem mikrookolju, prav tako pa najverjetneje ne zajema celotnega nabora funkcij, ki jih katepsini v zunajcelični opravljajo. Pri različnih vrstah rakastih obolenj cisteinski katepsini najverjetneje cepijo drugačen nabor membranskih tarč, odvisno od tipa tkiva in vrste tumorja, s tem pa učinkujejo tudi na različne signalne poti.



Slika 44: *Vloga zunajceličnih proteolitskih cepitev cisteinskih katepsinov pri molekularnih mehanizmih, ki potekajo v tumorskem mikrookolju.* V normalnem tkivu se pleksini lahko aktivirajo samo z vezavo liganda, kar sproži aktivacijo njihovih domen GAP (domene, ki aktivirajo GTP-aze) in zmanjša aktivnost Ras GTP-az. Vezava ligandov na receptor za endotelijski rastni faktor (EGFR) pa poveča njihovo aktivnost. Celični stiki in zunajcelični matriks (ECM) so intaktni. Cisteinski katepsini se nahajajo v endo/lizosomskem predelu. V tumorskem mikrookolju pa pride do povečanega izločanja katepsinov iz tumorskih celic in imunskih celic, ki se v velikem številu mobilizirajo v tumor. GAP aktivnost pleksinskih receptorjev je konstitutivno aktivirana zaradi odstranitve zunajcelične domene, hkrati pa procesiranje EGFR povzroči njihovo konstitutivno inaktivacijo. Oboje ima za posledico zmanjšano aktivnost Ras GTP-az. Cepitev molekul CAM prekine celične stike in skupaj z razgradnjo ECM omogoči hitrejšo migracijo in invazijo tumorskih celic.

5.2 Vloga cisteinskih katepsinov pri apoptozi, sproženi preko receptorja smrti Fas

V drugem delu smo preverjali vpletenost cisteinskih katepsinov, predvsem katepsina B, v apoptozo, sproženo preko receptorja smrti Fas, v različnih človeških celičnih linijah. Spremembe v signalizacijski poti apoptoze so ene izmed temeljnih značilnosti rakastih obolenj, s katerimi rakaste celice uspešno preprečujejo celično smrt. Medtem ko je bilo že večkrat pokazano, da so kaspaze ključne pri izvrševanju apoptoze, sprožene preko receptorjev smrti, obstaja še veliko nejasnosti glede vloge cisteinskih katepsinov v tem procesu.

V raziskavi smo na začetku izbrali rakaste celične linije heterogenega izvora z različnimi nivoji katepsinske aktivnosti (slika 34). Z imunodetekcijo smo nato dodatno preverili vsebnost katepsina B v posameznih linijah (slika 35), saj je bil ta katepsin v prejšnjih študijah največkrat povezan s promoviranjem apoptoze [119, 159, 161-163]. Tako zbrani podatki bi lahko bili širše uporabni, ne glede na izvor linije ali vsebnost

cisteinskih katepsinov. Ker so bile na protitelo anti-APO-1, ki z vezavo na receptor smrti Fas sproži apoptozo, občutljive samo celice Jurkat (slika 36), smo vse nadaljnje študije izvedli le na tej celični liniji.

Pokazali smo, da za apoptozo, inducirano z anti-APO-1, aktivnost cisteinskih katepsinov ni kritična (slika 37), čeprav jo spremljajo poškodbe mitohondrijev (slika 39) in lizosomov (slika 40) ter izpust aktivnih katepsinov v citosol (sliki 41 in 42) [221]. Naši rezultati se skladajo z več nedavnimi študijami, ki so pokazale, da katepsini niso ključni za napredovanje Fas posredovane apoptoze v mišjih celicah [156, 165] kot tudi ne v nekaterih človeških celičnih linijah [179].

To nadalje potrjuje dejstvo, da tudi popolna inhibicija katepsinov (sliki 39 in 40) ni imela vpliva na potek apoptoze (slika 37). S tem smo prav tako ovrgli možnost, da katepsini pomembno sodelujejo pri endolizosomalni razgradnji signalizacijskih kompleksov v internalizaciji Fas receptorjev. O tem procesu so poročali Vince in sod. [167]. Pokazali so, da naj bi bili katepsini odgovorni za degradacijo cIAP1-TRAF2 kompleksa. Na podlagi pridobljenih podatkov te možnosti ne moremo ne potrditi kot tudi ne ovreči.

Naši rezultati so v očitnem nasprotju s številnimi zgodnejšimi študijami, ki so nakazovale, da imajo katepsini, še posebej katepsin B, pomembno vlogo že pred poškodbami zunanje mitohondrijske membrane v različnih celičnih linijah v apoptozi, inducirani s TNF-α ali TRAIL-om. Kljub temu ne smemo spregledati dejstva, da v teh študijah apoptoza ni bila preprečena, ampak samo zakasnjena. Tudi ni podatkov o katepsinski aktivnosti v popolnih lizatih ali citosolu. Prav tako je večina spremljala apoptozo samo pri eni časovni točki v pozni apoptozi, ko že prihaja do obsežnih poškodb lizosomov in mitohondrijev, zato so zaključki na podlagi takih opazovanj lahko zavajajoči.

Če bi bili katepsini kritični za permeabilizacijo zunanje membrane mitohondrijev (MOMP), bi njihova inhibicija morala to preprečiti. Kot smo videli pri anti-APO-1 sproženi apoptozi, se to ni zgodilo (slika 37). Prav tako je bila aktivnost katepsinov v citosolu znatno nižja kot v popolnem ekstraktu (sliki 41 in 42). Tudi delež katepsinske aktivnosti v citosolu v primerjavi z deležem poškodovanih lizosomov je bil znatno manjši (slika 40). Vse to nakazuje, da se je samo majhen del katepsinov sprostil iz lizosomov. Zmanjšanje aktivnosti katepsinov v celotnih lizatih, kjer je bila sprožena apoptoza (slika 41), pa lahko pripišemo počasni inaktivaciji katepsinov, ko se sprostijo v okolje z zanje neugodnim pH.

Tako pridemo do vprašanja, ali so katepsini vpleteni v receptorsko posredovano apoptozo in kakšen je mehanizem njihovega delovanja. Ključnega pomena pri tem je, kdaj pride do LMP in posledičnega sproščanja katepsinov v citosol. Nedavna študija je pokazala, da je permeabilizacija lizosomov v fibroblastih od Bax/Bak odvisen proces, kar umešča poškodbe lizosomov za poškodbe mitohondrijev [156]. Da pride do destabilizacije lizosomov zelo pozno pri Fas sproženi apoptozi, so pokazali tudi drugi avtorji [165, 166]. To bi lahko razložilo, zakaj katepsinski inhibitorji ne zaščitijo mitohondrijev. Kaspazni inhibitor Z-VAD-FMK je preprečil tako LMP in MOMP, kar nakazuje, da se membrane lizosomov poškodujejo po aktivaciji kaspaze 8 in morda po poškodbah mitohondrijev. Po LMP najverjetneje pride do cepitve Bid-a in aktivacije notranje poti apoptoze. To podpira študija [165], kjer so opazili zmanjšanje cepitve Bid-a v celicah z izbitim genom za katepsin B. To nadalje odpira možnost, da so katepsini vpleteni v ojačevalno zanko, ki vključuje mitohondrije in lizosome [138, 222]. Vloga te ojačevalne zanke pa je najverjetneje odvisna od celičnega tipa in signalov, ki sprožijo apoptozo.

Različne funkcije cisteinskih katepsinov izven lizosomov, ki jih opravljajo tako zunajcelično kot v citoplazmi, so najverjetneje odvisne od celotnega biološkega okolja, v katerem se nahajajo, in od vrste signalov, ki sprožijo njihov prenos izven celice ali v citoplazmo. Tako prispevajo k razvoju in širjenju tumorjev s cepitvami adhezijskih molekul s površine rakastih celic in vplivajo na signalizacijo znotraj celice preko procesiranja receptorskih molekul, dodatno pa na tumorigenezo vplivajo preko vključevanja v apoptotske signalne poti. Slednja vloga, predvsem pri receptorsko posredovani apoptozi, ostaja dosti bolj kontroverzna. Najverjetneje tukaj katepsini niso ključni izvrševalci, ampak del ojačevalne zanke. Poglobljeno razumevanje njihovega delovanja tako prinaša nove možnosti uporabe njihovih molekularnih tarč pri razvoju novih pristopov pri zdravljenju rakastih obolenj.

6 Zaključki

Doktorska disertacija prinaša nova spoznanja o molekularnih mehanizmih, preko katerih cisteinski katepsini vplivajo na procese tumorigeneze.

S proteomsko identifikacijo smo pokazali, da cisteinska katepsina L in S cepita zunanje domene določenih membranskih proteinov, ki so povezani z rakom.

Do procesiranja substratov pride tako v celičnih kulturah z dodanimi rekombinantnimi katepsini, v *in vitro* modelu tumorskega mikrookolja z endogenimi katepsini kot tudi *in vivo* v tumorjih RIP1-Tag2. V tem modelu izbitje katepsinskih genov vodi v zmanjšanje ali prenehanje procesiranja določenih zunajceličnih domen.

Skupina identificiranih membranskih proteinov ponuja povezavo med zunajcelično aktivnostjo katepsinov in njihovim vplivom na migracijo in invazijo tumorskih celic.

Razvidno je tudi, da lahko cepitve določenih zunajceličnih substratov vplivajo na znotrajcelično signaliziranje z GTP-azami Ras.

Na podlagi zbranih rezultatov smo tako potrdili hipotezo, da cisteinska katepsina S in L v regulirani omejeni proteolizi cepita skupino membranskih proteinov na površini celic, medtem ko katepsin B nima takšne aktivnosti. Naši izsledki tako predstavljajo izhodišče za nadaljnje raziskave posameznih substratov, ki jih procesirajo katepsini in njihove vloge v signalizaciji v mikrookolju tumorja. Substrati imajo lahko dodaten potencial kot morebitni biomarkerji v kliničnih aplikacijah.

Doktorska disertacija nadalje doprinaša nova spoznanja tudi k razumevanju vloge cisteinskih katepsinov pri apoptozi, sproženi preko receptorja smrti Fas. Pri človeški celični liniji Jurkat smo z uporabo inhibitorjev proteaz ovrgli ključno vlogo katepsinov pri sprožitvi apoptoze po tej poti. Čeprav je prišlo do poškodb lizosomov in izpusta katepsinov v citosol, inhibicija cisteinskih katepsinov ni imela vpliva na potek apoptoze. S tem smo potrdili našo hipotezo, da cisteinski katepsini v tem procesu niso ključnega pomena. Kljub temu njihove vloge pri ojačitvi apoptotskega signala ne gre izključiti.

7 Zahvale

Najprej se bi rada zahvalila mentorju prof. ddr. Borisu Turku in somentorju doc. dr. Marku Fonoviću za njuno vodstvo v času doktorskega študija. Prof. ddr. Turku gre posebna zahvala, ker je me sprejel v svojo raziskovalno skupino na Institutu Jožef Stefan in mi na ta način omogočil, da je to delo sploh začelo nastajati. Doc dr. Fonoviću pa bi rada izrazila iskreno zahvalo za vedno veder osebni pristop, prijazen odziv in za vse strokovne napotke.

Zahvala gre tudi vsem trem članom komisije, prof. dr. Vito Turku, prof. dr. Gregorju Anderluhu in prof. dr. Veroniki Stoka, za kritičen in strokovni pregled ter koristne nasvete pri oblikovanju doktorskega dela.

Hvala dr. Alešu Špesu za pomoč pri objavi s področja programirane celične smrti.

Hvala dr. Mateju Vizovišku in Robertu Vidmarju za sodelovanje pri proteomskih projektih.

Za pripravo reagenta NHS-tridevteroacetata bi se rada zahvalila doc. dr. Janezu Mraljaku in prof. dr. Slavku Pečarju iz Fakultete za Farmacijo Univerze v Ljubljani.

Posebna zahvala gre mojim sodelavkam dr. Maruši Hafner Česen, dr. Ajdi Taler-Verčič, Nežki Kavčič, dr. Katarini Pegan, Barbari Jerič Kokelj in Maji Orehek ter dr. Ani Petelin. Zaradi vas je bilo vse lažje, tudi ko je bilo najhuje.

Hvala tudi vsem ostalim sodelavcem na B1. Vaša prijazna beseda in pomoč sta razjasnila marsikateri oblačen raziskovalni dan.

Hvala moji celotni družini, Mihu, predvsem pa očetu im mami. Bojan in Olga, brez vaju ne bi šlo! Hvala za vse!

Literatura in viri

1. Willstaetter R, Bamann E. Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukocyten. *Hoppe-Seyler´s Zeitschrift für physiologische Chemie.* 1929;180(1-3):127-143.

2. Turk D, Guncar G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* Feb 2003;59(Pt 2):203-213.

3. Turk B, Turk D, Salvesen GS. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des.* 2002;8(18):1623-1637.

4. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta.* Mar 7 2000;1477(1-2):98-111.

5. Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *Embo J.* Sep 3 2001;20(17):4629-4633.

6. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* Jan 1 2004;32(Database issue):D160-164.

7. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta.* Jan 2012;1824(1):68-88.

8. Conus S, Simon HU. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol.* Dec 1 2008;76(11):1374-1382.

9. Turk B, Turk D, Turk V. Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J.* Apr 4 2012;31(7):1630-1643.

10. Turk D, Guncar G, Podobnik M, Turk B. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem.* Feb 1998;379(2):137-147.

11. Alves LC, Melo RL, Sanderson SJ, et al. S1 subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase, CPB, of Leishmania mexicana compared with cruzain, human cathepsin L and papain using substrates containing non-natural basic amino acids. *Eur J Biochem.* Mar 2001;268(5):1206-1212.

12. Choe Y, Leonetti F, Greenbaum DC, et al. Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *J Biol Chem.* May 5 2006;281(18):12824-12832.

13. Melo RL, Barbosa Pozzo RC, Alves LC, et al. Synthesis and hydrolysis by cathepsin B of fluorogenic substrates with the general structure benzoyl-X-ARG-MCA containing non-natural basic amino acids at position X. *Biochim Biophys Acta.* May 5 2001;1547(1):82-94.

14. Mittl PRE, Grutter MG. Opportunities for structure-based design of protease-directed drugs. *Curr Opin Struc Biol.* Dec 2006;16(6):769-775.

15. Twining SS. Regulation of proteolytic activity in tissues. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1994;29(5):315-383.

16. Pungercar JR, Caglic D, Sajid M, et al. Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity. *FEBS J.* Feb 2009;276(3):660-668.

17. Vasiljeva O, Dolinar M, Pungercar JR, Turk V, Turk B. Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans. *FEBS Lett.* Feb 14 2005;579(5):1285-1290.

18. Dahl SW, Halkier T, Lauritzen C, et al. Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry.* Feb 13 2001;40(6):1671-1678.

19. Turk B, Turk V, Turk D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem.* Mar-Apr 1997;378(3-4):141-150.

20. Turk B, Dolenc I, Turk V, Bieth JG. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry.* Jan 12 1993;32(1):375-380.

21. Turk B, Dolenc I, Zerovnik E, Turk D, Gubensek F, Turk V. Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site. *Biochemistry.* Dec 13 1994;33(49):14800-14806.

22. Kirschke H, Wiederanders B, Bromme D, Rinne A. Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J.* Dec 1 1989;264(2):467-473.

23. Barrett AJ, Fritz H, Grubb A, et al. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J.* May 15 1986;236(1):312.

24. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* Jul 22 1991;285(2):213-219.

25. Turk V, Stoka V, Turk D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front Biosci.* 2008;13:5406-5420.

26. Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, et al. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of the American Society of Nephrology.* Oct 2005;16(10):2920-2930.

27. Jones AL, Hulett MD, Parish CR. Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunol Cell Biol.* Apr 2005;83(2):106-118.

28. Abrahamson M, Barrett AJ, Salvesen G, Grubb A. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem.* Aug 25 1986;261(24):11282-11289.

29. Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie.* Feb 2008;90(2):194-207.

30. Turk V, Turk B, Guncar G, Turk D, Kos J. Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv Enzyme Regul.* 2002;42:285-303.

31. Goulet B, Baruch A, Moon NS, et al. 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. *Mol Cell.* Apr 23 2004;14(2):207-219.

32. Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. *Biol Chem.* Jun 2007;388(6):555-560.

33. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov.* Sep 2006;5(9):785-799.

34. Turk B, Stoka V. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett.* Jun 19 2007;581(15):2761-2767.

35. Zavasnik-Bergant T, Turk B. Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens.* May 2006;67(5):349-355.

36. Reiser J, Adair B, Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest.* Oct 2010;120(10):3421-3431.

37. Furuyama N, Fujisawa Y. Distinct roles of cathepsin K and cathepsin L in osteoclastic bone resorption. *Endocr Res.* May 2000;26(2):189-204.

38. Salminen-Mankonen HJ, Morko J, Vuorio E. Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis. *Curr Drug Targets.* Feb 2007;8(2):315-323.

39. Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk V, Turk B. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des.* 2007;13(4):387-403.

40. Fonovic M, Turk B. Cysteine cathepsins and their potential in clinical therapy and biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl.* Jun 2014;8(5-6):416-426.

41. Kirschke H, Barrett AJ, Rawlings ND. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile.* 1995;2(14):1581-1643.

42. Bell-McGuinn KM, Garfall AL, Bogyo M, Hanahan D, Joyce JA. Inhibition of cysteine cathepsin protease activity enhances chemotherapy regimens by decreasing tumor growth and invasiveness in a mouse model of multistage cancer. *Cancer Res.* Aug 1 2007;67(15):7378-7385.

43. Gocheva V, Zeng W, Ke D, et al. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* Mar 1 2006;20(5):543-556.

44. Joyce JA, Baruch A, Chehade K, et al. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell.* May 2004;5(5):443-453.

45. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* Mar 4 2011;144(5):646-674.

46. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* Apr 2009;9(4):239-252.

47. Mason SD, Joyce JA. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* Apr 2011;21(4):228-237.

48. Kallinowski F, Vaupel P, Runkel S, et al. Glucose uptake, lactate release, ketone body turnover, metabolic micromilieu, and pH distributions in human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res.* Dec 15 1988;48(24 Pt 1):7264-7272.

49. Hanahan D. Rethinking the war on cancer. *Lancet.* Feb 8 2014;383(9916):558-563.

50. Bellone M, Calcinotto A, Filipazzi P, De Milito A, Fais S, Rivoltini L. The acidity of the tumor microenvironment is a mechanism of immune escape that can be overcome by proton pump inhibitors. *Oncoimmunology.* Jan 1 2013;2(1):e22058.

51. De Milito A, Canese R, Marino ML, et al. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer.* Jul 1 2010;127(1):207-219.

52. Arribas J, Borroto A. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev.* Dec 2002;102(12):4627-4638.

53. Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* Aug 2011;32(8):380-387.

54. Artigiani S, Barberis D, Fazzari P, et al. Functional regulation of semaphorin receptors by proprotein convertases. *J Biol Chem.* Mar 21 2003;278(12):10094-10101.

55. Kaup M, Dassler K, Reineke U, Weise C, Tauber R, Fuchs H. Processing of the human transferrin receptor at distinct positions within the stalk region by neutrophil elastase and cathepsin G. *Biol Chem.* Jun 2002;383(6):1011-1020.

56. Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:515-541.

57. Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res.* Nov 15 1998;58(22):5123-5129.

58. Fortini ME. Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol.* Oct 2001;13(5):627-634.

59. Okamoto I, Kawano Y, Murakami D, et al. Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J Cell Biol.* Nov 26 2001;155(5):755-762.

60. Rodrigues GA, Park M. Autophosphorylation modulates the kinase activity and oncogenic potential of the Met receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* Jul 1994;9(7):2019-2027.

61. Vecchi M, Carpenter G. Constitutive proteolysis of the ErbB-4 receptor tyrosine kinase by a unique, sequential mechanism. *J Cell Biol.* Nov 17 1997;139(4):995-1003.

62. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta.* Apr 2004;342(1-2):41-69.

63. Gocheva V, Joyce JA. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle.* Jan 1 2007;6(1):60-64.

64. Jedeszko C, Sloane BF. Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem.* Nov 2004;385(11):1017-1027.

65. Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer.* Oct 2006;6(10):764-775.

66. Reinheckel T, Peters C, Kruger A, Turk B, Vasiljeva O. Differential Impact of Cysteine Cathepsins on Genetic Mouse Models of De novo Carcinogenesis: Cathepsin B as Emerging Therapeutic Target. *Front Pharmacol.* 2012;3:133.

67. Burden RE, Snoddy P, Buick RJ, Johnston JA, Walker B, Scott CJ. Recombinant cathepsin S propeptide attenuates cell invasion by inhibition of cathepsin L-like proteases in tumor microenvironment. *Mol Cancer Ther.* Mar 2008;7(3):538-547.

68. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer.* Jul 2003;3(7):489-501.

69. Jaiswal JK, Andrews NW, Simon SM. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J Cell Biol.* Nov 25 2002;159(4):625-635.

70. Roshy S, Sloane BF, Moin K. Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev.* Jun-Sep 2003;22(2-3):271-286.

71. Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 25 1995;92(9):3849-3853.

72. Mai J, Finley RL, Jr., Waisman DM, Sloane BF. Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *J Biol Chem.* Apr 28 2000;275(17):12806-12812.

73. Cavallo-Medved D, Mai J, Dosescu J, Sameni M, Sloane BF. Caveolin-1 mediates the expression and localization of cathepsin B, pro-urokinase plasminogen

activator and their cell-surface receptors in human colorectal carcinoma cells. *J Cell Sci.* Apr 1 2005;118(Pt 7):1493-1503.

74. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* May 28 2010;32(5):593-604.

75. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* Mar 2012;33(3):119-126.

76. Wang HW, Joyce JA. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. *Cell Cycle.* Dec 15 2010;9(24):4824-4835.

77. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* Feb 1 2010;24(3):241-255.

78. Shree T, Olson OC, Elie BT, et al. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev.* Dec 1 2011;25(23):2465-2479.

79. Lohmuller T, Wenzler D, Hagemann S, et al. Toward computer-based cleavage site prediction of cysteine endopeptidases. *Biol Chem.* Jun 2003;384(6):899-909.

80. Webb SD, Sherratt JA, Fish RG. Alterations in proteolytic activity at low pH and its association with invasion: a theoretical model. *Clin Exp Metastasis.* Jul 1999;17(5):397-407.

81. Creemers LB, Hoeben KA, Jansen DC, Buttle DJ, Beertsen W, Everts V. Participation of intracellular cysteine proteinases, in particular cathepsin B, in degradation of collagen in periosteal tissue explants. *Matrix Biol.* Mar 1998;16(9):575-584.

82. Mai J, Sameni M, Mikkelsen T, Sloane BF. Degradation of extracellular matrix protein tenascin-C by cathepsin B: an interaction involved in the progression of gliomas. *Biol Chem.* Sep 2002;383(9):1407-1413.

83. Bromme D, Wilson. Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis. In: (eds.) WCPaRPM, ed. *Extracellular Matrix Degradation, Biology of Extracellular Matrix* Berlin Heidelberg Springer-Verlag; 2011.

84. Fonovic M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta.* Aug 2014;1840(8):2560-2570.

85. Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *Embo J.* Mar 15 2000;19(6):1187-1194.

86. Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett.* Dec 15 2000;486(3):247-251.

87. Wang B, Sun J, Kitamoto S, et al. Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem.* Mar 3 2006;281(9):6020-6029.

88. Goretzki L, Schmitt M, Mann K, et al. Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett.* Feb 3 1992;297(1-2):112-118.

89. Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, et al. Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). *J Biol Chem.* Mar 15 1991;266(8):5147-5152.

90. Murphy G, Ward R, Gavrilovic J, Atkinson S. Physiological mechanisms for metalloproteinase activation. *Matrix Suppl.* 1992;1:224-230.

91. Kostoulas G, Lang A, Nagase H, Baici A. Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett.* Jul 23 1999;455(3):286-290.

92. Matsunaga E, Okanoya K. Cadherins: potential regulators in the faculty of language. *Curr Opin Neurobiol.* Oct 2014;28C:28-33.

93. Hanahan D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature.* May 9-15 1985;315(6015):115-122.

94. Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J Virol.* Jul 1994;68(7):4358-4368.

95. Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol.* Mar 1992;12(3):954-961.

96. Elie BT, Gocheva V, Shree T, Dalrymple SA, Holsinger LJ, Joyce JA. Identification and pre-clinical testing of a reversible cathepsin protease inhibitor reveals anti-tumor efficacy in a pancreatic cancer model. *Biochimie.* Nov;92(11):1618-1624.

97. Repnik U, Hafner Cesen M, Turk B. Lysosomal membrane permeabilization in cell death: Concepts and challenges. *Mitochondrion.* Jun 28 2014.

98. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.

99. Rastogi RP, Richa, Sinha RP. Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity. *Excli J.* 2009;8:155-181.

100. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Sep 2010;11(9):621-632.

101. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* Jan 2009;16(1):3-11.

102. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* Oct 18 1996;87(2):171.

103. Gutierrez GJ, Ronai Z. Ubiquitin and SUMO systems in the regulation of mitotic checkpoints. *Trends Biochem Sci.* Jun 2006;31(6):324-332.

104. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci.* Oct 1 2010;123(Pt 19):3209-3214.

105. Ribe EM, Serrano-Saiz E, Akpan N, Troy CM. Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. *Biochem J.* Oct 15 2008;415(2):165-182.

106. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem.* Aug 14 2009;284(33):21777-21781.

107. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424.

108. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* May 2007;8(5):405-413.

109. Alenzi FQ, Lotfy M, Wyse R. Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010;11(2):271-280.

110. Pereira WO, Amarante-Mendes GP. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scand J Immunol.* May 2011;73(5):401-407.

111. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell.* Feb 12 2010;37(3):299-310.

112. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jan 2008;9(1):47-59.

113. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* Dec 2000;7(12):1166-1173.

114. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol.* Dec 2009;21(6):871-877.

115. Kim H, Tu HC, Ren D, et al. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* Nov 13 2009;36(3):487-499.

116. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell.* Nov 1 2002;111(3):331-342.

117. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* Aug 28 1998;281(5381):1305-1308.

118. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* Feb 23 2001;104(4):487-501.

119. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J.* Jun 2009;23(6):1625-1637.

120. French LE, Tschopp J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ.* Jan 2003;10(1):117-123.

121. Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, et al. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem.* Jan 6 1995;270(1):387-391.

122. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science.* Jun 30 2000;288(5475):2351-2354.

123. Chan KF, Siegel MR, Lenardo JM. Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis. *Immunity.* Oct 2000;13(4):419-422.

124. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* May 19 1995;81(4):505-512.

125. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* May 15 1997;16(10):2794-2804.

126. Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Aug 2008;9(8):655-662.

127. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* Mar 16 1998;17(6):1675-1687.

128. Wajant H. Principles and mechanisms of CD95 activation. *Biol Chem.* Aug 9 2014.

129. Stennicke HR, Salvesen GS. Caspase assays. *Methods Enzymol.* 2000;322:91-100.

130. Lavrik IN. Systems biology of death receptor networks: live and let die. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1259.

131. Fouque A, Debure L, Legembre P. The CD95/CD95L signaling pathway: a role in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* Aug 2014;1846(1):130-141.

132. Schneider-Brachert W, Heigl U, Ehrenschwender M. Membrane trafficking of death receptors: implications on signalling. *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):14475-14503.

133. Okura T, Gong L, Kamitani T, et al. Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol.* Nov 15 1996;157(10):4277-4281.

134. Chakraborty M, Qiu SG, Vasudevan KM, Rangnekar VM. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and Fasl to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res.* Oct 1 2001;61(19):7255-7263.

135. Berg T, Gjoen T, Bakke O. Physiological functions of endosomal proteolysis. *Biochem J.* Apr 15 1995;307 (Pt 2):313-326.

136. Claus V, Jahraus A, Tjelle T, et al. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem.* Apr 17 1998;273(16):9842-9851.

137. Turk B, Stoka V, Rozman-Pungercar J, et al. Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biol Chem.* Jul-Aug 2002;383(7-8):1035-1044.

138. Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta.* Jan 2012;1824(1):22-33.

139. Stoka V, Turk B, Schendel SL, et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem.* Feb 2 2001;276(5):3149-3157.

140. Cirman T, Oresic K, Mazovec GD, et al. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem.* Jan 30 2004;279(5):3578-3587.

141. Droga-Mazovec G, Bojic L, Petelin A, et al. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem.* Jul 4 2008;283(27):19140-19150.

142. Houseweart MK, Vilaythong A, Yin XM, Turk B, Noebels JL, Myers RM. Apoptosis caused by cathepsins does not require Bid signaling in an in vivo model of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Cell Death Differ.* Dec 2003;10(12):1329-1335.

143. Blomgran R, Zheng L, Stendahl O. Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *J Leukoc Biol.* May 2007;81(5):1213-1223.

144. Schotte P, Van Criekinge W, Van de Craen M, et al. Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 9 1998;251(1):379-387.

145. Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene.* Oct 27 2008;27(50):6434-6451.

146. Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem Cell Biol.* Apr 2008;129(4):389-406.

147. Chwieralski CE, Welte T, Buhling F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis.* Feb 2006;11(2):143-149.

148. Ostenfeld MS, Fehrenbacher N, Hoyer-Hansen M, Thomsen C, Farkas T, Jaattela M. Effective tumor cell death by sigma-2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. *Cancer Res.* Oct 1 2005;65(19):8975-8983.

149. Cesen MH, Repnik U, Turk V, Turk B. Siramesine triggers cell death through destabilisation of mitochondria, but not lysosomes. *Cell Death Dis.* 2013;4:e818.

150. Miller DK, Griffiths E, Lenard J, Firestone RA. Cell killing by lysosomotropic detergents. *J Cell Biol.* Dec 1983;97(6):1841-1851.

151. Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. *J Biol Chem.* Sep 28 2007;282(39):28960-28970.

152. Hsieh MH, Varadi G, Flomenberg N, Korngold R. Leucyl-leucine methyl ester-treated haploidentical donor lymphocyte infusions can mediate graft-versus-leukemia activity with minimal graft-versus-host disease risk. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(6):303-315.

153. Kagedal K, Johansson AC, Johansson U, et al. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis--involvement of Bax? *Int J Exp Pathol.* Oct 2005;86(5):309-321.

154. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology.* Jul 2004;40(1):185-194.

155. Feldstein AE, Werneburg NW, Li Z, Bronk SF, Gores GJ. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Jun 2006;290(6):G1339-1346.

156. Oberle C, Huai J, Reinheckel T, et al. Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell Death Differ.* Jul 2010;17(7):1167-1178.

157. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* Nov 2001;3(11):E255-263.

158. Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Gores GJ. Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor-alpha-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications. *Am J Pathol.* Dec 2001;159(6):2045-2054.

159. Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene.* Apr 12 2004;23(16):2881-2890.

160. Repnik U, Cesen MH, Turk B. The endolysosomal system in cell death and survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Jan 2013;5(1):a008755.

161. Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol.* May 28 2001;153(5):999-1010.

162. Groth-Pedersen L, Jaattela M. Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes. *Cancer Lett.* May 28 2010;332(2):265-274.

163. Kirkegaard T, Jaattela M. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim Biophys Acta.* Apr 2009;1793(4):746-754.

164. Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W. Cathepsin B mediates TRAIL-induced apoptosis in oral cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* Mar 2006;132(3):171-183.

165. Bojic L, Petelin A, Stoka V, et al. Cysteine cathepsins are not involved in Fas/CD95 signalling in primary skin fibroblasts. *FEBS Lett.* Nov 13 2007;581(27):5185-5190.

166. Wattiaux R, Wattiaux-de Coninck S, Thirion J, Gasingirwa MC, Jadot M. Lysosomes and Fas-mediated liver cell death. *Biochem J.* Apr 1 2007;403(1):89-95.

167. Vince JE, Chau D, Callus B, et al. TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J Cell Biol.* Jul 14 2008;182(1):171-184.

168. Zhang J, Shridhar R, Dai Q, et al. Cystatin m: a novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer. *Cancer Res.* Oct 1 2004;64(19):6957-6964.

169. Elie BT, Gocheva V, Shree T, Dalrymple SA, Holsinger LJ, Joyce JA. Identification and pre-clinical testing of a reversible cathepsin protease inhibitor reveals anti-tumor efficacy in a pancreatic cancer model. *Biochimie.* Nov 2010;92(11):1618-1624.

170. Vizovisek M, Vidmar R, Van Quickelberghe E, et al. Fast profiling of protease specificity reveals similar substrate specificities for cathepsins K, L and S. *Proteomics.* Jan 27 2015; doi: 10.1002/pmic.201400460.

171. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* Dec 2008;26(12):1367-1372.

172. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res.* Apr 1 2011;10(4):1794-1805.

173. Li Z, Adams RM, Chourey K, Hurst GB, Hettich RL, Pan C. Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *J Proteome Res.* Mar 2 2012;11(3):1582-1590.

174. Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J. g:Profiler--a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res.* Jul 2007;35(Web Server issue):W193-200.

175. Tamagnone L. Emerging role of semaphorins as major regulatory signals and potential therapeutic targets in cancer. *Cancer Cell.* Aug 14 2012;22(2):145-152.

176. Takahashi T, Strittmatter SM. Plexina1 autoinhibition by the plexin sema domain. *Neuron.* Feb 2001;29(2):429-439.

177. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jul 2008;9(7):517-531.

178. Bromme D, Nallaseth FS, Turk B. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods.* Feb 2004;32(2):199-206.

179. Klaric M, Tao S, Stoka V, Turk B, Turk V. Cysteine cathepsins are not critical for TNF-alpha-induced cell death in T98G and U937 cells. *Biochim Biophys Acta.* Sep 2009;1794(9):1372-1377.

180. Kos J, Sekirnik A, Premzl A, et al. Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res.* May 15 2005;306(1):103-113.

181. Turk B, Turk V. Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *J Biol Chem.* Aug 14 2009;284(33):21783-21787.

182. Agard NJ, Wells JA. Methods for the proteomic identification of protease substrates. *Curr Opin Chem Biol.* Dec 2009;13(5-6):503-509.

183. Doucet A, Butler GS, Rodriguez D, Prudova A, Overall CM. Metadegradomics: toward in vivo quantitative degradomics of proteolytic post-translational

modifications of the cancer proteome. *Mol Cell Proteomics.* Oct 2008;7(10):1925-1951.

184. Guo L, Eisenman JR, Mahimkar RM, et al. A proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases. *Mol Cell Proteomics.* Jan 2002;1(1):30-36.

185. Morrison CJ, Butler GS, Rodriguez D, Overall CM. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. *Curr Opin Cell Biol.* Oct 2009;21(5):645-653.

186. Butler GS, Overall CM. Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. *Nat Rev Drug Discov.* Dec 2009;8(12):935-948.

187. Villarreal L, Mendez O, Salvans C, Gregori J, Baselga J, Villanueva J. Unconventional secretion is a major contributor of cancer cell line secretomes. *Mol Cell Proteomics.* May 2013;12(5):1046-1060.

188. Musil D, Zucic D, Turk D, et al. The refined 2.15 A X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* Sep 1991;10(9):2321-2330.

189. Impens F, Colaert N, Helsens K, et al. A quantitative proteomics design for systematic identification of protease cleavage events. *Mol Cell Proteomics.* Oct 2010;9(10):2327-2333.

190. Gevaert K, Goethals M, Martens L, et al. Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat Biotechnol.* May 2003;21(5):566-569.

191. Kleifeld O, Doucet A, auf dem Keller U, et al. Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat Biotechnol.* Mar 2010;28(3):281-288.

192. Prudova A, auf dem Keller U, Butler GS, Overall CM. Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics.* May 2010;9(5):894-911.

193. Staes A, Impens F, Van Damme P, et al. Selecting protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography. *Nat Protoc.* Aug 2011;6(8):1130-1141.

194. Timmer JC, Enoksson M, Wildfang E, et al. Profiling constitutive proteolytic events in vivo. *Biochem J.* Oct 1 2007;407(1):41-48.

195. Van Damme P, Van Damme J, Demol H, Staes A, Vandekerckhove J, Gevaert K. A review of COFRADIC techniques targeting protein N-terminal acetylation. *BMC Proc.* 2009;3 Suppl 6:S6.

196. Biniossek ML, Nagler DK, Becker-Pauly C, Schilling O. Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S. *J Proteome Res.* Dec 2 2011;10(12):5363-5373.

197. Swendeman S, Mendelson K, Weskamp G, et al. VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ Res.* Oct 24 2008;103(9):916-918.

198. Dassler K, Zydek M, Wandzik K, Kaup M, Fuchs H. Release of the soluble transferrin receptor is directly regulated by binding of its ligand ferritransferrin. *J Biol Chem.* Feb 10 2006;281(6):3297-3304.

199. Nam HK, Liu J, Li Y, Kragor A, Hatch NE. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) protein regulates osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* Nov 11 2011;286(45):39059-39071.

200. Mikesch JH, Schier K, Roetger A, Simon R, Buerger H, Brandt B. The expression and action of decay-accelerating factor (CD55) in human malignancies and cancer therapy. *Cell Oncol.* 2006;28(5-6):223-232.

201. Cavallaro U, Dejana E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Mar 2011;12(3):189-197.

202. Ofori-Acquah SF, King JA. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl Res.* Mar 2008;151(3):122-128.

203. Raveh S, Gavert N, Ben-Ze'ev A. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. *Cancer Lett.* Sep 18 2009;282(2):137-145.

204. Schwarz Q, Ruhrberg C. Neuropilin, you gotta let me know: should I stay or should I go? *Cell Adh Migr.* Jan-Mar 2010;4(1):61-66.

205. Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Aug 2008;9(8):603-615.

206. Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer.* Apr 2011;11(4):254-267.

207. Engebraaten O, Bjerkvig R, Pedersen PH, Laerum OD. Effects of EGF, bFGF, NGF and PDGF(bb) on cell proliferative, migratory and invasive capacities of human brain-tumour biopsies in vitro. *Int J Cancer.* Jan 21 1993;53(2):209-214.

208. Petit AM, Rak J, Hung MC, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol.* Dec 1997;151(6):1523-1530.

209. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med.* Nov 15 2007;357(20):2040-2048.

210. Pasquale EB. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer.* Mar 2010;10(3):165-180.

211. Staton CA, Kumar I, Reed MW, Brown NJ. Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. *J Pathol.* Jul 2007;212(3):237-248.

212. Capparuccia L, Tamagnone L. Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin. *J Cell Sci.* Jun 1 2009;122(Pt 11):1723-1736.

213. Puschel AW. GTPases in semaphorin signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2007;600:12-23.

214. Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell.* Oct 13 2000;103(2):227-238.

215. Roney KE, O'Connor BP, Wen H, et al. Plexin-B2 negatively regulates macrophage motility, Rac, and Cdc42 activation. *PLoS One.* 2011;6(9):e24795.

216. Toyofuku T, Yoshida J, Sugimoto T, et al. FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nat Neurosci.* Dec 2005;8(12):1712-1719.

217. Oinuma I, Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M. The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science.* Aug 6 2004;305(5685):862-865.

218. Saito Y, Oinuma I, Fujimoto S, Negishi M. Plexin-B1 is a GTPase activating protein for M-Ras, remodelling dendrite morphology. *EMBO Rep.* Jun 2009;10(6):614-621.

219. Ardito CM, Gruner BM, Takeuchi KK, et al. EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell.* Sep 11 2012;22(3):304-317.

220. Saito Y, Oinuma I, Fujimoto S, Negishi M. Plexin-B1 is a GTPase activating protein for M-Ras, remodelling dendrite morphology. *EMBO Rep.* Jun 2009;10(6):614-621.

221. Spes A, Sobotic B, Turk V, Turk B. Cysteine cathepsins are not critical for TRAIL- and CD95-induced apoptosis in several human cancer cell lines. *Biol Chem.* Dec 2012;393(12):1417-1431.

222. Schrader K, Huai J, Jockel L, Oberle C, Borner C. Non-caspase proteases: triggers or amplifiers of apoptosis? *Cell Mol Life Sci.* May 2010;67(10):1607-1618.

Kazalo slik

Slika 1: *Zvitje zrele oblike cisteinskega katepsina – endopeptidaze.* Prikazana je struktura dvoverižne oblike nativnega katepsina L. Alfa vijačnice in beta ploskve so označene modro oz. rdeče. Z rumeno sta v aktivnem mestu označena Cys25 in His159. Povzeto po [7]..... 2

Slika 2: *Shematska predstavitev vezave proteinskega substrata na cisteinski katepsin po Schechterju in Bergerju.* Površino katepsina, na katero se veže stranska veriga enega aminokislinskega preostanka substrata, imenujejo substratno vezavno mesto. Ta so označena s S1 do Sn v smeri proti N-koncu (non-prime S mesta) in S1' do Sn' v smeri proti C-koncu (prime S mesta). Aminokislinski preostanki substrata so prav tako ustrezno označeni s P1-Pn in P1'-Pn'. Povzeto po [10, 14]. 3

Slika 3: *Cisteinske katepsine izločajo tumorske in s tumorjem povezane celice.* Katepsini, ki jih izločajo, so navedeni zraven tipa celic. Prirejeno po [47, 65]. 8

Slika 4: *S katepsini posredovana cepitev ECM*. Povzeto po [84, 88-90]. 11

Slika 5: *Delitev kaspaz glede na njihovo vlogo.* Povzeto po [106]. 14

Slika 6: *Delitev proteinov družine Bcl-2 (A) in profil interakcij antiapoptotskih proteinov Bcl-2 s proteini, ki vsebujejo samo regijo BH3 (B).* Slika je povzeta po [111]. 15

Slika 7: *Splošen mehanizem signaliziranja apoptoze, ki ga sprožijo ligandi smrti.* Slika je povzeta po [119]. Vezava ligandov smrti na receptorje smrti sproži tako celično smrt kot tudi preživetvene poti preko aktivacije MAPK in NF-κβ. 17

Slika 8: *Signalizacijski poti, sproženi preko aktivacije receptorja Fas*. Povzeto po [119, 130]. 18

Slika 9: *Mehanizmi permeabilizacije lizosomske membrane.* Povzeto po [138, 159]..... 21

Slika 10: *Shema protokola za določitev cepitvenih mest cisteinskih katepsinov.* 36

Slika 11: *Živost celic MDA-MB-231 po inkubaciji s katepsinom L.* Intaktne celice smo 1 uro inkubirali s katepsinom L (1 ali 0,2 μM) v PBS (pH 6,0; 0,5 mM DTT) pri 37 °C. Inhibiran katepsin (dodan 20 μM E-64) smo uporabili kot negativno kontrolo. Žive celice po inkubaciji so prikazane kot PI (propidijev jodid, ki se veže v DNA; obarva mrtve celice) in Annexin (barvilo Annexin-PE, ki se veže na fosfatidilserin na membranah; obarva apoptotske celice) negativne celice. Živost celic je skoraj popolnoma enaka v kontroli kot v vzorcih, tretiranih s katepsinom L. 41

Slika 12: *Določitev zunajceličnih substratov cisteinskih katepsinov z masno spektrometrijo*. Intaktne celice MDA-MB-231 smo tretirali z aktivnimi katepsini L, S ali B. Kot negativno kontrolo smo uporabili katepsine, inhibirane z E-64. Tortni diagrami za katepsine L, S in B prikazujejo razmerje med proteini z nespremenjeno prisotnostjo (z relativno razliko v razmerju preštetih spektrov (SCR) med 0,3 in 3), z znižano prisotnostjo (s SCR-jem manjšim ali enakim 0,33) in povišano prisotnostjo (s SCR-jem večjim ali enakim 3) v vzorcih po tretiranju s katepsini v primerjavi z negativno kontrolo. Proteini s SCR-jem večjim od 3 so dalje razdeljeni glede na njihovo lokalizacijo (membrana, citoplazma in jedro). Tabele pod ustreznim tortnim diagramom številčno prikazujejo število identificiranih proteinov, ki so razdeljeni glede na SCR, in proteine s SCR-jem nad 3, razdeljene glede na njihovo lokalizacijo v celici. 43

Slika 13: *Pokritost aminokislinskega zaporedja substratov s peptidi, ki smo jih identificirali z masno spektrometrijo*. Peptidi so na zaporedju označeni zasenčeno. Znotrajceličen del in transmembranska regija, ki je tudi podčrtana, sta rdeče barve. Za vsak substrat smo identificirali več peptidov in vsi so bili izključno na ekstracelularni domeni proteinov. To dodatno potrjuje, da je do cepitve prišlo na površini celice. 47

Slika 14: *Imunodetekcija substratov v celični liniji MDA-MB-231*. Intaktne celice MDA-MB-231 so bile tretirane v PBS-ju (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z aktivnimi katepsini L, S in B ali katepsini, inhibiranimi z E-64 kot negativna kontrola. Odcepljene domene ALCAM-a, CD44, efrinskega receptorja tipa A2, L1CAM-a, MUC18, nevropilina 1, pleksina B2 in transferinskega receptorja 1 smo detektirali s prenosom western in imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi v supernatantu tretiranih celic. 48

Slika 15: *Imunodetekcija substratov v celični liniji PANC-1, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Intaktne celice PANC-1 so bile tretirane v PBS-ju (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z aktivnima katepsinoma L in S ali s katepsinoma, inhibiranima z E-64 kot negativna kontrola. Odcepljene domene efrinskega receptorja tipa A2 in pleksina B2 smo detektirali s prenosom western in imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi v supernatantu tretiranih celic. 50

Slika 16: *Imunodetekcija substratov v celični liniji HT-144, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Intaktne celice HT-144 so bile tretirane v PBS-ju (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z aktivnima katepsinoma L in S ali s katepsinoma inhibiranima z E-64 kot negativna kontrola. Odcepljene domene ALCAM-a, efrinskega receptorja, nevropilina in pleksina B2 smo detektirali s prenosom western in imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi v supernatantu tretiranih celic. 51

Slika 17: *Imunodetekcija substratov v celični liniji T98-G, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Intaktne celice T-98G so bile tretirane v PBS-ju (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z aktivnima katepsinoma L in S ali s katepsinoma, inhibiranima z E-64 kot negativna kontrola. Odcepljene domene ALCAM-a, L1CAM-a, MUC18 in pleksina B2 smo detektirali s prenosom western in imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi v supernatantu tretiranih celic. 52

Slika 18: *Imunodetekcija substratov v celični liniji MCF-7, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231*. Intaktne celice MCF-7 so bile tretirane v PBS-ju (pH 6,0; 0,5 mM DTT) z aktivnima katepsinoma L in S ali s katepsinoma, inhibiranima z E-64 kot negativna kontrola. Odcepljene domene ALCAM-a, L1CAM-a, MUC18 in pleksina B2 smo detektirali s prenosom western in imunodetekcijo s specifičnimi protitelesi v supernatantu tretiranih celic. 53

Slika 19: *Deleži identificiranih proteinov, ki imajo določen tip zvitja*. Več kot 60% substratov katepsinov ima imunoglobulinu-podoben, EGF-podoben ali konkavalinu-A-podoben tip zvitja ali kombinacijo naštetega. Le pri 40% najdemo drugačno strukturo domen. 57

Slika 20: *MS/MS spektri poročevalskih peptidov za mesto cepitve nekaterih substratov, posnetih v vzorcih supernatanta*. A) ALCAM. B) Alkalna fosfodiesteraza. C) Transferinski receptor. D) Efrinski receptor tipa A2. Supernatant z odcepljenimi zunanjimi domenami membranskih peptidov smo ločili na SDS-PAGE. Pred razgradnjo s tripsinom smo proste N-konce blokirali in označili z NHS-tridevtero-acetatom. Tako smo po tripsinizaciji dobili označene poročevalske peptide. Ob njihovi detekciji smo sklepali na mesto cepitve le, če niso bili prisotni v negativni kontroli. Za pozitivno identifikacijo je bila prav tako potrebna visoka kvaliteta MS/MS spektra in zanesljivost identifikacije (numerična vrednost zanesljivosti > 100 in verjetnost posteriorne napake < 0,05). Vsak MS/MS spekter vsebuje podatke o masi peptida, napaki določitve mase, verjetnosti posteriorne napake in numerični vrednosti zanesljivosti pravilne določitve peptida. 63

Slika 21: *MS MS/MS spektri poročevalskih peptidov za mesto cepitve nekaterih substratov, posnetih v vzorcih popolnega celičnega lizata*. A) Efrinski receptor tipa A2. B) CD 44. C) EGFR. D) Transferinski receptor 1. Lizat, ki je bil inkubiran s katepsinom, smo ločili na SDS-PAGE. Pred razgradnjo s tripsinom smo proste N-konce blokirali in označili z NHS-tridevtero-acetatom. Tako smo po tripsinizaciji dobili označene poročevalske peptide. Ob njihovi detekciji smo sklepali na mesto cepitve le, če niso bili prisotni v negativni kontroli. Za pozitivno identifikacijo je bila prav tako potrebna visoka kvaliteta MS/MS spektra in zanesljivost identifikacije (numerična vrednost zanesljivosti > 100 in verjetnost posteriorne napake < 0,05). Vsak MS/MS spekter vsebuje podatke o masi peptida, napaki določitve mase, verjetnosti posteriorne napake in numerični vrednosti zanesljivosti pravilne določitve peptida. 67

Slika 22: *Shematska ponazoritev identificiranih mest cepitev na zunajceličnih domenah substratov*..... 68

Slika 23: *Aktivnost cisteinskih katepsinov v supernatantu ko-kultur*. Določena je bila kot hidroliza fluorogenega substrata Z-FR-AMC. Stolpični diagrami prikazujejo povprečje ± SD dveh neodvisnih poskusov. 69

Slika 24: *Imunodetekcija odcepljenih domen v supernatantu ko-kultur*. Celice U-937 smo diferencirali v makrofage in ko-kultivirali s celicami MDA-MB-231. Opazili smo cepitev ALCAM-a, nevropilina 1 in pleksina B2. Velikost odcepljenih domen je v skladu s tistimi, ki jih opazimo po inkubaciji celic MDA-MB-231 z rekombinantnima katepsinoma L in S. Dodatek inhibitorja cisteinskih proteaz (50 μM E-64) prepreči cepitev. Kot dodatni negativni kontroli smo uporabili monokulturi celic U-937 ali MDA-MB-231 z ali brez dodanega E-64. V njih procesiranja nismo zaznali. 69

Slika 25: *Imunodetekcija odcepljenih domen v supernatantu ko-kultur*. Celice U-937 so bile diferencirane v makrofage in ko-kultivirane s celicami MDA-MB-231. Opazili smo cepitve ALCAM-a in nevropilina 1. Velikost odcepljenih domen je v skladu s tistimi, ki jih dobimo po inkubaciji MDA-MB-231 celic z rekombinantnima katepsinoma L in S. Dodatek inhibitorja cisteinskih proteaz (50 μM E-64) prepreči cepitev. Kot dodatni negativni kontroli smo uporabili monokulturi celic U-937 ali MDA-MB-231 z ali brez dodanega E-64. V njih cepitev nismo zaznali. Dodatek splošnih inhibitorjev metaloproteaz GM6001 (10 μM) in batimastata (10 μM) ne prepreči cepitev. 70

Slika 26 : *Imunodetekcija odcepljenih domen v tumorjih RIP1-Tag2*. V topnih ekstraktih tumorjev RIP1-Tag2 smo s prenosom western identificirali odcepljene domene ALCAM-a, CD44 in nevropilina 1. Velikost procesiranih zunajceličnih domen je v veliki meri v skladu s podatki, pridobljenimi s tretiranjem celic MDA-MB-231 s katepsinoma S in L. Aktin je bil uporabljen kot nanašalna kontrola. 71

Slika 27: *Zmanjšana adhezija celic po tretiranju s katepsini B, L in S*. Po spiranju konfluentnih celic MBA-MB-231 s PBS smo dodali katepsini B, L ali S (1 μM) v pufru PBS (pH 7,4; 0,5 mM DTT). Negativni kontroli katepsinov nismo dodali. Pod svetlobnim mikroskopom smo posneli slike takoj po zamenjavi medija s PBS (t = 0) ter po 3 in 10 minutah inkubacije z aktivnimi katepsini. Katepsin L, še močneje pa katepsin S, sproži odlepljanje celic že po treh minutah. Celice v kontroli v tem času ostanejo nespremenjene. 73

Slika 28: *Migracija celic MDA-MB-231 pri pH 7,4*. Celice MDA-MB-231 (1,4 x 10^6 celic na jamico plošče) smo tretirali z aktivnimi katepsini (0,2 in 0,02 μM) v PBS (pH 7,4; 0,5 mM DTT). V negativno kontrolo nismo dodali katepsina. Po 40 urah smo prešteli celice, ki so prišle skozi PET membrano. *p < 0,05; v primerjavi s kontrolo. Stolpčni diagrami prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 73

Slika 29: *Migracija celic MDA-MB-231 pri pH 6,0.* Celice MDA-MB-231 (1,4 x 10^6 celic na jamico plošče) smo tretirali z aktivnimi katepsini (0,2 in 0,02 μM) 10 minut v PBS (pH 6,0; 0,5 mM DTT). V negativno kontrolo nismo dodali katepsina. Po 40 urah smo prešteli celice, ki so prišle skozi PET membrano. *p < 0,05; v primerjavi s kontrolo. Stolpčni diagrami prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 74

Slika 30: *Invazija celic MDA-MB-231*. Celice MDA-MB-231 (1,4 x 10^6 celic na jamico plošče) smo tretirali z aktivnimi katepsini (0,2 μM) 10 minut v PBS (pH 6,0; 0,5 mM DTT). V negativno kontrolo nismo dodali katepsina. Po 6 urah smo z uporabo fluorescenčnega barvila CyQuant GR kvantificirali celice, ki so prodrle v umetni ekstracelularni matriks s čitalcem mikrotiterskih plošč. *p < 0,05; v primerjavi s kontrolo. Stolpčni diagrami prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 74

Slika 31: *Detekcija pleksina B2 in K-ras v popolnih celičnih lizatih celic MDA-MB-231 in MCF-7 s specifičnimi protitelesi*. Aktin smo uporabili kot nanašalno kontrolo. 75

Slika 32: *Detekcija odcepljenih zunajceličnih domen pleksina B2 v supernatantu celic MDA-MB-231 in MCF-7, po tretmaju s katepsinoma L in S, s specifičnimi protitelesi*. Prisotnost proteinskih fragmentov pleksina B2 je v liniji MCF-7 komaj zaznavna, kar je v skladu s proteomskimi podatki. 75

Slika 33: *Ras GTP-azno aktivnost*. Ras GTP-azno aktivnost (H-Ras in K-ras) smo določili v celičnih lizatih MDA-MB-231 (A) in MCF-7 (B) po tretiranju intaktnih celic s katepsinoma L in S (0,05 μM; 1 ura, pH 6,0). Kot negativno kontrolo smo uporabili katepsine, ki so bili predhodno inhibirani z E-64. V kontrolnem poskusu so bili celični lizati netretiranih celic inkubirani z GTPγS (sproži GTP-azno aktivnost) ali GDP (inhibira GTP-azno aktivnost). Test GTP-azne aktivnosti je pokazal, da cepitve zunajceličnih domen s katepsinoma L in S le rahlo zniža Ras GTP-azno aktivnost v liniji MCF-7, medtem ko je v liniji MDA-MB-231 učinek zelo izrazit. Tukaj ima procesiranje zunajceličnih domen podoben učinek kot inhibicija z GDP. 76

Slika 34*: Aktivnost cisteinskih katepsinov v celotnih celičnih lizatih pri izbranih celičnih linijah*. Določena je bila kot hidroliza fluorogenega substrata Z-FR-AMC in Z-RR-AMC. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 77

Slika 35: *Imunodetekcija katepsina B v celotnih celičnih lizatih pri izbranih celičnih linijah*. 78

Slika 36: *Apoptoza, sprožena z anti-APO-1, je prikazana kot delež Annexin V-PE pozitivnih celic, kar vključuje tudi Annexin V-PE in PI pozitivne celice*. Celične linije HeLa, HuH-7 in U-937 so bile tretirane z 1000 ng/nl anti-APO-1 in proteinom A 24 ur, Jurkat celice pa z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 78

Slika 37: *Apoptoza, sprožena z anti-APO-1, je prikazana kot delež Annexin V-PE pozitivnih celic, kar vključuje tudi Annexin V-PE in PI pozitivne celice*. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 79

Slika 38: *Kaspazna aktivnost po apoptozi, inducirani z anti-APO-1, je bila določena z uporabo fluorogenega substrata Ac-DEVD-AFC*. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 80

Slika 39: *Mitohondrijska integriteta po apoptozi, inducirani z anti-APO-1*. Privzem MitoTracker Red CMX-Ros v mitohondrije pokaže delež celic z zmanjšano fluorescenco. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 81

Slika 40: *Lizosomska integriteta pri apoptozi, inducirani z anti-APO-1*. Privzem Akridin oranža v lizosome pokaže delež celic z zmanjšano fluorescenco. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 82

Slika 41: *Katepsinska aktivnost v celotnih celičnih lizatih po apoptozi, inducirani z anti-APO*-1. Določena je bila z uporabo fluorogenega substrata Z-FR-AMC. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 83

Slika 42: *Katepsinska aktivnost v citosolnih ekstraktih po apoptozi, inducirani z anti-APO-1*. Določena je bila z uporabo fluorogenega substrata Z-FR-AMC. Celična linija Jurkat je bila tretirana z 0,3 ng/ml anti-APO-1 in proteinom A 18 ur. Inhibitorje (CA-074Me, E-64d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. Rezultati prikazujejo povprečje ± SD treh neodvisnih poskusov. 84

Slika 43: *Imunodetekcija katepsina B v citosolnih celičnih ekstraktih po indukciji apoptoze z anti-APO-1(0,3 ng/ml anti-APO-1, 18 ur).* Inhibitorje (CA-074Me, E-64-d in Z-VAD-FMK) smo dodali v končni koncentraciji 10 μM. 84

Slika 44: *Vloga zunajceličnih proteolitskih cepitev cisteinskih katepsinov pri molekularnih mehanizmih, ki potekajo v tumorskem mikrookolju.* V normalnem tkivu se pleksini lahko aktivirajo samo z vezavo liganda, kar sproži aktivacijo njihovih domen GAP (domene, ki aktivirajo GTP-aze) in zmanjša aktivnost Ras GTP-az. Vezava ligandov na receptor za endotelijski rastni faktor (EGFR) pa poveča njihovo aktivnost. Celični stiki in zunajcelični matriks (ECM) so intaktni. Cisteinski katepsini se nahajajo v endo/lizosomskem predelu. V tumorskem mikrookolju pa pride do povečanega izločanja katepsinov iz tumorskih celic in imunskih celic, ki se v velikem številu mobilizirajo v tumor. GAP aktivnost pleksinskih receptorjev je konstitutivno aktivirana zaradi odstranitve zunajcelične domene, hkrati pa procesiranje EGFR povzroči njihovo konstitutivno inaktivacijo. Oboje ima za posledico zmanjšano aktivnost Ras GTP-az. Cepitev molekul CAM prekine celične stike in skupaj z razgradnjo ECM omogoči hitrejšo migracijo in invazijo tumorskih celic. 90

Kazalo tabel

Tabela 1: *Poimenovanje in katalitske lastnosti človeških lizosomskih cisteinskih proteaz katepsinov.* Povzeto po [8, 9]. 2
Tabela 2: *Glavne specifične fiziološke vloge glavnih katepsinov in njihova lokalizacija.* Povzeto po [29, 34]..... 5
Tabela 3: *Substrati cisteinskih katepsinov iz ECM*. Povzeto po [81-84]..... 10
Tabela 4: *Povzetek vpliva izbitja katepsinov na tumorigenezo v RT2 modelu*. Povzeto po [43, 63]. 12
Tabela 5: *Bolezni, povezane z motnjami apoptoze.* Povzeto po [99, 100]..... 13
Tabela 6: *Znotrajcelični in vitro substrati človeških lizosomskih cisteinskih proteaz.* Povzeto po [8, 9]. 19
Tabela 7: *Substrati in njihove značilnosti za določanje encimske aktivnosti*. 33
Tabela 8: *Sestava poliakrilamidnih gelov*..... 34
Tabela 9: *Seznam potencialnih substratov cisteinskih katepsinov, ki se nahajajo na membrani in imajo vsaj trikrat povečan SCR (relativna razlika v številu preštetih spektrov glede na kontrolo).* Za vsak protein je navedena teoretična molekulska masa zunajcelične domene in skupno število identificiranih peptidov. Sledi SCR za vsako posamezno biološko ponovitev. Eksperimenti s katepsinoma L in S so bili izvedeni v triplikatu, s katepsinom B pa v duplikatu. SCR substratov so v vseh replikatih višji od 3, kar kaže, da je procesiranje teh proteinov s katepsini zelo ponovljivo. Receptor za epidermalni rastni faktor in nektinu podoben protein nista bila identificirana v eni biološki ponovitvi. L1CAM in transferinski receptor sta imela vrednost SCR pod tri v dveh oziroma eni biološki ponovitvi. 44
Tabela 10: *Seznam substratov cisteinskih katepsinov v celični liniji MDA-MB-231, ki smo jih z masno spektrometrijo določili tudi v drugih celičnih linijah*. Tri substrate, ki smo jih identificirali v liniji MDA-MB-231, smo določili tudi v liniji PANC-1, pet v liniji HT-144, sedem v liniji T98-G in tri v liniji MCF-7. Opazili smo tudi procesiranje sorodnih receptorjev iz iste družine (nevropilinov 1 in 2, efrinskih receptorjev tipa A2 in B4), kar nakazuje, da katepsini preferenčno cepijo nekatere funkcijsko sorodne proteine. 49
Tabela 11: *Seznam potencialnih substratov cisteinskih katepsinov v liniji PANC-1, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Za vsak protein je navedeno število identificiranih peptidov in SCR v posameznem poskusu. 50
Tabela 12: *Seznam potencialnih substratov cisteinskih katepsinov v liniji HT-144, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Za vsak protein je navedeno število identificiranih peptidov in SCR v posameznem poskusu. Z masno spektrometrijo smo identificirali efrinski receptor B4 in nevropilin 2, ki sta zelo homologna z efrinskim receptorjem A2 oz. nevropilinom 1. 51

Tabela 13: *Seznam potencialnih substratov cisteinskih katepsinov v liniji T98-G, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Za vsak protein je navedeno število identificiranih peptidov in SCR v posameznem poskusu. 52

Tabela 14: *Seznam potencialnih substratov cisteinskih katepsinov v liniji MCF-7, ki so enaki substratom v liniji MDA-MB-231.* Za vsak protein je navedeno število identificiranih peptidov in SCR v posameznem poskusu. 53

Tabela 15: Celoten s*eznam membranskih proteinov, ki jih katepsina L in S cepita s površine celičnih linij.* A) PANC-1. B) HT-144. C) T98-G. D) MCF-7. Število identificiranih peptidov in ustrezno razmerje med številom posnetih spektrov (SCR) med kontrolo in tretiranim vzorcem je navedeno za posamezni poskus s katepsinoma L in S.....54

Tabela 16: *Identificirana mesta cepitve substratov za katepsina L in S z uporabo NHS-tridevtero-acetata, ki označi proste N-konce*. Mesto cepitve je označeno s črtkano črto. Na levi strani je šest aminokislin pred cepitvenim mestom. Na desni strani je celotno aminokislinsko zaporedje identificiranega poročevalskega peptida, ki je bil označen z NHS-tridevtero-acetatom. Število nad zaporedjem pomeni mesto cepitve glede na celotno zaporedje proteina. Označeno je tudi, ali smo poročevalski peptid določili v vzorcu supernatanta ali popolnega celičnega lizata. 59

Tabela 17: *GO anotacija identificiranih membranskih substratov za celično linijo MDA-MB-231.* Določili smo jo z mrežnim vmesnikom g:Profiler. Biološki procesi (BP) in vloge molekul (VM) so navedeni po naraščajoči p-vrednosti. Analiza je izvedena za substrate linije MDA-MB-231(13 substratov).....71

Tabela 18: *GO anotacija genov identificiranih membranskih substratov v vseh analiziranih tumorskih celičnih linijah.* Določili smo jo z mrežnim vmesnikom g:Profiler. Biološki procesi (BP) in vloge molekul (VM) so navedeni po naraščajoči p-vrednosti. Analiza je izvedena za 45 substratov vseh petih analiziranih linij.....72

Priloge

Osebna bibliografija v času doktorskega študija

Objavljen raziskovalni članek:

Spes A*, Sobotic B*, Turk V, Turk B. Cysteine cathepsins are not critical for TRAIL- and CD95-induced apoptosis in several human cancer cell lines. *Biol Chem.* Dec 2012;393(12):1417-1431. *deljeno prvo avtorstvo

Raziskovalni članek sprejet v objavo:

Vizovisek M, Vidmar R, Van Quickelberghe E, et al. Fast profiling of protease specificity reveals similar substrate specificities for cathepsins K, L and S. *Proteomics.* Jan 27 2015; doi: 10.1002/pmic.201400460.

Objavljeni prispevki na znanstvenih konferencah:

VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, VANQUICKELBERGHE, Emmy, IMPENS, Francis, ANĐELKOVIĆ, Uroš, SOBOTIČ, Barbara, STOKA, Veronika, GEVAERT, Kris, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Fast proteomic profiling of protease specify : cysteine cathepsins K, L and S. V: XIVth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, September 6-10, 2014. STOKA, Veronika (ur.), TURK, Boris (ur.). *Book of abstracts*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, 2014, str. 109. [COBISS.SI-ID 27957031]

VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, VANQUICKELBERGHE, Emmy, IMPENS, Francis, ANĐELKOVIĆ, Uroš, SOBOTIČ, Barbara, STOKA, Veronika, GEVAERT, Kris, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Fast proteomic profiling of protease specify : cysteine cathepsins K, L and S. V: Summer Course on Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, September 6-12, 2014, Dubrovnik, Croatia. *MSBM VIII/2014*. [S. l.: s. n.], 2014. [COBISS.SI-ID 27926055]

VIDMAR, Robert, VIZOVIŠEK, Matej, SOBOTIČ, Barbara, MIHELIČ, Marko, TURK, Dušan, BOGYO, Matthew, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Proteomic characterization of legumain and its potential role in cancer. V: Summer Course on Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, September 6-12, 2014, Dubrovnik, Croatia. *MSBM VIII/2014*. [S. l.: s. n.], 2014. [COBISS.SI-ID 27925799]

VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, SOBOTIČ, Barbara, GEVAERT, Kris, STOKA, Veronika, ANDJELKOVIĆ, Uroš, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Discovery of substrates of cysteine cathepsins by N-terminomics. V: 8th Young Researchers' Day, February 18, 2014, Ljubljana. ŽUNIČ, Vojka (ur.), et al. *Program and abstract book*. Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2014, str. 40. [COBISS.SI-ID 27541031]

VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, SOBOTIČ, Barbara, GEVAERT, Kris, VAN DAMME, Petra, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Terminomic strategies for discovery of substrates of cysteine cathepsins. V: 7th European Summer School, Brixen/Bressanone, August 4,10, 2013. *Advanced proteomics*. [S. l.: s. n.], 2013. [COBISS.SI-ID 27541543]

SOBOTIČ, Barbara, VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, VAN DAMME, Petra, GOCHEVA, Vasilena, JOYCE, Johanna A., GEVAERT, Kris, TURK, Vito, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Cysteine cathepsins promote tumor cell migration and invasion via shedding of cell adhesion proteins and receptors. V: 10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Ljubljana, Slovenia, September 15-18, 2013. PETAN, Toni (ur.), ŠPES, Aleš (ur.). *Book of abstracts*. Ljubljana: Slovenian Biochemical Society, 2013, str. 160. [COBISS.SI-ID 27537959]

VIDMAR, Robert, VIZOVIŠEK, Matej, SOBOTIČ, Barbara, MIHELIČ, Marko, TURK, Dušan, BOGYO, Matthew, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Proteomic characterization of legumain and its potenctial role in cancer. V: 10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Ljubljana, Slovenia, September 15-18, 2013. PETAN, Toni (ur.), ŠPES, Aleš (ur.). *Book of abstracts*. Ljubljana: Slovenian Biochemical Society, 2013, str. 176. [COBISS.SI-ID 27538471]

VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, SOBOTIČ, Barbara, GEVAERT, Kris, VAN DAMME, Petra, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Peptidomic approaches for discovery of neo termini generated by cysteine cathepsins. V: 10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Ljubljana, Slovenia, September 15-18, 2013. PETAN, Toni (ur.), ŠPES, Aleš (ur.). *Book of abstracts*. Ljubljana: Slovenian Biochemical Society, 2013, str. 177. [COBISS.SI-ID 27538727]

SOBOTIČ, Barbara, VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, VAN DAMME, Petra, GOCHEVA, Vasilena, JOYCE, Johanna A., GEVAERT, Kris, TURK, Vito, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Cysteine cathepsins shed cell adhesion proteins and receptors from the surface of cancer cells. V: XIVth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, September 6-10, 2014. STOKA, Veronika (ur.), TURK, Boris (ur.). *Book of abstracts*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, 2014, str. 102-103. [COBISS.SI-ID 27948071]

VIDMAR, Robert, VIZOVIŠEK, Matej, SOBOTIČ, Barbara, MIHELIČ, Marko, TURK, Dušan, BOGYO, Matthew, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Proteomic characterization of legumain and its potenctial role in cancer. V: XIVth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, September 6-10, 2014. STOKA, Veronika (ur.), TURK, Boris (ur.). *Book of abstracts*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, 2014, str. 108. [COBISS.SI-ID 27956775]

VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, SOBOTIČ, Barbara, GEVAERT, Kris, DAMME, Patrick van, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Proteomic strategies for

discovery of substrates of cysteine cathepsins. V: 7th Young Researchers' Day, 19 February, 2013, Ljubljana, Slovenia. LISJAK, Darja (ur.), DUŠAK, Peter (ur.), KRALJ, Slavko (ur.). *[Program and abstract book]*. Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2013, str. 14. [COBISS.SI-ID 26589479]

SOBOTIČ, Barbara, VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, JOYCE, J., TURK, Vito, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Identification of extracellular membrane substrates of cysteine cathepsins. V: 7th Young Researchers' Day, 19 February, 2013, Ljubljana, Slovenia. LISJAK, Darja (ur.), DUŠAK, Peter (ur.), KRALJ, Slavko (ur.). *[Program and abstract book]*. Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2013, str. 61. [COBISS.SI-ID 27540263]

SOBOTIČ, Barbara, VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, JOYCE, J., TURK, Vito, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Idetification of extracellular membrane substrates of cysteine cathepsins. V: 7th Young Researchers' Day, 19 February, 2013, Ljubljana, Slovenia. LISJAK, Darja (ur.), DUŠAK, Peter (ur.), KRALJ, Slavko (ur.). *[Program and abstract book]*. Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2013, str. 61. [COBISS.SI-ID 26703911]

VIDMAR, Robert, VIZOVIŠEK, Matej, SOBOTIČ, Barbara, MIHELIČ, Marko, TURK, Dušan, BOGYO, Matthew, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Proteomic characterization of asparaginyl endopeptidase and its possible role in cancer. V: 7th Young Researchers' Day, 19 February, 2013, Ljubljana, Slovenia. LISJAK, Darja (ur.), DUŠAK, Peter (ur.), KRALJ, Slavko (ur.). *[Program and abstract book]*. Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2013, str. 63. [COBISS.SI-ID 26705447]

VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, SOBOTIČ, Barbara, GEVAERT, Kris, VAN DAMME, Petra, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. N and C-terminomic approaches for discovery of substrates of cysteine cathepsins. V: Fourth Annual Conference [of] Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins, CIPKeBiP, Ljubljana, 10-12 June, 2013. ZOREC, Robert (ur.), et al. *Superresolution microscopy*. Ljubljana: Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins, 2013, str. 25-26, ilustr. [COBISS.SI-ID 27537191]

VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, SOBOTIČ, Barbara, GEVAERT, Kris, VAN DAMME, Petra, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. N- and C- terminal strategies for discovery of substrates of cysteine cathepsins. V: LASSACHER, Michaela (ur.), BRANDSTETTER, Hans (ur.). *XXXth Winter School on Proteinases and their Inhibitors : in Tiers, Italy, February 27 - March 3, 2013*. [S. l.: S. n.], 2013, str. 18. [COBISS.SI-ID 27538983]

VIDMAR, Robert, VIZOVIŠEK, Matej, SOBOTIČ, Barbara, MIHELIČ, Marko, TURK, Dušan, BOGYO, Matthew, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Proteomic characterization of asparaginyl endopeptidase and its possible role in cancer. V: LASSACHER, Michaela (ur.), BRANDSTETTER, Hans (ur.). *XXXth Winter School on Proteinases and their Inhibitors : in Tiers, Italy, February 27 - March 3, 2013*. [S. l.: S. n.], 2013, str. 21. [COBISS.SI-ID 27539239]

SOBOTIČ, Barbara, VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, JOYCE, J., TURK, Vito, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Identification of extracellular membrane substrates of cysteine cathepsins. V: *29th Winter School on Proteinases and their Inhibitors : recent developments : in Tiers, Italy, February 29th - March 4th, 2012*. [S. l.: S. n.], 2012, str. 27. [COBISS.SI-ID 25636135]

ŠPES, Aleš, PETELIN, Ana, SOBOTIČ, Barbara, REINHECKEL, Thomas, WALCZAK, Henning, TURK, Vito, TURK, Boris. The death receptor pathway and the involvement of lysosomes. V: *29th Winter School on Proteinases and their Inhibitors : recent developments : in Tiers, Italy, February 29th - March 4th, 2012*. [S. l.: S. n.], 2012, str. 29. [COBISS.SI-ID 25636391]

NIKOLIĆ, Petra, SOBOTIČ, Barbara, TURK, Boris. Differential of monocytes into macrophages, but not macrophage activation by IL-4, upregulate expression of cathepsins B, L and S at the transcriptome level. V: XIIIth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, September 22-26, 2012. STOKA, Veronika (ur.), TURK, Boris (ur.). *Book of abstracts*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, 2012, str. 70. [COBISS.SI-ID 26456359]

SOBOTIČ, Barbara, VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, VAN DAMME, Petra, JOYCE, Johanna A., GEVAERT, Kris, TURK, Vito, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Cysteine cathepsins promote tumor cell migration and invasion via the shedding of cell adhesion proteins and receptors. V: XIIIth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, September 22-26, 2012. STOKA, Veronika (ur.), TURK, Boris (ur.). *Book of abstracts*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, 2012, str. 91. [COBISS.SI-ID 27537447]

SOBOTIČ, Barbara, VIZOVIŠEK, Matej, VIDMAR, Robert, JOYCE, J., TURK, Vito, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Identification of extracellular membrane substrates of cysteine cathepsins. V: 6th Young Researchers' Day 2012, 27 and 28 Febraury, 2012, Ljubljana. ŽAGAR, Kristina (ur.), LENART, Alenka (ur.), PEČKO, Darja (ur.). *[Program and abstract book]*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, Department of Nanostructured Materials, 2012, str. 12. [COBISS.SI-ID 27539495]

ŠPES, Aleš, PETELIN, Ana, SOBOTIČ, Barbara, REINHECKEL, Thomas, WALCZAK, Henning, TURK, Vito, TURK, Boris. The death receptor pathway and the involvement of lysosomes. V: 6th Young Researchers' Day 2012, 27 and 28 Febraury, 2012, Ljubljana. ŽAGAR, Kristina (ur.), LENART, Alenka (ur.), PEČKO, Darja (ur.). *[Program and abstract book]*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, Department of Nanostructured Materials, 2012, str. 56. [COBISS.SI-ID 25985319]

VIZOVIŠEK, Matej, SOBOTIČ, Barbara, VIDMAR, Robert, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Proteomic identification of nuclear substrates of cysteine cathepsins. V: 6th Young Researchers' Day 2012, 27 and 28 Febraury, 2012, Ljubljana. ŽAGAR, Kristina (ur.), LENART, Alenka (ur.), PEČKO, Darja (ur.). *[Program and abstract book]*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, Department of Nanostructured Materials, 2012, str. 57. [COBISS.SI-ID 27539751]

VIDMAR, Robert, VIZOVIŠEK, Matej, SOBOTIČ, Barbara, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. In search for legumain substrates : a proteomic study. V: 6th Young Researchers' Day 2012, 27 and 28 Febraury, 2012, Ljubljana. ŽAGAR, Kristina (ur.), LENART, Alenka (ur.), PEČKO, Darja (ur.). *[Program and abstract book]*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, Department of Nanostructured Materials, 2012, str. 58. [COBISS.SI-ID 27540007]

SOBOTIČ, Barbara, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Identifikacija zunajceličnih membranskih substratov cisteinskih katepsinov. V: 5. dan mladih raziskovalcev,

Ljubljana, Februar 2011. PRIBOŠIČ, Irena (ur.), KRNEL, Kristoffer (ur.). *[Program in povzetki]*. Ljubljana: Institut "Jožef Stefan", 2011, str. 32. [COBISS.SI-ID 25453607]

VIZOVIŠEK, Matej, SOBOTIČ, Barbara, VIDMAR, Robert, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Proteomska identifikacija jedrskih substratov cisteinskih proteaz. V: 5. dan mladih raziskovalcev, Ljubljana, Februar 2011. PRIBOŠIČ, Irena (ur.), KRNEL, Kristoffer (ur.). *[Program in povzetki]*. Ljubljana: Institut "Jožef Stefan", 2011, str. 34. [COBISS.SI-ID 25454119]

SOBOTIČ, Barbara, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Extracellular membrane substrate of cysteine cathepsins. V: 28th Winter School, Tiers, Italy, February 23rd - 27th, 2011. *Proteinases and their inhibitors : recent developments*. [S. l.: S. n.], 2011, str. 62. [COBISS.SI-ID 25451047]

SOBOTIČ, Barbara, VIZOVIŠEK, Matej, TURK, Vito, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Sheddase activity of cysteine cathepsins. V: XIIth Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, September 25-29, 2010. DOLINAR, Marko (ur.), STOKA, Veronika (ur.), TURK, Boris (ur.). *Book of abstracts*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, 2010, str. 17. [COBISS.SI-ID 24059687]

SOBOTIČ, Barbara, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Identification of extracellular membrane substrates of cysteine cathepsins. V: XIIth Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, September 25-29, 2010. DOLINAR, Marko (ur.), STOKA, Veronika (ur.), TURK, Boris (ur.). *Book of abstracts*. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, 2010, str. 66. [COBISS.SI-ID 24066087]

SOBOTIČ, Barbara, TURK, Boris, FONOVIĆ, Marko. Identification of extracellular membrane substrates of cysteine cathepsins. V: 27th Winter School, Tiers, Italy, February 24th - 28th, 2010. *Proteinases and their inhibitors : recent developments*. [S. l.: S. n.], 2010, str. 59. [COBISS.SI-ID 23445031]

DOI 10.1515/hsz-2012-0213 — Biol. Chem. 2012; 393(12): 1417–1431

Aleš Špes[a], Barbara Sobotič[a], Vito Turk and Boris Turk*

Cysteine cathepsins are not critical for TRAIL- and CD95-induced apoptosis in several human cancer cell lines

Abstract: The potential role of cysteine cathepsins in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L)- and CD95 (Fas/APO-1)-induced apoptosis was investigated using four different cell lines (HeLa, HuH-7, Jurkat, and U-937). All four cell lines exhibited different levels of cathepsins and responded differently to apoptosis triggering, with Jurkat cells being the most sensitive and the only ones that were sensitive to the agonistic anti-APO-1 antibody. Apoptosis was accompanied by caspase activation, loss of the mitochondria and lysosome integrity, and the release of cysteine cathepsins into the cytosol, as judged based on the hydrolysis of the cysteine cathepsin substrate benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amino-4-methylcoumarin and by the immunological detection of cathepsin B. The inhibition of caspases by the broad-spectrum inhibitor benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone prevented apoptosis, including the mitochondrial and lysosomal membrane permeabilization, as well as cathepsin release into the cytosol, consistent with caspases playing a crucial role in the process. Conversely, however, although the broad-spectrum cysteine cathepsin inhibitor (2*S*,3*S*)-*trans*-epoxysuccinyl-leucylamido-3-methyl-butane ethyl ester and the more cathepsin B-selective inhibitor [(2*S*,3*S*)-3-propylcarbamoyloxirane-2-carbonyl]-l-isoleucyl-l-proline methyl ester completely blocked cathepsin activity, these inhibitors neither prevented apoptosis and its progression nor the mitochondrial and lysosomal membrane permeabilization associated with this type of cell death. Consequently, cathepsin release into the cytosol was also not prevented. Together, these data indicate that cysteine cathepsins are not required for the TRAIL- and CD95-mediated apoptosis in various human cancer cell lines. This does not, however, rule out that lysosomes and cysteine cathepsins are involved in the amplification, but not in the initiation, of death receptor-mediated apoptosis in certain cell lines or under different stimulation conditions than the ones employed here.

Keywords: apoptosis; cathepsins; CD95 (Fas/APO-1); death receptor; lysosomes, TRAIL (Apo2L).

[a]These authors contributed equally to this work.
***Corresponding author: Boris Turk,** J. Stefan Institute, Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, e-mail: boris.turk@ijs.si
Aleš Špes: J. Stefan Institute, Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia
Barbara Sobotič: J. Stefan Institute, Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia
Vito Turk: J. Stefan Institute, Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; and Center of Excellence CIPKEBIP, SI-1000 Ljubljana, Slovenia
Boris Turk: Center of Excellence CIPKEBIP, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; Center of Excellence NIN, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; and Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

Introduction

The members of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily of cytokines, particularly TNF itself, the CD95 (Fas/APO-1) ligand, and the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L), trigger the extrinsic apoptosis pathway by binding to their corresponding receptors on the surface of the target cells. These receptors form part of the death receptor subfamily of the TNF receptor superfamily, which includes CD95, TRAIL-R1 (DR4), and TRAIL-R2 (KILLER/TRICK2/DR5/Apo2). Once activated, these receptors recruit the adapter molecule Fas-associated death domain, thereby inducing the formation of the death-inducing signal complex (DISC), which enables the recruitment and subsequent activation of the initiator caspase-8/10. Active caspase-8 then activates the executioner caspase-3 and -7, leading to apoptosis. Based on the level of DISC and caspase-8 activity, cells can be divided into the type I cells that are capable of forming high DISC levels and/or contain less of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and the type II cells that are less well capable of forming the DISC and/or contain high XIAP levels. Consequently, in the type I cells, the DISC-generated caspase-8 activity is sufficient to overcome the inhibitory effect of XIAP at a given concentration on

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

caspase activation, whereas, in the type II cells, the rationale between DISC-generated caspase-8 activity and XIAP expression is such that direct activation of effector caspases is not sufficient to induce apoptosis so that an amplification of the signal through the mitochondria is required for the induction of apoptosis. The engagement of the mitochondrial pathway is accomplished by the caspase-8-mediated cleavage of the proapoptotic Bcl-2 homologue Bid (Ashkenazi and Dixit, 1999; Walczak and Krammer, 2000; Newsom-Davis et al., 2009; Gonzalvez and Ashkenazi, 2010).

Although caspases have a major role in the death receptor-induced apoptosis, there have been numerous reports that cysteine cathepsins, particularly cathepsin B, may be involved in the process downstream of caspase-8 activation (Foghsgaard et al., 2001; Guicciardi et al., 2004; Guicciardi and Gores, 2009; Kirkegaard and Jäättelä, 2009; Groth-Pedersen and Jäättelä, 2010). Under normal conditions, cysteine cathepsins are localized in the vesicles of the endolysosomal system, where they are, in addition to some more specific functions, also involved in the bulk protein degradation (Brix et al., 2008; Turk and Turk, 2009; Reiser et al., 2010; Turk et al., 2002, 2012b). However, when released into the cytosol, the cathepsins were found to trigger apoptosis through the cleavage of Bid and degradation of the antiapoptotic Bcl-2 homologs and XIAP, thereby engaging the mitochondrial pathway (Stoka et al., 2001; Cirman et al., 2004; Blomgran et al., 2007; Droga-Mazovec et al., 2008). The cathepsins were also suggested to act independently of the caspases, although their molecular targets were never identified (Foghsgaard et al., 2001). The factors that were suggested to destabilize the lysosomal membranes, resulting in the release of the cathepsins into the cytosol, are also members of the TNF family (Fehrenbacher and Jäättelä, 2005; Stoka et al., 2005, 2007; Guicciardi et al., 2007; Werneburg et al., 2007; Guicciardi and Gores, 2009; Kirkegaard and Jäättelä, 2009; Turk and Turk, 2009; Repnik et al., 2012). However, the exact role of cysteine cathepsins in the death receptor signaling is still unclear, as conflicting results have been reported (Brunk and Svensson, 1999; Guicciardi et al., 2000, 2007; Foghsgaard et al., 2001; Fehrenbacher et al., 2004; Bojič et al., 2007; Vasiljeva et al., 2008; Klarič et al., 2009; Oberle et al., 2010; Yang et al., 2010b).

CD95, TRAIL-R1 and TRAIL-R2, and TNF receptor 1 are all expressed by immune cells, but they are also widely expressed by a number of tumor cells, making them attractive anticancer targets (Ashkenazi, 2008; Ashkenazi and Herbst, 2008; Papenfuss et al., 2008; Gerspach et al., 2011). In particular, agonists targeting the TRAIL pathway, including soluble recombinant TRAIL and the agonistic antibodies to TRAIL-R1 and TRAIL-R2, are now in advanced clinical trials in combination therapy showing at least partially encouraging results with few adverse effects (Newsom-Davis et al., 2009; Yang et al., 2010a; Gerspach et al., 2011). Understanding the molecular mechanisms leading to death receptor-induced apoptosis and the killing of tumor cells is therefore of major importance. In order to address the potential role of lysosomes and cysteine cathepsins in CD95- and TRAIL-induced apoptosis, we have followed apoptosis, the mitochondrial and lysosomal integrity, as well as the activity of cysteine cathepsins using four different cancer cell lines containing different levels of cathepsins. Blocking cysteine cathepsin activity during CD95- and TRAIL-induced apoptosis was found not to affect apoptosis progression, although the lysosomal membrane integrity was lost and cathepsins were released into the cytosol, both in a caspase-dependent manner. These results indicate that caspases, but not cysteine cathepsins, are required for CD95- and TRAIL-induced apoptosis.

Results

Triggering of TRAIL death receptors or CD95 induces caspase-dependent apoptosis that is independent of cysteine cathepsin activity

In order to evaluate the possible role of cysteine cathepsins in TRAIL- and CD95-induced apoptosis, four different cell lines (HeLa, HuH-7, Jurkat, and U-937) were selected. In the preliminary experiments, the levels of cysteine cathepsins in individual cell lines were estimated based on the hydrolysis of benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amino-4-methylcoumarin (Z-FR-AMC) substrate (which is hydrolyzed well by most cathepsins, including cathepsins B, S, L, V, F, and K) and the cathepsin B substrate *N*-carbobenzoxy-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-RR-AMC; Bromme et al., 2004). In addition, U-937 cells that differentiated into the macrophages were tested, as they are known to contain high levels of cathepsins, especially cathepsin B (Kos et al., 2005; Klarič et al., 2009). As shown in Figure 1A, the differentiated U-937 cells exhibited the highest Z-FR-AMC hydrolyzing activity and a comparable Z-RR-AMC hydrolyzing activity, in agreement with previous results. HuH-7 cells exhibited the second highest Z-FR-AMC hydrolyzing activity followed by Jurkat and HeLa cells, whereas the undifferentiated U-937 cells exhibited an almost 10-fold lower activity

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

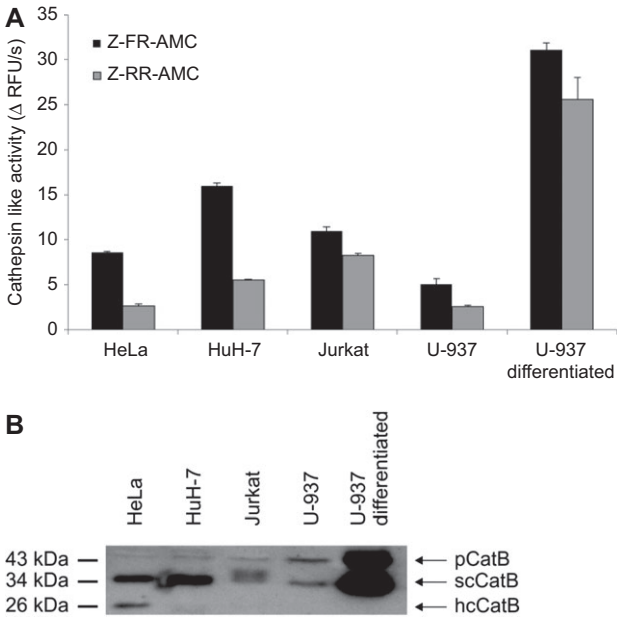


Figure 1 Levels of cysteine cathepsins in different cell lines. (A) Cathepsin activity in different cell lines. The activity in the total cell extract (50 mg protein) was determined using the fluorogenic substrate Z-FR-AMC. The results are means±SD of three independent experiments. (B) Immunodetection of cathepsin B in total cell extracts of different cell lines. pCatB, procathepsin B; scCatB, single-chain mature cathepsin B; hcCatB, heavy chain of mature cathepsin B.

compared to the differentiated U-937 cells and a more than 3-fold lower activity than the HuH-7 cells, suggesting a significantly lower cathepsin expression. When these cells were compared based on their Z-RR-AMC hydrolyzing activity, it can be seen that the majority of cathepsin activity could be attributed to cathepsin B in the immune-type cells, especially in the differentiated U-937 cells. This result was confirmed by Western blotting (Figure 1B). Although the major active form of cathepsin B detected in all cells was the single-chain 35-kDa form, this form has an indistinguishable activity from the double-chain form often detected (Bromme et al., 2004).

In the next set of experiments HeLa, HuH-7, Jurkat, and the undifferentiated U-937 cells were tested for their sensitivity to apoptosis induction by TRAIL and an agonistic antibody to CD95. As shown in Figure 2A, all four cell lines responded to TRAIL, with the Jurkat cells being by far the most sensitive to the treatment (1 vs. 100 ng/ml TRAIL in the other three cell lines) based on Annexin V/propidium iodide (PI) staining. The simultaneous inhibition of proteasome activity significantly enhanced apoptosis in the HeLa and HuH-7 cells, particularly in the U-937 cells, but not in the Jurkat cells, in agreement with the previous findings (Brooks et al., 2005; Koschny et al., 2010). We next performed the same set of experiments in the presence of (2*S*,3*S*)-*trans*-epoxysuccinyl-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester (E-64d), a broad-spectrum cell-permeable inhibitor of cysteine cathepsins, [(2*S*,3*S*)-3-propylcarbamoyloxirane-2-carbonyl]-l-isoleucyl-l-proline methyl ester (CA-074Me), a cell-permeable cathepsin B inhibitor, or benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK), a broad-spectrum caspase inhibitor that served as positive control. As shown in Figure 2A, none of the cathepsin inhibitors prevented apoptosis, whereas Z-VAD-FMK conferred significant albeit not complete protection, suggesting that cysteine cathepsins are not critical for the induction or progression of TRAIL-induced apoptosis in human cells. In agreement with this suggestion, the morphological changes induced by TRAIL treatment could not be prevented by any of the two cathepsin inhibitors used but only by the caspase inhibitor Z-VAD-FMK, as shown in Figure 2B and C for the attached cell lines HeLa and HuH-7. In a related experiment, we evaluated the role of cathepsins in CD95-mediated apoptosis using the agonistic antibody anti-APO-1. In contrast to TRAIL, anti-APO-1 induced apoptosis in combination with protein A (0.3 ng/ml anti-APO-1 and protein A for 18 h) only in Jurkat cells, whereas no apoptosis was induced in the other three cell lines tested even at concentrations of 1000 ng/ml (Figure 2D). Therefore, all the subsequent studies with the CD95 system were performed only in Jurkat cells. Similar to the results with TRAIL, cathepsin inhibitors did not prevent CD95-mediated apoptosis in Jurkat cells, in agreement with a marginal, if any, role of cathepsins in this apoptosis pathway (Figure 2E). None of the inhibitors by themselves exhibited cytotoxicity in any of the cell lines used (not shown).

As Z-VAD-FMK did not completely rescue apoptosis, we next investigated the activity of caspases in the total cell extracts following TRAIL and anti-APO-1 treatment. In agreement with a major role of caspases in death receptor-induced apoptosis, caspase activity, as measured by the hydrolysis of the Ac-DEVD-AMC substrate, was significantly increased in all cell lines investigated, with the highest levels in U-937 and Jurkat cells (Figure 3). None of the cathepsin inhibitors blocked the DEVDase activity, again suggesting that cysteine cathepsins are not involved in death receptor-mediated apoptosis. In contrast, Z-VAD-FMK efficiently blocked all the DEVDase activity, in agreement with its caspase-blocking properties. The small increase in TRAIL-induced apoptosis observed in U-937 cells in the presence of the inhibitor can therefore be attributed to either a noncaspase component (caspase-independent) or an incomplete caspase inhibition, as a very small DEVDase activity was still seen in U-937 cells in the presence of Z-VAD-FMK.

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

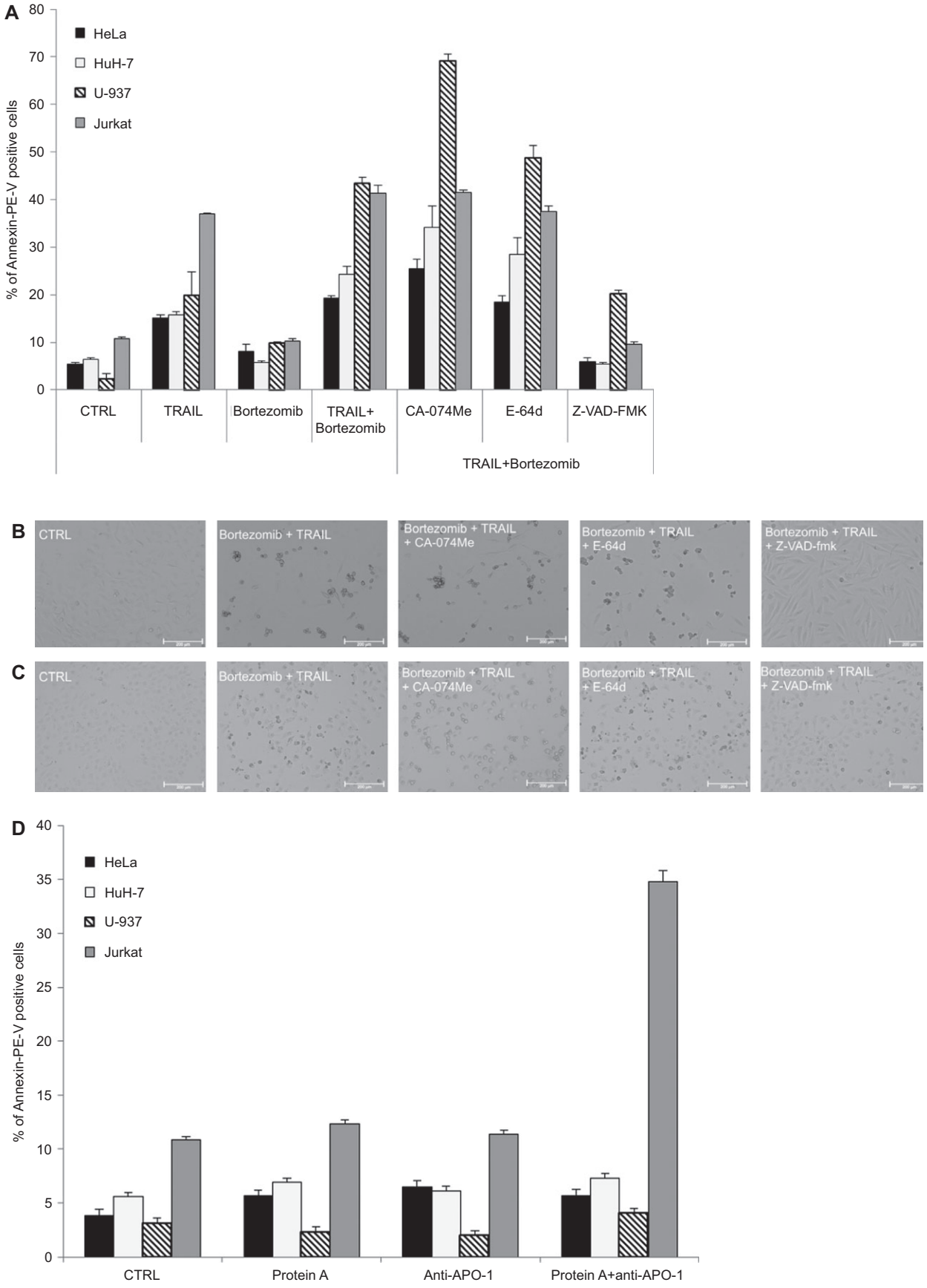


Figure 2 (Continued)

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

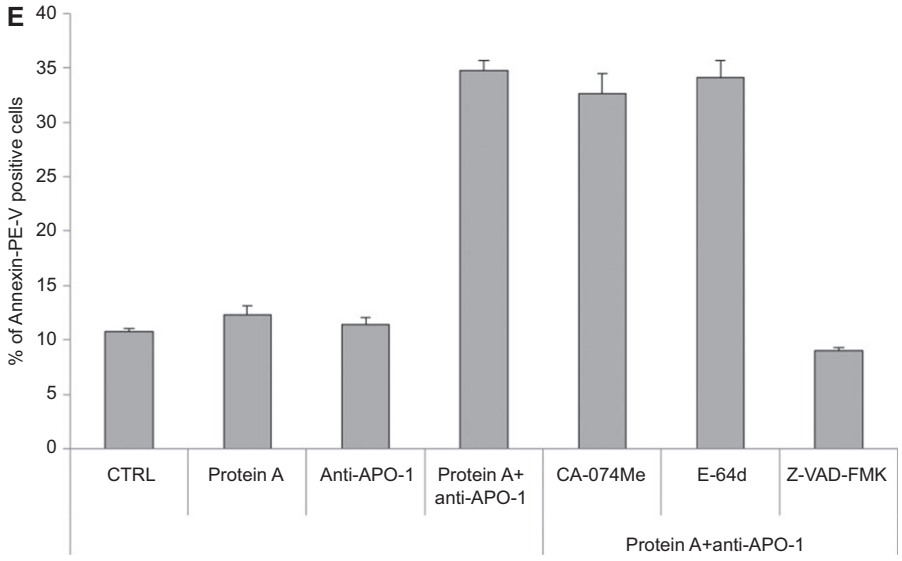


Figure 2 TRAIL- and CD95-induced apoptosis in different cell lines.
(A) TRAIL-induced apoptosis shown as a percentage of Annexin V-PE-positive cells, including cells positive for both Annexin V-PE and PI. HeLa, HuH-7, and U-937 cell lines were treated with 100 ng/ml TRAIL and 10 nM bortezomib for 24 h, and Jurkat cells were treated with 1 ng/ml TRAIL and 1 nM bortezomib for 18 h. The inhibitors (CA-074Me, E-64d, and Z-VAD-FMK) were added at a final concentration 10 mM. The results are means±SD of three independent experiments. TRAIL-induced apoptosis induced morphological changes in HeLa (B) and HuH-7 (C) cells that could be prevented by the caspase inhibitor Z-VAD-FMK but not by the cathepsin inhibitors used (CA-074Me and E-64d). Cells were observed by light microscopy (Olympus IX81; magnification, ×100). Other experimental conditions are as described in Materials and methods. (D) CD95-mediated apoptosis shown as a percentage of Annexin V-PE-positive cells, including cells positive for both Annexin V-PE and PI. HeLa, HuH-7, and U-937 cell lines were treated with 1000 ng/ml anti-APO-1 and 1000 ng/ml protein A for 24 h, and Jurkat cells were treated with 0.3 ng/ml anti-APO-1 and 0.3 ng/ml protein A for 18 h. The results are means±SD of three independent experiments. (E) CD95-mediated apoptosis shown as a percentage of Annexin V-PE-positive cells in Jurkat cells, including cells positive for both Annexin V-PE and PI. Cells were treated with 0.3 ng/ml anti-APO-1 and 0.3 ng/ml protein A for 18 h. The inhibitors (CA-074Me, E-64d, and Z-VAD-FMK) were added at a final concentration of 10 mM. The results are means±SD of three independent experiments.

Mitochondria and lysosomes are disrupted in TRAIL- and anti-APO-1-induced apoptosis

In the next step, the stability of the mitochondria and lysosomes and the effect of cathepsin and caspase inhibitors on the stability of these organelles were evaluated in both TRAIL- and anti-APO-1-induced apoptosis. Again, the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and the lysosomal membrane permeabilization (LMP) were monitored at the 24 h (HeLa, HuH-7, and U-937 cells) or 18 h (Jurkat cells) time point, where significant apoptosis was observed in the previous set of experiments (see above). As shown in Figure 4, the percentage of cells with damaged mitochondria increased in all cell lines investigated in both TRAIL- and anti-APO-1-induced apoptosis, with the highest being observed in U-937 cells (~50%) followed by Jurkat cells, which is consistent with the higher sensitivity of these two cell lines to TRAIL and anti-APO-1, respectively (Figure 2). Both cathepsin inhibitors, E-64d and CA-074Me, did not prevent MOMP, whereas Z-VAD-FMK conferred complete protection in HeLa, HuH-7, and Jurkat cells, in agreement with the major role of caspases in the process. However, Z-VAD-FMK did not completely protect the mitochondria in U-937 cells, similar to its incomplete protection against apoptosis in the same cell line. Interestingly, TRAIL induced major LMP in all cell lines, with the highest being observed in HeLa cells, where almost 70% of the cells had damaged lysosomes (Figure 5A). Anti-APO-1 induced LMP in about 20% of Jurkat cells, although a direct comparison with TRAIL-induced apoptosis is not possible. However, a very similar picture was observed with the inhibitors. E-64d and CA-074Me had no influence on the induction of LMP, whereas Z-VAD-FMK completely protected Jurkat cells against LMP (Figure 5B).

Cysteine cathepsin activity in the cytosol is increased during TRAIL- and CD95-mediated apoptosis

As both TRAIL- and anti-APO-1-induced apoptosis were found to be accompanied by LMP, the next questions

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

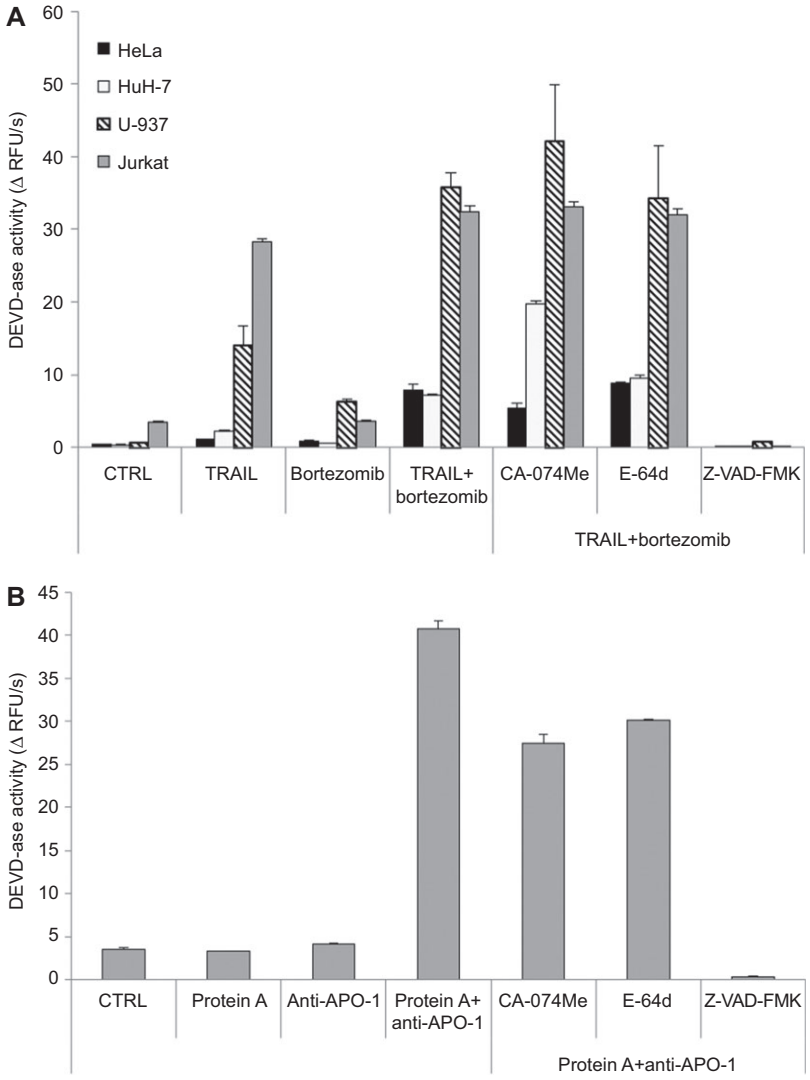


Figure 3 Caspase (DEVD-ase) activity after TRAIL- and CD95-induced apoptosis.
(A) Caspase activity after TRAIL-induced apoptosis. HeLa, HuH-7, and U-937 cell lines were treated with 100 ng/ml TRAIL and 10 nM bortezomib for 24 h, and Jurkat cells were treated with 1 ng/ml TRAIL and 1 nM bortezomib for 18 h. The inhibitors (CA-074Me, E-64d, and Z-VAD-FMK) were added at a final concentration of 10 mM. Caspase activity was determined using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AFC. The results are means±SD of three independent experiments and are expressed in difference in relative fluorescence units/s (Δ RFU/s).
(B) Caspase activity after CD95-mediated apoptosis. Jurkat cells were treated with 0.3 ng/ml anti-APO-1 and 0.3 ng/ml protein A for 18 h. The inhibitors (CA-074Me, E-64d, and Z-VAD-FMK) were added at a final concentration of 10 mM. Caspase activity was determined using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AFC. The results are means±SD of three independent experiments and are expressed in Δ RFU/s.

were whether cysteine cathepsins were released into the cytosol, how quantitative this release was, and whether they were active. To address these questions, the activity of the escaped cysteine cathepsins in the cytosol, as well as the total cathepsin activity, was measured. In addition to measuring the activity of released cathepsins in the absence of any chemical inhibitors of cathepsins or caspases, the effect of all three inhibitors on the release and activity of cathepsins was evaluated. In the control experiment in untreated cells, the activity of the cathepsins was completely blocked by 10 mM E-64d and CA-074Me in all four cell lines (Figure 6A). Although this implies that the predominant cathepsin activity in all cell lines examined was cathepsin B activity, one has to be aware that, in contrast to the nonesterified CA-074, CA-074Me is not really selective for cathepsin B (Bogyo et al., 2000), suggesting that other cathepsins could contribute to the Z-FR-AMC hydrolyzing activity. This is supported by the finding that, in HeLa cells, the cathepsin L activity is at least comparable to the cathepsin B activity based on the measurements employing the broad-spectrum cysteine cathepsin activity-based probe CM-282 (U. Repnik and B. Turk, unpublished).

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

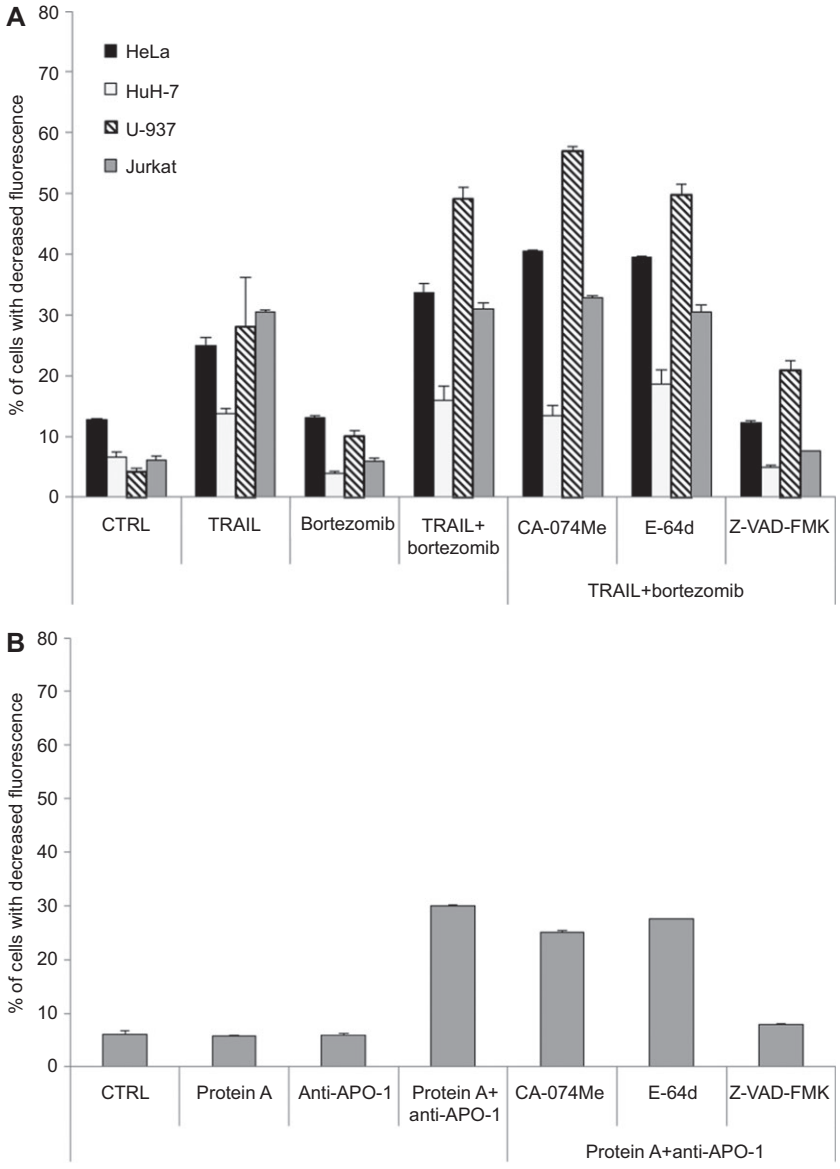


Figure 4 Mitochondria integrity during TRAIL- and CD95-induced apoptosis in different cell lines.
(A) Mitochondrial integrity during TRAIL-induced apoptosis. HeLa, HuH-7, and U-937 cell lines were treated with 100 ng/ml TRAIL and 10 nM bortezomib for 24 h, and Jurkat cells were treated with 1 ng/ml TRAIL and 1 nM bortezomib for 18 h. Inhibitors (CA-074Me, E-64d, and Z-VAD-FMK) were added at a final concentration of 10 mM. MitoTracker Red CMX-Ros uptake indicates the percentage of cells with decreased fluorescence. The results are means±SD of three independent experiments. (B) Mitochondrial integrity during CD95-mediated apoptosis. Jurkat cells were treated with 0.3 ng/ml anti-APO-1 and 0.3 ng/ml protein A for 18 h. The inhibitors (CA-074Me, E-64d, and Z-VAD-FMK) were added at a final concentration of 10 mM. MitoTracker Red CMX-Ros uptake indicates the percentage of cells with decreased fluorescence. The results are means±SD of three independent experiments.

However, Z-VAD-FMK also reduced the cathepsin activity by 20–30% in all four cell lines already at 10 mM concentration, in agreement with the known cross-reactivity of the inhibitor (Rozman-Pungercar et al., 2003). Next, the total activity of the cysteine cathepsins in cells was measured following the addition of TRAIL with or without bortezomib and anti-APO-1 with or without protein A. As shown in Figure 6, the total cysteine cathepsin activity was only slightly decreased upon TRAIL, bortezomib, or anti-APO-1 treatment. However, the combination of TRAIL and bortezomib resulted in a significantly reduced cysteine cathepsin activity in all four cell lines. As this combination was the most active with respect to apoptosis induction on all cells, it further suggested that cathepsins slowly inactivate following their release into the cytosol. To test this hypothesis, we next determined the cytosolic cysteine cathepsin

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

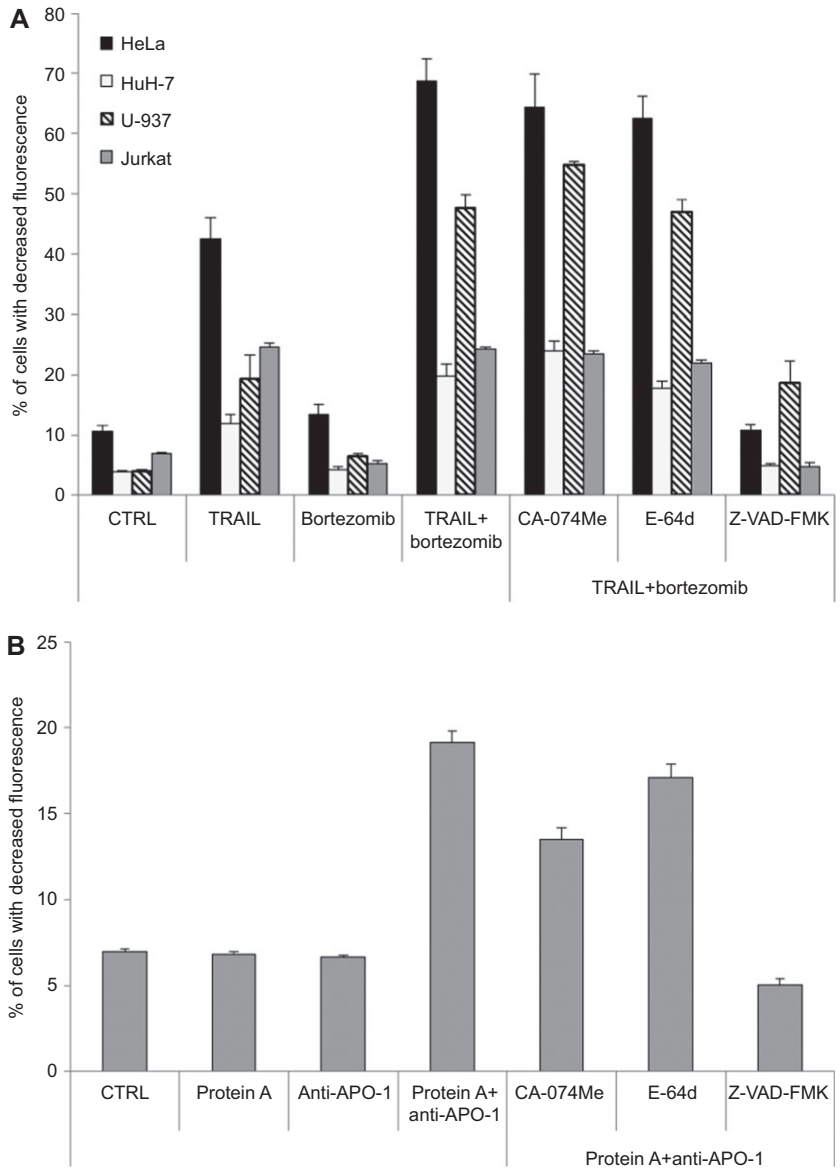


Figure 5 Lysosomal integrity during TRAIL- and CD95-induced apoptosis in different cell lines.
(A) Lysosomal integrity during TRAIL-induced apoptosis. HeLa, HuH-7, and U-937 cell lines were treated with 100 ng/ml TRAIL and 10 nM bortezomib for 24 h, and Jurkat cells were treated with 1 ng/ml TRAIL and 1 nM bortezomib for 18 h. The inhibitors (CA-074Me, E-64d, and Z-VAD-FMK) were added at a final concentration of 10 mM. Acridine orange uptake indicates the percentage of cells with decreased fluorescence. The results are means±SD of three independent experiments. (B) Lysosomal integrity during CD95-mediated apoptosis. Jurkat cells were treated with 0.3 ng/ml anti-APO-1 and 0.3 ng/ml protein A for 18 h. The inhibitors (CA-074Me, E-64d, and Z-VAD-FMK) were added at a final concentration of 10 mM. Acridine orange uptake indicates the percentage of cells with decreased fluorescence. The results are means±SD of three independent experiments.

activity. As shown in Figure 7A and C, only a minor cathepsin activity was detected in the cytosol of untreated cells compared to the total cathepsin activity. Following TRAIL/bortezomib treatment, a significant increase of the cytosolic cathepsin activity was observed. Moreover, this cytosolic cathepsin activity represented the majority of the total cathepsin activity in the cells, suggesting that most of the cathepsins were released into the cytosol. In contrast, the release of cathepsins into the cytosol was much lower under all other conditions (TRAIL only, anti-APO-1). Again, E-64d and CA-074Me completely blocked cysteine cathepsin activity, whereas the cytosolic activity of the cathepsins was, at least in HuH-7 cells, significantly higher than the cytosolic activity of the untreated cells. However, this activity represented only a minor portion of the total cysteine cathepsin activity in HuH-7 cells as judged based

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

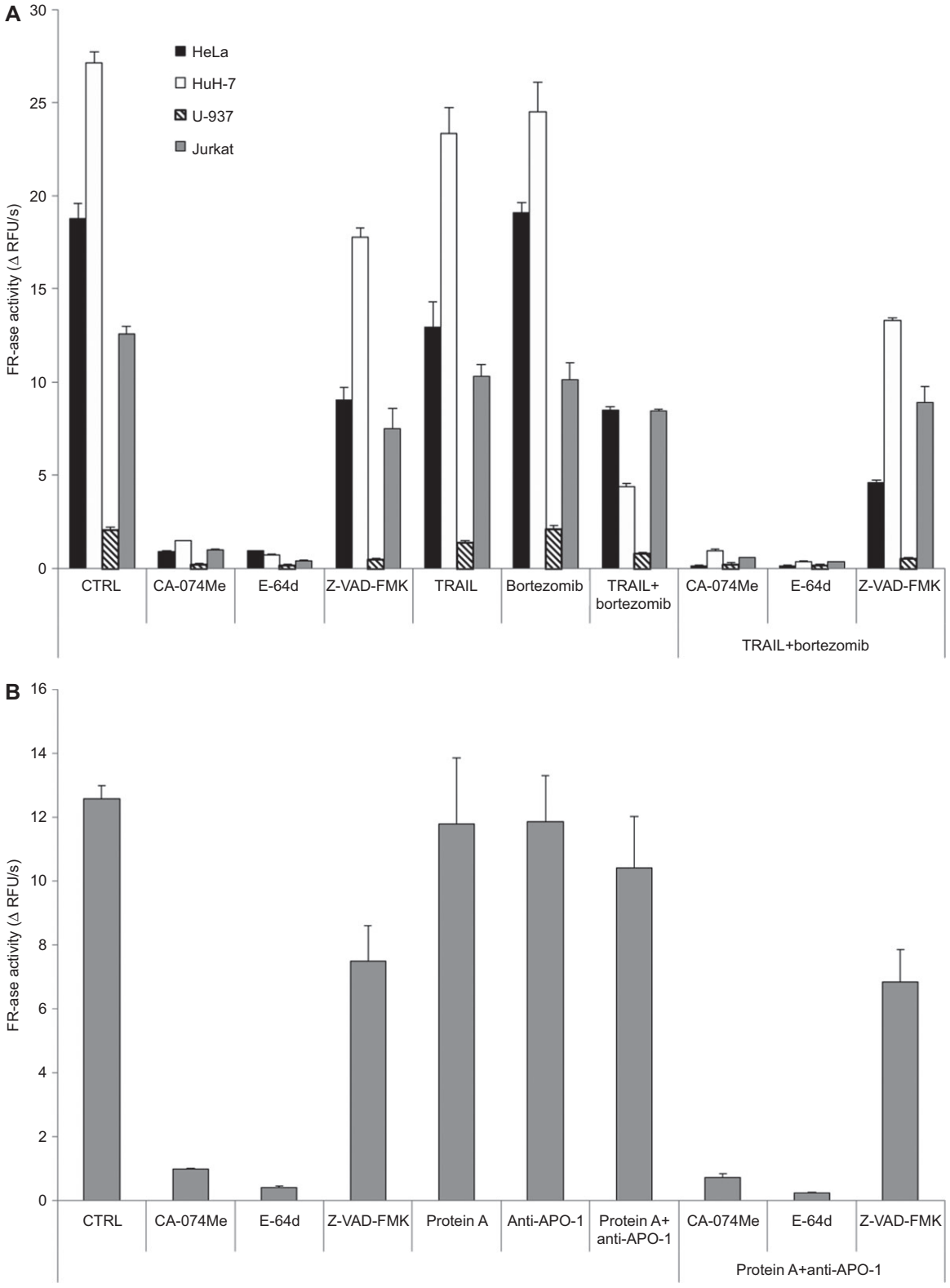


Figure 6 Total cathepsin activity during TRAIL- and CD95-induced apoptosis in different cell lines.
(A) Cathepsin activity in total extracts obtained from cells that underwent TRAIL-induced apoptosis. Cathepsin activity was determined using Z-FR-AMC fluorogenic substrate. Other experimental conditions are as described in Materials and methods. The results are means±SD of three independent experiments and are expressed in Δ RFU/s. (B) Cathepsin activity in total extracts of cells that underwent CD95-mediated apoptosis. Other experimental conditions are as described in Materials and methods. Cathepsin activity was determined using Z-FR-AMC fluorogenic substrate. The results are means±SD of three independent experiments and are expressed in Δ RFU/s.

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

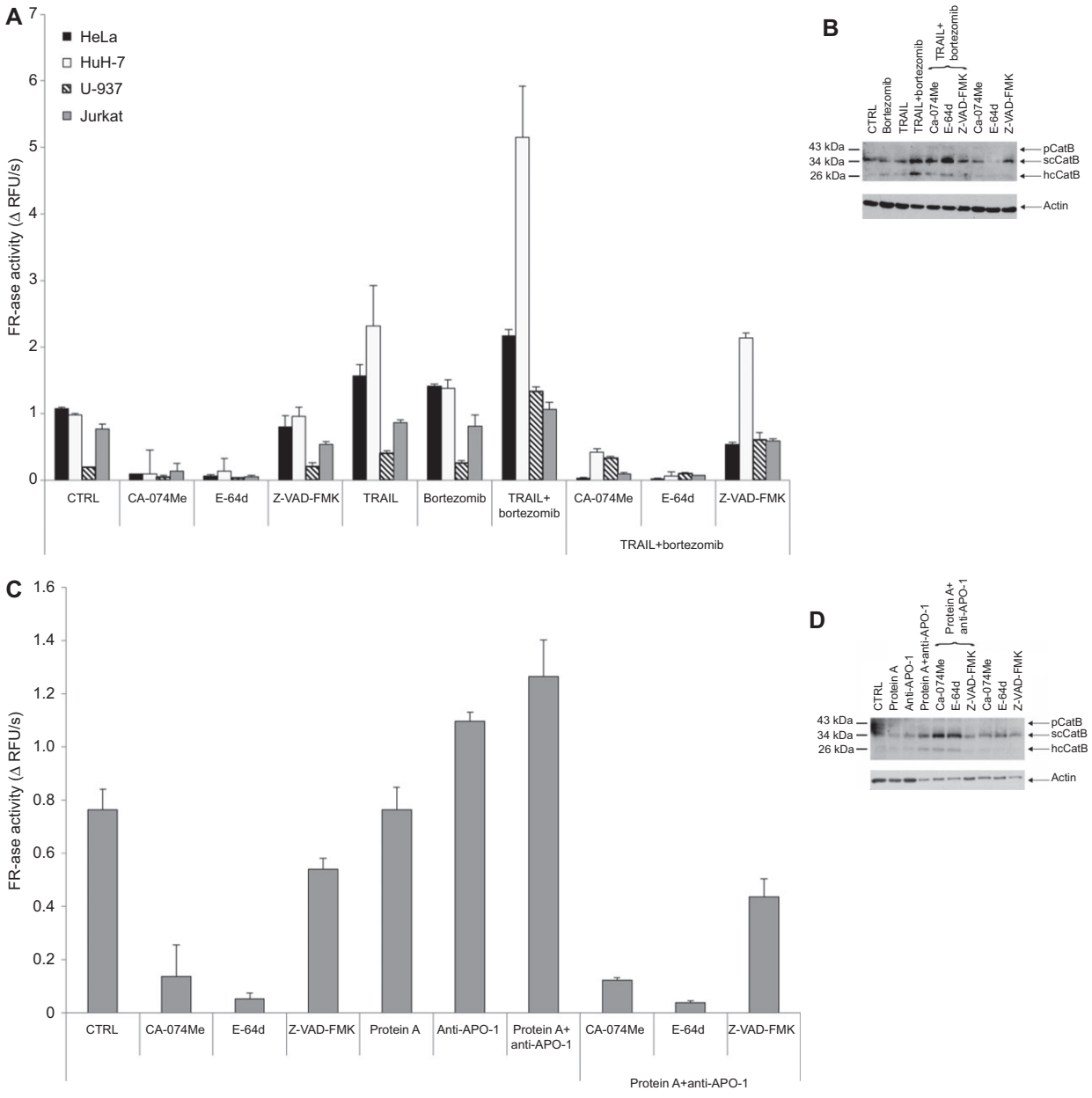


Figure 7 Presence of cysteine cathepsins in the cytosol during TRAIL- and CD95-induced apoptosis in different cell lines.
(A) Cathepsin activity in the cytosol of cells that underwent TRAIL-induced apoptosis. HeLa, HuH-7, and U-937 cell lines were treated with 100 ng/ml TRAIL and 10 nM bortezomib for 24 h, and Jurkat cells were treated with 1 ng/ml TRAIL and 1 nM bortezomib for 18 h. The inhibitors (CA-074Me, E-64d, and Z-VAD-FMK) were added at a final concentration of 10 mM. Cathepsin activity was determined using the fluorogenic substrate Z-FR-AMC. The results are means±SD of three independent experiments and are expressed in Δ RFU/s. (B) Immunodetection of cathepsin B in cytosolic cell extracts of Jurkat cells following TRAIL-induced apoptosis. pCatB, procathepsin B; scCatB, single-chain mature cathepsin B; hcCatB, heavy chain of mature cathepsin B. Other experimental conditions are as described in Materials and methods. (C) Cathepsin activity in the cytosol of cells that underwent CD95-mediated apoptosis. Jurkat cells were treated with 0.3 ng/ml anti-APO-1 and 0.3 ng/ml protein A for 18 h. The inhibitors (CA-074Me, E-64d, and Z-VAD-FMK) were added at a final concentration of 10 mM. Cathepsin activity was determined using the fluorogenic substrate Z-FR-AMC. The results are means±SD of three independent experiments and are expressed in Δ RFU/s. (D) Immunodetection of cathepsin B in cytosolic extracts of Jurkat cells following induction of apoptosis by anti-APO-1. pCatB, procathepsin B; scCatB, single-chain mature cathepsin B; hcCatB, heavy chain of mature cathepsin B. Other experimental conditions are as described in Materials and methods.

on the total cell extracts (10–15%; Figure 6A), in agreement with the major protection role of Z-VAD-FMK and the efficient caspase inhibition. The release of cathepsins into the cytosol was additionally confirmed on the protein level by Western blotting of cathepsin B following the treatment of Jurkat cells with TRAIL or anti-APO-1 (Figure 7B and D).

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

Discussion

Whereas the role of caspases as the main players in the death receptor pathway has been clearly established, there is much dispute about the potential role of lysosomal cathepsins in this pathway. Using four different cancer cell lines, we show here that the activity of cysteine cathepsins is not critical for the induction or progression of apoptosis induced by recombinant TRAIL or the agonistic antibody anti-APO-1. This is despite the fact that apoptosis induction by these two agents was found to be accompanied by a significant damage to the mitochondria and lysosomes and the release of cathepsins into the cytosol of apoptotic cells. All four cell lines used belonged to type II cells that require an amplification of the signal through engagement of the mitochondrial pathway (Scaffidi et al., 1998; Terrisse et al., 2002; Kim et al., 2004; Lee et al., 2005) in order to exclude the possibility of a direct activation of caspase-3 by activated caspase-8. In addition, they were of different origin, including immune (Jurkat and U-937), hepatocyte carcinoma (HuH-7), and cervical cancer (HeLa), and were found to contain different levels and compositions of cathepsins (Figure 1). This suggests that the bystander role of cysteine cathepsins in the death receptor apoptosis pathway is a more general phenomenon rather than one limited to a single cell line. Moreover, both immune-type cell lines, Jurkat and U-937, were more sensitive to TRAIL than HuH-7 and HeLa cells, although at least U-937 cells exhibited substantially lower cysteine cathepsin activity than the other cell lines, in agreement with the nonessential role of cysteine cathepsins in TRAIL-induced apoptosis. Although only Jurkat cells responded well to the agonistic antibody anti-APO-1, the conclusions were essentially the same as for TRAIL-induced apoptosis (Figure 2). This is in agreement with several recent studies that demonstrated that cysteine cathepsins are not critical for the progression of CD95-mediated apoptosis in several types of mouse cells (Bojič et al., 2007; Oberle et al., 2010) and *in vivo* in mouse liver or in Jurkat cells (Wattiaux et al., 2007) and neither for the progression of TNF-induced apoptosis in primary mouse mammary gland cancer cells (Vasiljeva et al., 2008) nor in several human cancer cell lines (Klarič et al., 2009). This is further supported by the finding that even a complete inhibition of the activity of cysteine cathepsins (Figures 6 and 7) had no influence on apoptosis progression (Figures 2 and 3). Moreover, the lack of the effect of cathepsin inhibition on apoptosis progression also disputed the possibility that cysteine cathepsins would have an important role in the endolysosomal degradation of signaling complexes during CD95 or TRAIL receptor internalization, as observed earlier for the related TWEAK system, where cathepsins were responsible for the degradation of cIAP1-TRAF2 complex (Vince et al., 2008). Our results, however, neither preclude nor support the possibility that receptor internalization may serve as an important step during CD95- or TRAIL-mediated signaling as suggested previously (Kohlhaas et al., 2007; Schutze et al., 2008; Akazawa et al., 2009; Guicciardi and Gores, 2009).

In apparent contrast to these results, several earlier studies suggested that cathepsins, especially cathepsin B, are important mediators of apoptosis upstream of MOMP in many different cell types in TNF- and TRAIL-induced apoptosis when released into the cytosol (Guicciardi et al., 2000, 2007; Foghsgaard et al., 2001; Fehrenbacher et al., 2004; Nagaraj et al., 2006, 2007). However, in these studies, apoptosis was not abrogated but only delayed, arguing against a critical role of cysteine cathepsins in the pathway. In addition, in most of these studies, the cytosolic and total activities of cathepsins were not monitored. Furthermore, all these studies only looked at apoptosis at a single time point and rather late stages, when the organelles are already disrupted and the lysosomes become leaky, making the assumptions about the pathway more speculative. As seen in both TRAIL- and CD95-mediated apoptosis, lysosomes were damaged in the majority of cells at a late point in time, with the highest percentage observed in HeLa cells (~70%; Figure 5A). However, HeLa cells were also the least sensitive to apoptosis induction, a result that clearly contrasts with the idea of a critical role of LMP in death receptor-induced apoptosis. Moreover, if cysteine cathepsins were indeed critical for MOMP, their inhibition should have blocked it, which was, however, not the case (Figure 4). In addition, the cytosolic activity of cysteine cathepsins was found to be considerably lower than the total cysteine cathepsin activity following apoptosis induction (Figures 6 and 7) and significantly lower than the proportion of cells with damaged lysosomes (Figure 5), suggesting that only a minor portion of the total cathepsins was released into the cytosol. Furthermore, the cytosolic activity of cathepsins in the cells treated with a combination of bortezomib and TRAIL was higher than in the cells treated with TRAIL alone (Figure 6), consistent with the more efficient induction of apoptosis than TRAIL alone. However, the total cathepsin activity was decreased in these cells, in agreement with the idea that cathepsins, once in the cytosol, become inactivated due to the unfavorable pH conditions and/or their endogenous inhibitors (Turk and Turk, 2009).

This raises the question of whether cathepsins are involved in death receptor apoptosis at all and what is the potential mechanism(s). The critical issue seems to be the

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

LMP. It has been recently shown that, in fibroblasts, LMP is a Bax/Bak-dependent event in CD95 apoptosis, placing lysosomes downstream of the mitochondria in the death receptor pathway (Oberle et al., 2010). Moreover, lysosomal destabilization was also found to be a very late event in CD95 apoptosis in hepatocytes *in vivo* and in skin fibroblasts, consistent with their role downstream of the mitochondria in this pathway (Bojič et al., 2007; Wattiaux et al., 2007). This could also explain why the inhibition of cathepsins did not affect apoptosis progression or prevent MOMP in these cells. Moreover, blocking the caspases prevented both MOMP and LMP, suggesting that LMP occurs downstream of caspase-8 activation and, possibly, LMP. Based on these and previous findings, it can be suggested that LMP is an MOMP-dependent step. Potential links could be associated with sphingolipid, arachidonic acid, and fatty acid metabolism, oxidative stress, as well as some other pathways (Schrader et al., 2010; Repnik et al., 2012). The pathways downstream of LMP are probably linked with cathepsin-mediated Bid cleavage and subsequent recruitment of the mitochondrial pathway (Repnik et al., 2012; Turk et al., 2012a). Although Bid is not a critical *in vivo* apoptotic substrate of the cathepsins (Houseweart et al., 2003), a diminished Bid cleavage was observed in cathepsin B-deficient primary mouse skin fibroblasts during CD95-induced apoptosis (Bojič et al., 2007), supporting this idea. This further suggests that cysteine cathepsins are possibly involved in an amplification loop involving the mitochondria and lysosomes (Schrader et al., 2010; Repnik et al., 2012). The level of amplification may depend on the cell type and the stimulus, ranging from essentially zero to a significant amount that can be detected.

In conclusion, our results suggest that cysteine cathepsins are not critically involved in TRAIL- and CD95-induced apoptosis. Although lysosomes were found to be damaged and the cysteine cathepsin activity in the cytosol was increased, the inhibition of cysteine cathepsins in the selected cell lines had no effect on apoptosis progression. However, the possibility that cysteine cathepsins are involved in the amplification, but not in the initiation, of death receptor-mediated apoptosis cannot be excluded.

Materials and methods

Materials

Dulbecco's minimal essential medium (DMEM), RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), glutamine, and penicillin/streptomycin were purchased from PAA (Pasching, Austria). Trypsin was from Gibco (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cycloheximide, protein A, PI, and acridine orange were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). CHAPS and polyethylene glycol were also obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). HEPES and EDTA were from Serva (Heidelberg, Germany). Sucrose was from Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Dithiothreitol was from Fermentas (Burlington, Ontario, Canada). Cathepsin inhibitors E-64d and CA-074Me were from the Peptide Research Institute (Osaka, Japan). Caspase inhibitor Z-VAD-FMK, 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-DEVD-AFC), and Z-FR-AMC were from Bachem AG (Bubendorf, Switzerland). Annexin V-PE was from BD (Franklin Lakes, NJ, USA). MitoTracker Red CMX-Ros was from Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Bradford reagent was from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Recombinant human TRAIL was prepared as described previously (Ganten et al., 2004) and generously provided by Henning Walczak (Imperial College London, London, UK). The agonistic monoclonal antibody anti-APO-1 to human CD95 of the murine isotype IgG3 (Trauth et al., 1989) was a generous gift from Peter H. Krammer (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany).

Cells

All cell lines used [U-937 (human Caucasian histiocytic lymphoma), HeLa (human cervix carcinoma), HuH-7 (human hepatocellular carcinoma HuH-7D12), and Jurkat (human leukemic T-cell lymphoblasts)] were purchased from the European Collection of Cell Cultures.

U-937 and Jurkat cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% glutamine, and 1% penicillin/streptomycin. For the experiment, 1×10^6 cells were plated into a 12-well plate. For the differentiation of U-937 into macrophages, 1.4×10^6 cells were plated into one six-well with 30 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 48 h followed by 24 h regeneration without PMA. HeLa and HuH-7 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% glutamine, and 1% penicillin/streptomycin. For the experiment, 8×10^4 cells were plated into a 12-well plate 16 h prior to treatment. All cells were cultured at 37°C in a humidified air atmosphere with 5% CO_2.

Induction of apoptosis

The cathepsin (E-64d and CA-074Me) or caspase (Z-VAD-FMK) inhibitors were added at a final concentration of 10 mM 2 h before the induction of apoptosis with TRAIL/bortezomib or anti-APO-1/protein A. Bortezomib and protein A were added as they are known to enhance the apoptotic activities of TRAIL (Brooks et al., 2005; Koschny et al., 2010) and anti-APO-1 antibody (Dhein et al., 1992; Fulda et al., 2000), respectively. Twenty-four hours of incubation with 100 ng/ml TRAIL in combination with 10 nM bortezomib was used to induce apoptosis in HeLa, U-937, and HuH-7 cells, whereas 18 h incubation with 1 ng/ml TRAIL and 1 ng/ml bortezomib was used to induce apoptosis in Jurkat cells. Cells (HeLa and HuH-7) were observed by light microscopy (Olympus IX81, Tokyo, Japan; magnification, ×100). Twenty-four hours of incubation with up to 1000 ng/ml anti-APO-1, in combination with 1000 ng/ml protein A, was used to induce apoptosis in HeLa, U-937, and HuH-7 cells, whereas 18 h incubation with 0.3 ng/ml anti-APO-1 and 0.3 ng/ml protein A was sufficient to induce apoptosis in Jurkat cells. The total and cytosolic cellular extracts

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

were prepared as described previously (Droga-Mazovec et al., 2008; Ivanova et al., 2008; Klarič et al., 2009).

Flow cytometry: quantification of cell death

Annexin V-PE and PI were used to determine the phosphatidylserine exposure and the loss of membrane integrity according to the manufacturer's instructions. Analysis was made with a FACSCalibur flow cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and the CellQuest software (FACSComp Software, BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

Fluorescent dyes MitoTracker Red CMX-Ros and acridine orange were used to assess the integrity of the mitochondria and lysosomes, as described previously (Bojič et al., 2007; Ivanova et al., 2008).

Activity measurements

Proteins from total extracts were tested for DEVDase activity by measuring the proteolytic cleavage of the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AFC. Extracts containing 50 mg protein, as determined by the Bio-Rad assay, were mixed in a 96-well plate with caspase buffer [100 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0.2% (w/v) CHAPS, 20% (w/v) sucrose, 2 mM EDTA, and 20 mM dithiothreitol (pH 7.0)] to the final volume of 90 ml. After 15 min incubation at 37°C, the substrate was added to a final concentration of 10 mM, and substrate hydrolysis was continuously measured in a 96-well plate reader (Tecan Safire, Männedorf, Switzerland) at excitation and emission wavelengths of 400 and 505 nm, respectively.

The cathepsin activity in total and cytosolic extracts was monitored using the fluorogenic substrates Z-FR-AMC (general cathepsin substrate) or Z-RR-AMC (cathepsin B substrate) as follows. Forty milliliters of extracts containing 50 mg protein, as determined by the Bio-Rad assay, were mixed in a 96-well plate with buffer [100 mM phosphate buffer, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 0.1% (w/v) polyethylene glycol (pH 6.0)] to the final volume of 90 ml. After 15 min incubation at 37°C, 10 ml of the substrate were added to a final concentration of 10 mM followed by the continuous monitoring of substrate hydrolysis in a 96-well plate reader (Tecan Safire, Männedorf, Switzerland)) at excitation and emission wavelengths of 370 and 460 nm, respectively.

Immunoblotting

Equal amounts (50 mg) of protein, as determined by the Bio-Rad assay, were loaded and resolved in 15% sodium docedyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels and electrotransferred to the nitrocellulose membranes. Blots were probed with cathepsin B-specific mouse monoclonal antibodies at a concentration of 5 mg/ml. Goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Abcam, Cambridge, UK; 1:3000 dilution) were added followed by visualization with enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA). Actin probed with rabbit anti-actin antibodies (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was used as the loading control for the cytosolic extracts.

Acknowledgements: We thank Henning Walczak for the careful reading of the article and for providing recombinant TRAIL and Peter H. Krammer for providing the anti-APO-1 antibody. B. Turk was supported by grants from the Slovenian Research Agency (P1-0140, J1-4121, and J1-3602).

Received May 25, 2012; accepted July 13, 2012

References

Akazawa, Y., Mott, J.L., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Kahraman, A., Guicciardi, M.E., Meng, X.W., Kohno, S., Shah, V.H., Kaufmann, S.H., et al. (2009). Death receptor 5 internalization is required for lysosomal permeabilization by TRAIL in malignant liver cell lines. Gastroenterology *136*, 2365–2376, e2361–2367.

Ashkenazi, A. (2008). Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. Nat. Rev. Drug Discov. *7*, 1001–1012.

Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr. Opin. Cell Biol. *11*, 255–260.

Ashkenazi, A. and Herbst, R.S. (2008). To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. J. Clin. Invest. *118*, 1979–1990.

Blomgran, R., Zheng, L., and Stendahl, O. (2007). Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. J. Leukoc. Biol. *81*, 1213–1223.

Bogyo, M., Verhelst, S., Bellingard-Dubouchaud, V., Toba, S., and Greenbaum, D. (2000). Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs. Chem. Biol. *7*, 27–38.

Bojič, L., Petelin, A., Stoka, V., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, V., and Turk, B. (2007). Cysteine cathepsins are not involved in Fas/CD95 signalling in primary skin fibroblasts. FEBS Lett. *581*, 5185–5190.

Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., and Jordans, S. (2008). Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. Biochimie *90*, 194–207.

Bromme, D., Nallaseth, F.S., and Turk, B. (2004). Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. Methods *32*, 199–206.

Brooks, A.D., Ramirez, T., Toh, U., Onksen, J., Elliott, P.J., Murphy, W.J., and Sayers, T.J. (2005). The proteasome inhibitor bortezomib (Velcade) sensitizes some human tumor cells to Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1059*, 160–167.

Brunk, U.T. and Svensson, I. (1999). Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. Redox Rep. *4*, 3–11.

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

Cirman, T., Orešić, K., Mazovec, G.D., Turk, V., Reed, J.C., Myers, R.M., Salvesen, G.S., and Turk, B. (2004). Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. J. Biol. Chem. *279*, 3578–3587.

Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Moller, P., and Krammer, P.H. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. J. Immunol. *149*, 3166–3173.

Droga-Mazovec, G., Bojič, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., Salvesen, G.S., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2008). Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. J. Biol. Chem. *283*, 19140–19150.

Fehrenbacher, N. and Jäättelä, M. (2005). Lysosomes as targets for cancer therapy. Cancer Res. *65*, 2993–2995.

Fehrenbacher, N., Gyrd-Hansen, M., Poulsen, B., Felbor, U., Kallunki, T., Boes, M., Weber, E., Leist, M., and Jäättelä, M. (2004). Sensitization to the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation. Cancer Res. *64*, 5301–5310.

Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., and Jäättelä, M. (2001). Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. J. Cell Biol. *153*, 999–1010.

Fulda, S., Meyer, E., and Debatin, K.M. (2000). Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. Cancer Res. *60*, 3947–3956.

Ganten, T.M., Haas, T.L., Sykora, J., Stahl, H., Sprick, M.R., Fas, S.C., Krueger, A., Weigand, M.A., Grosse-Wilde, A., Stremmel, W., et al. (2004). Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. Cell Death Differ. *11*, S86–S96.

Gerspach, J., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2011). Therapeutic targeting of CD95 and the TRAIL death receptors. Recent Pat. Anticancer Drug Discov. *6*, 294–310.

Gonzalvez, F. and Ashkenazi, A. (2010). New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. Oncogene *29*, 4752–4765.

Groth-Pedersen, L. and Jäättelä, M. (2010). Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes. Cancer Lett. doi:10.1016/j.canlet.2010.05.021.

Guicciardi, M.E. and Gores, G.J. (2009). Life and death by death receptors. FASEB J. *23*, 1625–1637.

Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2000). Cathepsin B contributes to TNF-α-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome *c*. J. Clin. Invest. *106*, 1127–1137.

Guicciardi, M.E., Leist, M., and Gores, G.J. (2004). Lysosomes in cell death. Oncogene *23*, 2881–2890.

Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., and Gores, G.J. (2007). cFLIPL prevents TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the lysosomal pathway of apoptosis. Am. J. Physiol. *292*, G1337–1346.

Houseweart, M.K., Vilaythong, A., Yin, X.M., Turk, B., Noebels, J.L., and Myers, R.M. (2003). Apoptosis caused by cathepsins does not require Bid signaling in an in vivo model of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). Cell Death Differ. *10*, 1329–1335.

Ivanova, S., Repnik, U., Bojič, L., Petelin, A., Turk, V., and Turk, B. (2008). Lysosomes in apoptosis. Methods Enzymol. *442*, 183–199.

Kim, E.C., Yun, B.S., Ryoo, I.J., Min, J.K., Won, M.H., Lee, K.S., Kim, Y.M., Yoo, I.D., and Kwon, Y.G. (2004). Complestatin prevents apoptotic cell death: inhibition of a mitochondrial caspase pathway through AKT/PKB activation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *313*, 193–204.

Kirkegaard, T. and Jäättelä, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. Biochim. Biophys. Acta *1793*, 746–754.

Klarič, M., Tao, S., Stoka, V., Turk, B., and Turk, V. (2009). Cysteine cathepsins are not critical for TNF-α -induced cell death in T98G and U937 cells. Biochim. Biophys. Acta *1794*, 1372–1377.

Kohlhaas, S.L., Craxton, A., Sun, X.M., Pinkoski, M.J., and Cohen, G.M. (2007). Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. J. Biol. Chem. *282*, 12831–12841.

Kos, J., Sekirnik, A., Premzl, A., Zavasnik Bergant, V., Langerholc, T., Turk, B., Werle, B., Golouh, R., Repnik, U., Jeras, M., et al. (2005). Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. Exp. Cell. Res. *306*, 103–113.

Koschny, R., Holland, H., Sykora, J., Erdal, H., Krupp, W., Bauer, M., Bockmuehl, U., Ahnert, P., Meixensberger, J., Stremmel, W., et al. (2010). Bortezomib sensitizes primary human esthesioneuroblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis. J. Neurooncol. *97*, 171–185.

Lee, S.H., Kim, Y.K., Kim, C.S., Seol, S.K., Kim, J., Cho, S., Song, Y.L., Bartenschlager, R., and Jang, S.K. (2005). E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis. J. Immunol. *175*, 8226–8235.

Nagaraj, N.S., Vigneswaran, N., and Zacharias, W. (2006). Cathepsin B mediates TRAIL-induced apoptosis in oral cancer cells. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *132*, 171–183.

Nagaraj, N.S., Vigneswaran, N., and Zacharias, W. (2007). Hypoxia inhibits TRAIL-induced tumor cell apoptosis: involvement of lysosomal cathepsins. Apoptosis *12*, 125–139.

Newsom-Davis, T., Prieske, S., and Walczak, H. (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? Apoptosis *14*, 607–623.

Oberle, C., Huai, J., Reinheckel, T., Tacke, M., Rassner, M., Ekert, P.G., Buellesbach, J., and Borner, C. (2010). Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. Cell Death Differ. *17*, 1167–1178.

Papenfuss, K., Cordier, S.M., and Walczak, H. (2008). Death receptors as targets for anti-cancer therapy. J. Cell. Mol. Med. *12*, 2566–2585.

Reiser, J., Adair, B., and Reinheckel, T. (2010). Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. J. Clin. Invest. *120*, 3421–3431.

Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. Biochim. Biophys. Acta *1824*, 22–33.

Rozman-Pungercar, J., Kopitar-Jerala, N., Bogyo, M., Turk, D., Vasiljeva, O., Štefe, I., Vandenabeele, P., Bromme, D., Puizdar, V., Fonovič, M., et al. (2003). Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

reaction mechanism is more important than specificity. Cell Death Differ. *10*, 881–888.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J. *17*, 1675–1687.

Schrader, K., Huai, J., Jockel, L., Oberle, C., and Borner, C. (2010). Non-caspase proteases: triggers or amplifiers of apoptosis? Cell. Mol. Life Sci. *67*, 1607–1618.

Schutze, S., Tchikov, V., and Schneider-Brachert, W. (2008). Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 655–662.

Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., et al. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. J. Biol. Chem. *276*, 3149–3157.

Stoka, V., Turk, B., and Turk, V. (2005). Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. IUBMB Life *57*, 347–353.

Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2007). Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. Biol. Chem. *388*, 555–560.

Terrisse, A.D., Bezombes, C., Lerouge, S., Laurent, G., and Jaffrezou, J.P. (2002). Daunorubicin- and Ara-C-induced interphasic apoptosis of human type II leukemia cells is caspase-8-independent. Biochim. Biophys. Acta *1584*, 99–103.

Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science *245*, 301–305.

Turk, B. and Turk, V. (2009). Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? J. Biol. Chem. *284*, 21783–21787.

Turk, B., Stoka, V., Rozman-Pungercar, J., Cirman, T., Droga-Mazovec, G., Orešić, K., and Turk, V. (2002). Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. Biol. Chem. *383*, 1035–1044.

Turk, B., Turk, D., and Turk, V. (2012a). Protease signalling: the cutting edge. EMBO J. *31*, 1630–1643.

Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012b). Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. Biochim. Biophys. Acta *1824*, 68–88.

Vasiljeva, O., Korovin, M., Gajda, M., Brodoefel, H., Bojič, L., Kruger, A., Schurigt, U., Sevenich, L., Turk, B., Peters, C., et al. (2008). Reduced tumour cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice. Oncogene *27*, 4191–4199.

Vince, J.E., Chau, D., Callus, B., Wong, W.W., Hawkins, C.J., Schneider, P., McKinlay, M., Benetatos, C.A., Condon, S.M., Chunduru, S.K., et al. (2008). TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFa. J. Cell Biol. *182*, 171–184.

Walczak, H. and Krammer, P.H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. Exp. Cell Res. *256*, 58–66.

Wattiaux, R., Wattiaux-de Coninck, S., Thirion, J., Gasingirwa, M.C., and Jadot, M. (2007). Lysosomes and Fas-mediated liver cell death. Biochem. J. *403*, 89–95.

Werneburg, N.W., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2007). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. J. Biol. Chem. *282*, 28960–28970.

Yang, A., Wilson, N.S., and Ashkenazi, A. (2010a). Proapoptotic DR4 and DR5 signaling in cancer cells: toward clinical translation. Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 837–844.

Yang, F., Tay, K.H., Dong, L., Thorne, R.F., Jiang, C.C., Yang, E., Tseng, H.Y., Liu, H., Christopherson, R., Hersey, P., et al. (2010b). Cystatin B inhibition of TRAIL-induced apoptosis is associated with the protection of FLIP(L) from degradation by the E3 ligase itch in human melanoma cells. Cell Death Differ. *17*, 1354–1367.

Authenticated | boris.turk@ijs.si author's copy
Download Date | 12/4/12 7:47 AM

Fast Profiling of Protease Specificity reveals similar substrate specificities for cathepsins K, L and S

Matej Vizovišek[1,2,3], Robert Vidmar[1,3], Emmy Van Quickelberghe[4,5], Francis Impens[4,5,6], Uroš Andjelković[7], Barbara Sobotič[1,3], Veronika Stoka[1], Kris Gevaert[4,5], Boris Turk[1,2,8] and Marko Fonović[1,2*]

[1] Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jozef Stefan Institute, Jamova cesta 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia
[2] Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins, Jamova cesta 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia
[3] International Postgraduate School Jozef Stefan, Jamova cesta 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia
[4] Department of Biochemistry, Ghent University, B-9000 Ghent, Belgium
[5] Department of Medical Protein Research, VIB, B-9000 Ghent, Belgium
[6] Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France
[7] Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade, Serbia
[8] Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Aškerčeva cesta 5, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

* Corresponding author: M. Fonović
Jozef Stefan Institute
Jamova 39, 1000 Ljubljana
Phone: +386 1 477 3474
Fax: +386 1 477 3984
e-mail: marko.fonovic@ijs.si

Keywords: proteomics, N-terminomics, intact protein-based cleavage site discovery, cathepsin protease specificity.

Received: 29-Sep-2014; Revised: 02-Dec-2014; Accepted: 22-Jan-2015.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/pmic.201400460.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

Abbreviations:

AcD_3-NHS, N-hydroxysuccinimide ester of trideutero-acetate;

COFRADIC, combined fractional diagonal chromatography;

FPPS, fast profiling of protease specificity;

PEP, posterior error probability;

PICS, proteomic identification of protease cleavage sites;

SAX, strong anion exchanger;

TAILS, terminal amine isotopic labeling of substrates;

TNBS, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid

ABSTRACT: Proteases are important effectors of numerous physiological and pathological processes. Reliable determination of a protease's specificity is crucial to understand protease function and to develop activity-based probes and inhibitors. During the last decade, various proteomic approaches for profiling protease substrate specificities were reported. Although most of these approaches can identify up to thousands of substrate cleavage events in a single experiment, they are often time consuming and methodologically challenging as some of these approaches require rather complex sample preparation procedures. For such reasons their application is often limited to those labs that initially introduced them. Here we report on a fast and simple approach for proteomic profiling of protease specificities (Fast Profiling of Protease Specificity - FPPS), which can be applied to complex protein mixtures. FPPS is based on trideutero-acetylation of novel N-termini generated by the action of proteases and subsequent peptide fractionation on StageTips containing ion-exchange and reverse phase chromatographic resins. FPPS can be performed in two days and does not require extensive fractionation steps. Using this approach, we have determined the specificity profiles of the cysteine cathepsins K, L and S. We further validated our method by comparing the results with the specificity profiles obtained by the N-terminal COFRADIC method. This comparison pointed to almost identical substrate specificities for all three cathepsins and confirmed the reliability of the FPPS approach.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

Accepted Article

1. Introduction

Proteolytic degradation is one of the most common irreversible protein modifications. In its selective form, also known as proteolytic processing, it can alter protein activity, structural integrity and/or cellular localization. Through proteolytic processing proteases influence a large variety of cellular processes such as cell migration, proliferation, differentiation, tissue remodelling, immune response and apoptosis [1]. Therefore, identification of protease substrates and determination of their specificities can provide important insights into their function. Although recent developments in the field of degradomics have enabled large scale identification of protease substrates, substrate data for many proteases still remain scarce [1]. In the past decade, several proteomic approaches for identification of protease cleavage sites were developed, each relying on various strategies for peptide labelling and enrichment. The new peptides generated by proteolytic cleavage can be isolated by positive enrichment strategies such as N-terminal biotinylation coupled to avidin-based affinity chromatography or by negative enrichment approaches which remove internal (tryptic) peptides from the sample [2]. The two most commonly used negative enrichment strategies are TAILS and COFRADIC. TAILS (Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates) is based on reductive methylation of N-termini with isotopicaly labelled formaldehyde and subsequent removal of unlabelled tryptic peptides by chemical binding to a polyglycerol aldehyde polymer [3, 4]. In COFRADIC (COmbined FRActional DIagonal Chromatography), N-termini are trideutero-acetylated and internal tryptic peptides are removed by reversed phase chromatography after being tagged by a hydrophobic trinitrophenyl group [5-7]. N-terminal peptide enrichment, either by positive or negative approaches, enables in-depth identification of proteolytic events in complex samples. Although the aforementioned methods have proven to be valuable tools for identification of protease cleavage events, they often rely on several experimental steps, amongst others involving sample labelling and/or several cycles of chromatographic separation. They are therefore often difficult to implement in laboratories that are not dedicated to such degradomics methodologies and that only have limited access to the required instrumentation. Since the protease field is constantly expanding with new proteases being discovered and characterized, many laboratories would greatly benefit from the development of a method that enables a quick, simple and reliable determination of protease substrate specificity.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

Here we present a simple and straightforward approach for proteomic identification of protease specificities in a complex proteome background. By combining *in solution* isotopic labelling [6] with Stage Tip fractionation [8-10] we developed a simple method to profile protease specificities. We tested our approach by profiling the substrate specificities of the cathepsins K, L and S, three lysosomal proteases known to play important roles in numerous molecular processes such as tissue remodelling, antigen processing and presentation, cell cycle regulation and prohormone processing [11, 12]. Moreover, their upregulated or misslocalized activity has been related to numerous pathological processes, including cancer progression, inflammatory diseases and neurodegeneration [13-17]. The cathepsin substrate specificity was historically studied using oxidized insulin beta chain [18-20] and later by combinatorial chemistry and small peptidic inhibitors [11, 21]. Only recently, a proteomic approach based on proteome-derived peptide libraries (Proteomic Identification of protease Cleavage Sites - PICS) was applied to determine the specificity of cathepsins B, K, L and S [22, 23]. In this approach, a cell lysate was first digested by trypsin or endoproteinase GluC and such generated peptide library was subsequently treated with a given cathepsin. The downside of this peptide-based approach is that some of the putative cleavage sites are destroyed during the proteolytic digestion needed for peptide library preparation. Our approach, which we named FPPS (Fast Profiling of Protease Specificity), enabled us to identify over 1800 cleavage events by cathepsins K, L and S in more than 700 proteins. Overall, a strong preference for aliphatic but also aromatic residues in the P2 position was observed for all three cathepsins, while other positions did not appear to have much influence on cathepsin cleavages, which is in good agreement with our current knowledge on the specificites of cysteine cathepsins [11]. The reliability of our FPPS approach was verified by similar analyses done with the N-terminal COFRADIC approach, which is one of the most used approaches for the in-depth identification of proteolytic cleavage events in complex samples. Both methods showed almost identical specificity profiles for all tested cathepsins.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

2. Materials and methods

2.1. Fast Profiling of Protease Specificity (FPPS)

Cell culture and cell lysate preparation

Breast carcinoma cells (MDA-MB-231) were routinely maintained in DMEM medium (Lonza) supplemented with fetal bovine serum (10%), glutamine (1%) and penicillin streptomycin (1%) at 37°C and 5% CO_2. For whole cell lysate preparation, cells were grown to confluency, washed twice with PBS (Lonza, Basel, Switzerland) and detached with Hank's based enzyme-free cell dissociation solution (Millipore, Billerica, MA, USA). Detached cells were centrifuged and lysed on ice for 15 min with lysis buffer (20 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% SDS, 0.05% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) followed by a short sonication (10 pulses of 5 s each). Insoluble material was removed after centrifugation at 14,000 g for 5 min. Next, the protein concentration was determined with the Bio-Rad assay, and aliquots containing 0.5 mg protein were frozen at -80°C until further use.

In vitro digestion of cell lysates with recombinant cathepsins

Recombinant human cathepsins K, L and S were expressed in the methylotropic yeast expression system *Pichia pastoris* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to standard protocols [24, 25]. Pure mature proteins were titrated with the broad spectrum cysteine cathepsin inhibitor E-64 yielding active concentrations of 14 µM, 42 µM and 19 µM for catK, catL and catS, respectively. Total cell lysates were dialysed (or buffer exchanged) in a microfilter device with a cut-off of 3,000 Da (Millipore, Billerica, MA, USA) against 50 mM phosphate buffer, containing 150 mM NaCl and 2.5 mM DTT, pH 6.0. Next, the pH was checked and the sample was transferred to a low-binding Eppendorf tube (500 µg of total protein). Recombinant cathepsin K, L or S were then added to an approximate 1:100 enzyme/substrate molar ratio based on the assumption that the average Mw of a protein in the sample was 50,000 Da. Samples were then incubated at 37°C for 1 h before adding E-64 at a final concentration of 25 µM to block cathepsin activity.

Accepted Article

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

In solution N-terminal labelling and sample preparation using microfilter devices

The cathepsin-treated samples were transferred to a 500 µl microfilter device with a cut-off of 3,000 Da (Millipore) and the buffer was exchanged to 100 mM phosphate buffer, pH 8.5. The volume of the samples was adjusted to 400 µl with 100 mM phosphate buffer, pH 8.5, before 2 mg of an N-hydroxysuccinimide ester of trideutero-acetate (AcD_3-NHS, made in-house [7]) was dissolved in the sample. The samples were incubated for 1 h at 30°C, after which the labelling step was repeated. In order to reverse partial labelling of serine, threonine and tyrosine side-chains (O-acylation), 10 µl of 50% NH_2OH was added per sample and left to incubate at room temperature for 20 min. Urea was then added to the samples to a final concentration of 8 M and proteins were reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) for 1 h at room temperature. Cysteine residues were alkylated by addition of iodoacetamide to a final concentration of 50 mM and incubation for 1 h at room temperature in the dark. To quench unreacted iodoacetamide, the samples were incubated with 50 mM DTT for 30 min at room temperature. After exchanging the buffer with 25 mM ammonium bicarbonate pH 7.8 by spinning the microcolumns in the centrifuge at 6000 x g for 15 min, the sample volume was adjusted to 250 µl with 25 mM ammonium bicarbonate pH 7.8. Sequencing-grade porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) was added at a 1:100 (w/w, enzyme/substrate) ratio and incubated overnight at 37°C. The next day, the peptide-containing flowthrough was collected by spinning the microcolumns in the centrifuge at 6000 x g for 10 min and concentrated down to 50 µl.

Sample fractionation using SAX-C18 StageTips

The generated peptide mixture was mixed with Britton & Robinson buffer (20 mM acetic acid, 20 mM phosphoric acid and 20 mM boric acid), pH 11 (the pH was adjusted with 1 M NaOH if necessary). Anion exchanger tips were prepared by stacking 6 discs of Empore/Disk Anion Exchange (1214-5012) (Varian, Palo Alto, CA, USA) in a 200 µl pipet tip, while C18 tips were prepared by stacking 4 discs of Empore/C18 (Varian, Palo Alto, CA, USA). Peptides were fractionated on SAX-C18 StageTips with buffers at pH 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 and 3 as described elsewhere [8, 9] and subsequently desalted on C18 tips with elution in 50 µl 60% (v/v) acetonitrile, 0.1% (v/v) formic acid in water. Eluted samples were concentrated to 15 µl by vacuum drying prior to further LC-MS/MS analysis.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

LC-MS/MS analysis

LC-MS/MS analysis was performed using an Orbitrap LTQ Velos mass spectrometer coupled to a Proxeon nano-LC HPLC unit, which were automatically operated under the Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The peptide samples were loaded on a C18 trapping column (Proxeon EASY-Column^{TM}) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using solvent A (0.1% (v/v) formic acid in water) and separated on a C18 PicoFrit^{TM} AQUASIL analytical column (New Objective, Woburn, MA, USA). Elution was performed using a 120 min 5-50% linear gradient of solvent B (100% acetonitrile, 0.1% formic acid) at a flow rate of 300 nl/min. During the gradient, full MS spectra were recorded and MS/MS spectra were obtained by CID fragmentation of the nine most intense precursor ions from the full MS scan. Dynamic exclusion was enabled with repeat count of 2 and 60 s exclusion time. Full MS spectra were recorded in Orbitrap at resolution of 30,000, MS/MS spectra were recorded in profile mode in the linear ion trap at resolution of 7,500. Precursors with nonasigned charge state were not chosen for MS/MS.

Analysis of MS/MS data

Data analysis, including database searches, was performed using the MaxQuant software package version 1.4.0.5 and the Andromeda search engine [26, 27]. The raw spectral data were searched against the human protein sequences in the UniProt/Swiss-Prot database (UniProtKB, *Homo sapiens*, canonical database containing 20,249 sequences, release of May 1, 2013) with trideutero-acetylation of peptide N-termini (+45.034 Da) and methionine oxidation (+15.99 Da) as variable modifications and trideutero-acetylation of lysines (+45.034 Da) and carbamidomethylation of cysteines (+57.02 Da) as fixed modifications. Database searches were performed with semi-ArgC/P as enzyme setting allowing for 1 missed cleavage. Precursor ion and fragment ion mass tolerances were set to 20 ppm and 0.5 Da respectively. A reversed database search was performed and the false discovery rate (FDR) was set at 1% for peptide and protein identifications. Peptides with posterior error probability (PEP) score below 0.05 were retained as positive hits (Supplementary table S1). Peptides with trideuteroacetylated N-termini, which were present in the cathepsin treated sample but not in the negative control, were considered to be the product of cathepsin cleavage. The P1'-P4' positions were determined from the peptide N-terminus, whilst the P4-P1 positions were determined bioinformatically. The iceLogos were generated using frequencies of positional amino acid occurrence normalized to natural amino acid abundances in the human Swiss-Prot database [28].

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

2.2 COFRADIC Method

Cell culture and SILAC labelling

HL60 cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) were cultured in RPMI medium without arginine, lysine and glutamine (Silantes, München, Germany) supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM GlutaMAX^{TM} (Invitrogen), 25 units/ml penicillin (Invitrogen), 25 µg/ml streptomycin (Invitrogen), 146 mg/L L-Lysine.HCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and either natural L-Arginine.HCl (light, Sigma-Aldrich) or $^{13}C_6$ L-Arginine.HCl (heavy, Silantes). The concentration of L-Arginine.HCl was reduced to 16.8 mg/L (8.4% of the normal concentration in RPMI) to prevent metabolic conversion of arginine to proline. Cells were cultured at 37°C and in 5% CO_2 for at least six population doublings to ensure complete incorporation of the labelled arginine. Upon completion, aliquots of 10^7 SILAC-labelled cells were washed three times with PBS and cell pellets were frozen at -80˚C until further use.

Cell lysis and cathepsin treatment

SILAC-labelled cells were lysed in a buffer containing 50 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 50 mM sodium phosphate pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1 mM DTT by three rounds of freeze-thawing. Lysates were cleared by centrifugation for 15 min at 16,000 x g, followed by acidification to pH 5.5 using 1 M HCl. For cathepsin treatment, we used a differential sample mixing strategy to allow software-based quantification and annotation of protein processing events, as reported previously [29]. Here, the control sample, made from three parts of light-labelled cell lysate, was incubated with 10 µM E-64, whereas the treated sample, made from one part light-labelled and one part heavy-labelled cell lysate, was incubated with 200 nM recombinant cathepsin L, K or S for 15 min at 37°C. After incubation, the control and cathepsin-treated samples were mixed, 4 M guanidinium hydrochloride was added and the pH was raised to 7.4 to proceed with COFRADIC isolation of N-terminal peptides.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

COFRADIC isolation of N-terminal peptides

The N-terminal COFRADIC protocol was performed as described before [7]. Briefly, proteins were reduced and alkylated using 15 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) and 30 mM iodoacetamide. After desalting the protein mixtures on NAP-10 columns (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in 2 M guanidinium hydrochloride and 50 mM sodium phosphate buffer at pH 8, free amino groups were acetylated by incubation with 20 mM of an N-hydroxysuccinimide (NHS) ester of trideutero-acetate (made in-house) for 1 h at 30°C followed by addition of 10 mM glycine to quench residual NHS esters and 120 mM hydroxylamine to reverse potential O-acetylation and incubation for 20 min at room temperature. The protein samples were again desalted on NAP-10 columns in 20 mM ammonium bicarbonate, boiled for 5 min, put on ice for 5 min and digested overnight with sequencing-grade trypsin (Promega, Madison, WI, USA) (enzyme/substrate of 1/100, w/w) at 37°C. The resulting peptide mixtures were incubated with 1,250 mU Q-cyclase (Qiagen, Germatown, MD, USA) and 625 mU activated pGAPase (Qiagen) to drive the formation of N-terminal pyroglutamate to completion and proteolytically remove this residue, respectively. N-terminal peptides were then pre-enriched by strong cation exchange (SCX) chromatography on disposable SCX cartridges (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) in a buffer containing 50% acetonitrile in 10 mM sodium phosphate, pH 3.0. N-terminal peptides, which were not retained on the SCX resin under these conditions, were collected in the run-through fraction, concentrated by vacuum drying and re-suspended in 10 mM ammonium acetate pH 5.5 in 2% acetonitrile. Methionine residues were oxidized by incubating the peptides with 0.5% H_2O_2 for 30 min at 30°C, followed by immediate injection of the samples on a capillary RP-HPLC column (Zorbax 300SB-C18, 2.1 mm internal diameter, 150 mm length, Agilent Technologies) for the first COFRADIC separation. Peptides were separated by a linear gradient of acetonitrile (from 2% to 70% in 100 min) and peptides that eluted between 20 and 80 min were collected in 15 primary COFRADIC fractions of 4 min each. Each primary fraction was incubated four times with 15 nmol of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) and each fraction was re-separated by RP-HPLC under the same conditions as during the primary separation. N-terminal peptides, which cannot get modified by TNBS, eluted from the column during the same time interval and were collected in 16 fractions of 0.5 min. Internal and C-terminal peptides, which were modified by TNBS, underwent a hydrophobic shift and were not collected. Secondary fractions with 12 min difference in retention time were pooled to a total of 48 samples for LC-MS/MS analysis.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

LC-MS/MS and data analysis

Samples were analyzed by LC-MS/MS on a linear trap quadrupole (LTQ) Orbitrap Velos or a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and peak list files were generated from the peptide fragmentation spectra as described before [29, 30]. Spectra were searched with MASCOT (version 2.4.0, www.matrixscience.com) in the Swiss-Prot database (releases of November 11, 2011, January 25, 2012 and April 18, 2012) with restriction to human proteins and quantified by the MASCOT Distiller software as described elsewhere [29]. Briefly, semiArgC/P was used as enzyme setting with one missed cleavage allowed. Methionine oxidation, trideutero-acetylation of lysine and alkylation of cysteine were set as fixed modifications, while variable modifications included acetylation and trideutero-acetylation of N-termini and pyroglutamate formation of N-terminal glutamine residues. Mass tolerance of precursor and fragment ions was set to 10 ppm and 0.5 Da, respectively. To allow identification of peptides from both light and heavy labelled samples, a quantitation method with two different components was made, defining $^{12}C_6$ Arg and $^{13}C_6$ Arg as exclusive modifications at any position. Only peptides that were ranked first and scored above the threshold score set at 99% confidence were withheld. The FDR was calculated for every search as described previously [31] and was always found to be lower than 0.78%. Potential false positive peptide identifications were selected and automatically removed by the Peptizer software application exactly as described before [32]. Only peptides that fulfilled the following three conditions were considered as neo-N-terminal peptides reporting true cathepsin cleavage sites: (1) the start position of the peptide in the protein sequence is >2, (2) the N-terminal alpha amino group of the peptide is modified by trideutero-acetylation and (3) the light/heavy (L/H) ratio is < 2 (L/H ratios of neo-N-terminal peptides are distributed around 1, determination of the ratio cut-off value is based on the boundary of a one-sided 99% quantile of the ratio distribution) as described before [29]. Neo-N-terminal peptides were then loaded into the TOPPR database [33] and re-mapped onto a later version of the Swiss-Prot database (release of January 22, 2014) to generate the final lists of total cleavage sites (Supplementary table S2).

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

3. Results

3.1 Identification of potential protease substrates and cleavage sites with FPPS

Figure 1 shows the workflow of the Fast Profiling of Protease Specificity (FPPS) method with its most important experimental steps. For evaluation of cathepsin cleavages, we treated proteins from soluble MDA-MB-231 cell lysates with recombinant cathepsins whereas lysates to which the general cathepsin inhibitor E-64 was added, were used as a negative control. The protein fragments generated by cathepsin cleavage were trideutero-acetylated on their N-termini in order to distinguish them from internal peptides that will be generated by trypsin in a next step. Since the label efficiently reacts with primary amino groups, it also labels the side-chains of lysines. As trypsin can no longer cleave at acetylated lysines, the majority of tryptic peptides end with an arginine at the C-terminus. Sample preparation for mass spectrometry analysis was performed *in solution* and the obtained peptide sample was subsequently fractionated using the Stage Tip protocol, which is based on the SAX capture of peptides followed by stage elution over C18 resin tips [8, 9]. Among all of the peptides identified by LC-MS/MS, cathepsin cleavage sites were recognized in the form of trideuteroacetylated neo-N-terminal peptides which were absent from the control sample. Using FPPS we identified 731 cleavages in 421 proteins for cathepsin K, 576 cleavages in 340 proteins for cathepsin L and 1062 cleavages in 539 proteins for cathepsin S, respectively (Figure 2A-B).The high number of common cleavage sites indicates that the three tested cathepsins have similar cleavage site preferences, which is in agreement with their high sequence homology, similar structural fold and reported physiological redundancy (reviewed in [11, 34]). In about 60% of the identified proteins only a single cleavage site was identified, suggesting that cathepsins processed, but not degraded proteins (Fig. 2C).

3.2 Sequence specificity analysis of identified cleavage sites

In order to compare the substrate specificity of the three cathepsins, the P1'-P4' residues were determined from the identified N-terminally labelled peptides, whereas the corresponding P1-P4 residues were determined by bioinformatic analysis. Using this information, substrate sequence logos composed of total unique cleavage sites for each of the tested cathepsins were generated [28] (Figure 3A-B). It is generally accepted that the substrate specificity of cysteine cathepsins is primarily governed by their S2 substrate binding pocket, which is preferentially occupied by hydrophobic residues [35]. This was confirmed by FPPS since hydrophobic

This article is protected by copyright. All rights reserved.

amino acids, such as leucine, valine and isoleucine were preferred in the P2 position of all three cathepsins. However, some differences among the cathepsins were also observed. Most important seems to be the cathepsin K preference for a proline in the P2 position, which was not observed for the other two cathepsins. In addition, cathepsin L exhibited a higher preference for aromatic residues (tyrosine and phenylalanine) in the P2 position than cathepsins S and K, while cathepsin S exhibited a higher preference for lysine in this position than the other two cathepsins.

Apart from the S2 binding site, which is a deep pocket, the S1 and S1' sites provide a substrate binding surface which is less well defined [35]. In the P1 position, glycine, arginine and lysine were the most common residues in all three cathepsins. In addition, cathepsin S, but not cathepsins L and K, also accepted threonine in this position. In the P1' position, cathepsin S preference for isoleucine was the only notable difference observed among the tested cathepsins (Figure 3A-B). In the P1 and P1' positions proline residues were strongly disfavoured for all three cathepsins. Specificity in the other positions was less pronounced, although a general preference for acidic residues (aspartates and glutamates) in the prime positions (P1'-P4') was observed for all three cathepsins. This was not observed in other reported datasets [21-23] and the reason for this could be a stronger retention of negatively charged peptides on anionic exchange resin (SAX). It should also be noted that charged regions on protein surface are more readily accessible to protease cleavage than buried hydrophobic regions. The sum of those two effects could therefore account for the observed enrichment of negatively charged residues at prime sites.

A direct pairwise comparison of substrate specificities of the three cathepsins showed additional minor differences in the P3 and the prime positions (Figure 4). Most notable is the cathepsin K preference for aspartate residues in the P2' and P4' positions and the cathepsin L preference for proline in the P4' position.

Accepted Article

This article is protected by copyright. All rights reserved.

3.3 Comparison of FPPS with N-terminal COFRADIC

In order to evaluate the FPPS method, we compared it with the N-terminal COFRADIC (COmbined FRActional DIagonal Chromatography) approach [5]. The main feature of COFRADIC is the enrichment of newly formed N-termini that are tagged and blocked by *in vitro* trideutero-acetylation, by depletion of internal peptides, being the products of trypsin degradation. The bulk of internal peptides are removed in a first stage by binding to an SCX resin, and in a second stage by labelling with a highly hydrophobic trinitrophenyl group and subsequent removal by RP-HPLC. Identification of cathepsin K, L and S cleavage sites by COFRADIC was performed independently using a different cell line (HL-60). Due to the higher enrichment of neo-N-terminal peptides by elimination of internal tryptic peptides, COFRADIC was able to detect more cleavage events than FPPS. In general, N-terminal COFRADIC between 3,000 to 8,000 neo N-terminal peptides, while FPPS led to the identification of 500 to 1,000 cleavage events (Tables 1 and 2). However, a direct comparison of the specificity profiles obtained by both methods revealed almost identical profiles in the P1-P4 positions for all three tested cathepsins (Figure 5A-B). This demonstrates that the number of cathepsin cleavages identified with FPPS was sufficient for a reliable determination of their cleavage specificity. However, some differences between the two methods were observed in the P1'-P4' positions (Figure 5B). Most notable are the enrichment for histidine residues at prime positions in the FPPS dataset and the enrichment for lysine residues upon COFRADIC analysis, most probably due to differences in the sample preparation protocols of both methodologies. In the N-terminal COFRADIC protocol, during the initial SCX enrichment of N-terminal peptides histidine-containing peptides are removed since these residues are positively charged at the experimental pH (pH 3). On the other hand, lysine residues in both experimental approaches lose their charge due to deuteroacetylation of their side chain. In COFRADIC, they are therefore not retained by SCX resin, while in FPPS they are not efficiently separeted by SAX, which could lead to their observed underrepresentation. Interestingly, glycine residues in the P1' position were only found enriched in the FPPS analysis and not in the COFRADIC experiment, although a preference for glycine in this position has been reported previously [22]. In general, despite some subtle differences inherent to the experimental approaches, both approaches provided rich cleavage datasets and a reliable specificity profile for all tested cathepsins. Note that the fact that two different cell lines, MDA-MB-231 and HL-60 cells, were used when comparing both methods gave no influence on the determined specificity profiles. That was expected, as cathepsin cleavage preferences are independent from the actual protein composition of a sample.

Accepted Article

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

4. Discussion

Although various approaches for proteomic determination of protease substrate specificities were reported in the last decade, this remains a challenging task, typically involving many steps of peptide labelling and separation. Here we report on the development and validation of a simple and straightforward degradomics procedure, which enables quick and reliable determination of protease substrate specificities that can be easily implemented in any laboratory setting. Moreover, the labelling reagents are very easily synthesized from commercialy available chemicals [7]. The procedure can be performed in two days and requires a single trideutero-acetylation labelling step, followed by peptide separation using home-made Stage Tips containing SAX and C18 resin which are known for efficient sample fractionation and good sample recovery [8-10]. Using this sample fractionation approach, we were able to identify 500-1,000 cleavage events per single protease treatment experiment, which proved to be sufficient for a detailed determination of protease specificity. For the purpose of simplicity, no relative quantitation was used in the approach described, although relative quantification methods such as SILAC could be included, if necessary. In our case, only N-terminally trideutero-acetylated peptides, which were present in the cathepsin-treated proteome and absent in the negative control, were used for profiling cleavage specificities. The reliability of our approach was verified by using N-terminal COFRADIC data on the same cathepsins, which gave almost identical specificity profiles. In a way, this confirmed our expectations in that the actual absence of in-depth quantitative data in FPPS did not introduce significant numbers of false positive assignments of neo N-terminal peptides. Furthermore, comparison of FPPS and COFRADIC data with cathepsin specificities obtained by peptide-based methods such as PICS and peptide library screens [21-23] shows numerous similarities in the obtained profiles, but also revealed some differences related to the methods used. Among the peptide-based approaches, some cleavage sites are lost in PICS during peptide library preparation [22] and peptide library screens cannot profile prime sites [1]. On the other hand, in protein-based approaches, cleavage sites containing hydrophobic residues can be underrepresented due to their lower availability or lover detectability in LC-MS/MS, while hydrophilic residues can be overrepresented for the same reason. Such observations suggest that various experimental approaches should be combined in order to obtain specificity profiles which are bias-free and most relevant for a given experimental setting.

Profiling of proteases with broad substrate specificities such as cysteine cathepsins is usually less straightforward than analysis of highly specific proteases, such as caspases. Cathepsins

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

are important players in numerous pathological processes and reliable profiling of their specificities is of high importance for a better understanding of their physiological function. With some of their inhibitors currently going through various phases of clinical testing, cathepsins are also considered as relevant therapeutical targets [36, 37]. In general, FPPS and COFRADIC results correlate well with peptide library screen results, but comparison of specificity profiles has also revealed some differences [21]. In the P1 position of all tested cathepsins, FPPS as well as COFRADIC showed enrichment of glycines, which was not observed in peptide library screens. Both FPPS and COFRADIC also identified lysines and arginines in this position, which is an important aspect of cathepsin substrate specificity, and was also observed in small peptide positional library screens [21], but was completely absent in the peptide-based PICS method, where trypsin was used for the preparation of peptide library [22, 23]. On the other hand, substrate library screens showed a strong preference for tryptophan in the P2 position, which was less prominent in PICS, but absent in COFRADIC and FPPS. The reason for this could be the low natural occurrence of tryptophan [38] and the overall lower detectability of hydrophobic peptides in MS-based approaches. A plausible explanation is that in native proteins, which comprise the starting proteome for cathepsin processing, hydrophilic regions that form the loops and other protease-exposed regions, are much more accessible to proteases than internal regions, which are mostly hydrophobic. Therefore, cleavages in hydrophobic regions are less likely to occur mainly due to more limited accessibility. Both FPPS and COFRADIC were able to detect a similar specificity in the P2 position for all tested cathepsins, which is in good agreement with previous studies [21-23]. Moreover, they also detected a proline specificity for cathepsin K, a distinguishing feature from cathepsins L and S, that was also observed previously and is likely to be of physiological relevance [21, 39]. A preference of cathepsin K for Pro in the P2 position was also demonstrated using mutants of the S2 pocket [40]. Indeed, cathepsin K is known to cleave proline-rich regions of collagen [41], an abundant structural protein composed of three type II polyproline helices [42]. In other positions, especially P1'-P4', there were only minor differences between FPPS and COFRADIC.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

In summary, results obtained using FPPS are in good agreement with published data on substrate specificities of cysteine cathepsins. The observed differences between tested cathepsins indicated some level of individual substrate preferences; however, the fact that these differences are relatively small is in accordance with the reported overlapping substrate specificity between cathepsins K, L and S. The described proteomic approach could thus be a valuable tool in further studies of protein processing in complex proteomes. It should be noted however that neo-N-terminal peptide enrichment based approaches such as COFRADIC are expected to be less dependent on the scan speeds of mass spectrometers due to the overall lower sample complexity. However, the introduction of mass spectrometers with increasing scan speeds is expected to alleviate this issue for FPPS. As there was a good correlation between FPPS and COFRADIC data, we believe that due to its simplicity FPPS could become a method-of-choice for fast and reliable profiling of proteases in numerous laboratories. On the other hand, a possible limitation of the FPPS approach might be its application to profiling of highly specific proteases such as caspases that generate much lower numbers of cleavage sites. In such cases, the corresponding neo-N-terminal peptides might remain unidentified in the more complex FPPS peptide mixtures as compared to COFRADIC or TAILS peptide mixtures.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank I. Klemenčič (Jožef Stefan Institute, Ljubljana) for excellent technical assistance and to S. Pečar and J. Mravljak (Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana) for the preparation of AcD_3-NHS. This work was supported by grants from the Slovenian Research Agency (P1-0140, J1-3602 and N1-0022 to B.T.; J1-0185 to M. F.). Further, K.G. acknowledges support from the Research Foundation – Flanders (FWO-Vlaanderen, project numbers G.0048.08 and G.0C37.14N). The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium [43] via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD001553 and PXD001536 (DOI: 10.6019/ PXD001536).

The authors have declared no conflict of interest.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

REFERENCES

[1] Turk B., Turk D., Turk V., Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J.* 2012, 31, 1630-43.
[2] Plasman K., Van Damme P., Gevaert K., Contemporary positional proteomics strategies to study protein processing. *Curr Opin Chem Biol.* 2013, 17, 66-72.
[3] Kleifeld O., Doucet A., auf dem Keller U., Prudova A. et al., Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat Biotechnol.* 2010, 28, 281-8.
[4] Prudova A., auf dem Keller U., Butler G.S., Overall C.M., Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2010, 9, 894-911.
[5] Gevaert K., Goethals M., Martens L., Van Damme J. et al., Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat Biotechnol.* 2003, 21, 566-9.
[6] Van Damme P., Van Damme J., Demol H., Staes A. et al., A review of COFRADIC techniques targeting protein N-terminal acetylation. *BMC Proc.* 2009, 3 Suppl 6, S6.
[7] Staes A., Impens F., Van Damme P., Ruttens B. et al., Selecting protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography. *Nat Protoc.* 2011, 6, 1130-41.
[8] Wisniewski J.R., Zougman A., Mann M., Combination of FASP and StageTip-Based Fractionation Allows In-Depth Analysis of the Hippocampal Membrane Proteome. J *Proteome Res.* 2009, 8, 5674-8.
[9] Wisniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M., Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009, 6, 359-62.
[10] Wisniewski J.R., Ostasiewicz P., Mann M., High Recovery FASP Applied to the Proteomic Analysis of Microdissected Formalin Fixed Paraffin Embedded Cancer Tissues Retrieves Known Colon Cancer Markers. *J Proteome Res.* 2011, 10, 3040-9.
[11] Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M. et al., Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta.* 2012, 1824, 68-88.
[12] Brix K., Dunkhorst A., Mayer K., Jordans S., Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie.* 2008, 90, 194-207.
[13] Vasiljeva O., Reinheckel T., Peters C., Turk D. et al.,. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des.* 2007, 13, 387-403.
[14] Fonovic M., Turk B., Cysteine cathepsins and their potential in clinical therapy and biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl.* 2014, 8, 416-26.
[15] Pislar A., Kos J., Cysteine cathepsins in neurological disorders. *Mol Neurobiol.* 2014, 49, 1017-30.
[16] Reiser J., Adair B., Reinheckel T., Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest.* 2010, 120, 3421-31.
[17] Mohamed M.M., Sloane B.F., Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006, 6, 764-75.
[18] Kargel H.J., Dettmer R., Etzold G., Kirschke H. et al., Action of cathepsin L on the oxidized B-chain of bovine insulin. *FEBS Lett.* 1980, 114, 257-60.
[19] Kirschke H., Wiederanders B., Bromme D., Rinne A., Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J.* 1989, 264, 467-73.
[20] Bromme D., Steinert A., Friebe S., Fittkau S. et al.,. The specificity of bovine spleen cathepsin S. A comparison with rat liver cathepsins L and B. *Biochem J.* 1989, 264, 475-81.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

[21] Choe Y., Leonetti F., Greenbaum D.C., Lecaille F., et al., Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *J Biol Chem.* 2006, 281, 12824-32.
[22] Biniossek M.L., Nagler D.K., Becker-Pauly C., Schilling O., Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S. *J Proteome Res.* 2011, 10, 5363-73.
[23] Schilling O., Overall C.M., Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites. *Nat Biotechnol.* 2008, 26, 685-94.
[24] Mihelic M., Dobersek A., Guncar G., Turk D., Inhibitory fragment from the p41 form of invariant chain can regulate activity of cysteine cathepsins in antigen presentation. *J Biol Chem.* 2008, 283, 14453-60.
[25] Bromme D., Nallaseth F.S., Turk B., Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods.* 2004, 32, 199-206.
[26] Cox J., Mann M., MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 2008, 26, 1367-72.
[27] Cox J., Neuhauser N., Michalski A., Scheltema R.A. et al.,. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J Proteome Res.* 2011, 10, 1794-805.
[28] Colaert N., Helsens K., Martens L., Vandekerckhove J., Gevaert K., Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. *Nat Methods.* 2009, 6, 786-7.
[29] Impens F., Colaert N., Helsens K., Ghesquiere B. et al., A quantitative proteomics design for systematic identification of protease cleavage events. *Mol Cell Proteomics.* 2010, 9, 2327-33.
[30] Ghesquiere B., Colaert N., Helsens K., Dejager L., et al., In vitro and in vivo protein-bound tyrosine nitration characterized by diagonal chromatography. *Mol Cell Proteomics.* 2009, 8, 2642-52.
[31] Elias J.E., Gygi S.P., Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods.* 2007, 4, 207-14.
[32] Helsens K., Timmerman E., Vandekerckhove J., Gevaert K., Martens L., Peptizer, a tool for assessing false positive peptide identifications and manually validating selected results. *Mol Cell Proteomics.* 2008, 7, 2364-72.
[33] Colaert N., Maddelein D., Impens F., Van Damme P. et al., The Online Protein Processing Resource (TOPPR): a database and analysis platform for protein processing events. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41, D333-7.
[34] Nagler D.K., Menard R., Family C1 cysteine proteases: biological diversity or redundancy? *Biol Chem.* 2003, 384, 837-43.
[35] Turk D., Guncar G., Podobnik M., Turk B., Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem.* 1998, 379, 137-47.
[36] Turk B., Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov.* 2006, 5, 785-99.
[37] Palermo C., Joyce J.A., Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2008, 29, 22-8.
[38] Tourasse N.J., Li W.H., Selective constraints, amino acid composition, and the rate of protein evolution. *Mol Biol Evol.* 2000, 17, 656-64.
[39] Lecaille F., Weidauer E., Juliano M.A., Bromme D., Lalmanach G., Probing cathepsin K activity with a selective substrate spanning its active site. *Biochem J.* 2003, 375, 307-12.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

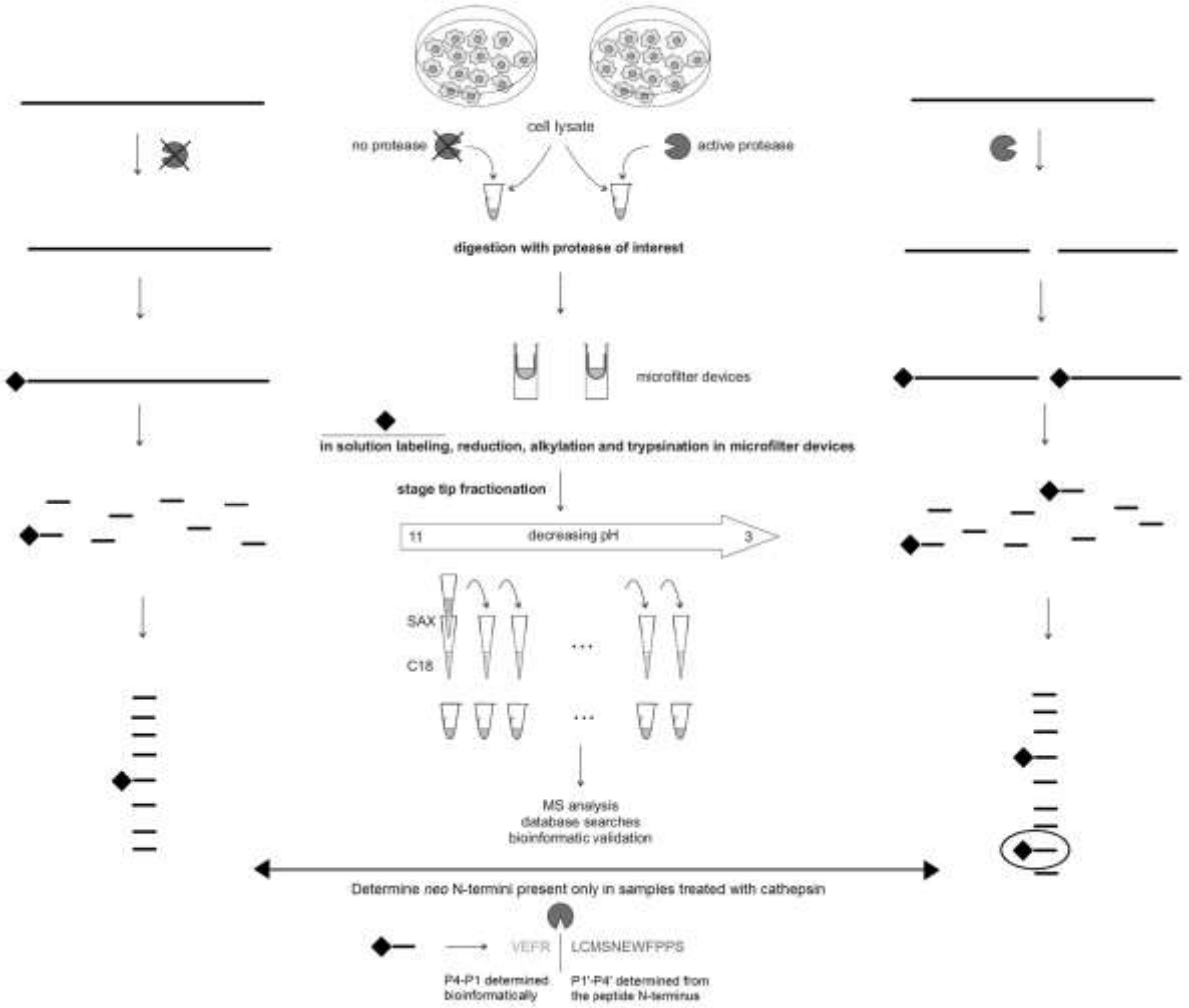
[40] Lecaille F., Chowdhury S., Purisima E., Bromme D., Lalmanach G., The S2 subsites of cathepsins K and L and their contribution to collagen degradation. *Protein Sci.* 2007, 16, 662-70.
[41] Dejica V.M., Mort J.S., Laverty S., Antoniou J. et al. Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2012, 14, R113.
[42] Shoulders M.D., Raines R.T., Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009, 78, 929-58.
[43] Vizcaíno J.A., Deutsch E.W., Wang R., Csordas A. et al. ProteomeXchange provides globally co-ordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat Biotechnol.* 2014, 30, 223-226.

Accepted Article

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 1. Outline of the FPPS method

The method combines in-solution sample labelling in microfilter devices with the Stage Tip sample separation protocol. In the first step, cells are lysed and a soluble lysate is treated with a recombinant cathepsin. Primary N-termini and neo-N-termini are trideutero-acetylated in order to be distinguished from internal peptides in later stages and proteins are then digested with trypsin according to standard procedures. Peptides are fractionated on SAX-C18 tips and analysed by LC-MS/MS, after which the lists of peptides identified in the negative control and in the sample treated with cathepsin are compared and only the neo-N-terminal peptides not present in the negative control are considered to result from cathepsin cleavage.

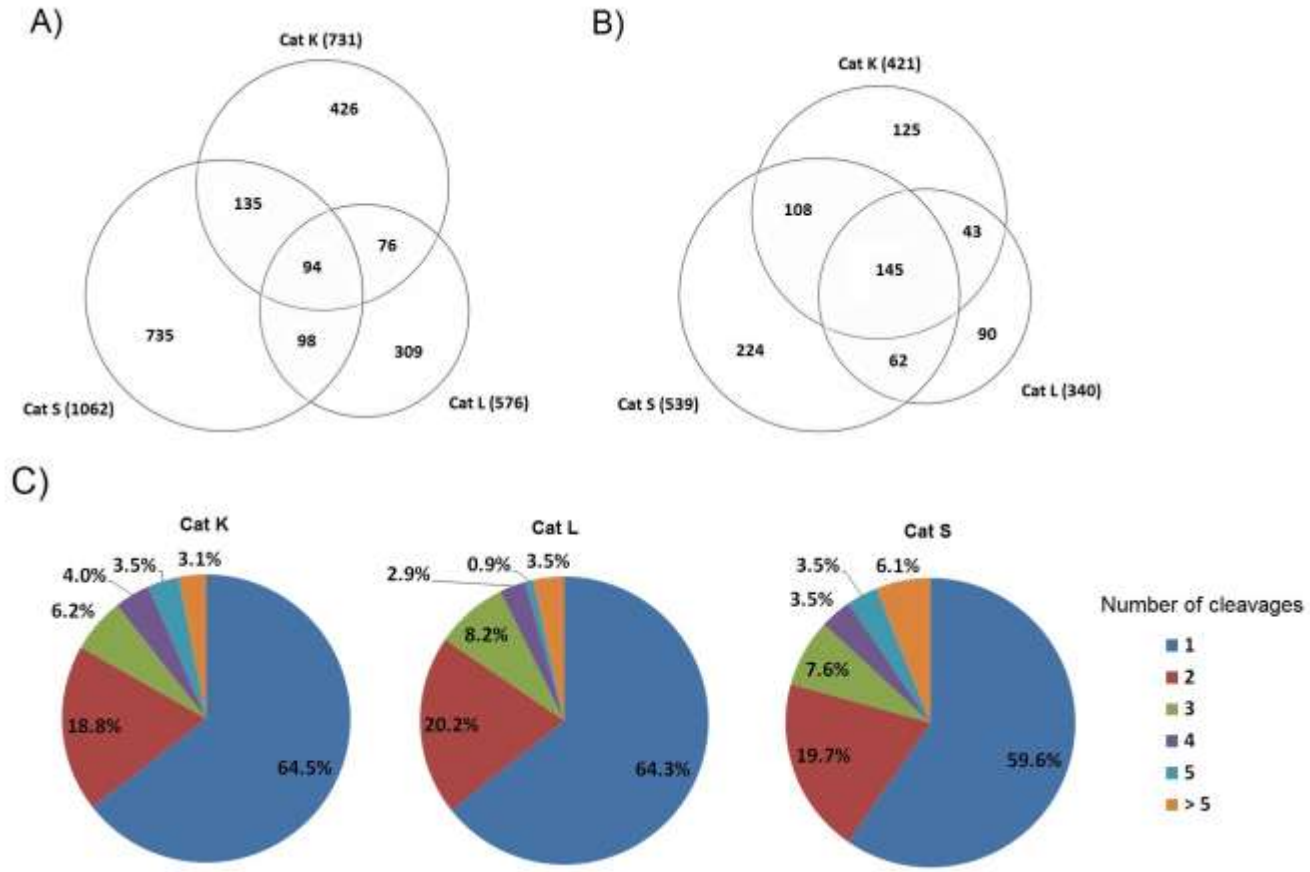


Accepted Article

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 2. Identified cathepsin cleavage sites and cleaved substrate proteins

Over 1,800 cleavage sites in more than 700 proteins were identified for cathepsins K, L and S. The Venn diagrams show the overlap of identified substrate proteins (A) and cleavage sites (B) between the three tested cathepsins. The pie charts indicate the fraction of substrate proteins with 1, 2, 3, 4, 5 or > 5 detected cleavage sites (C).

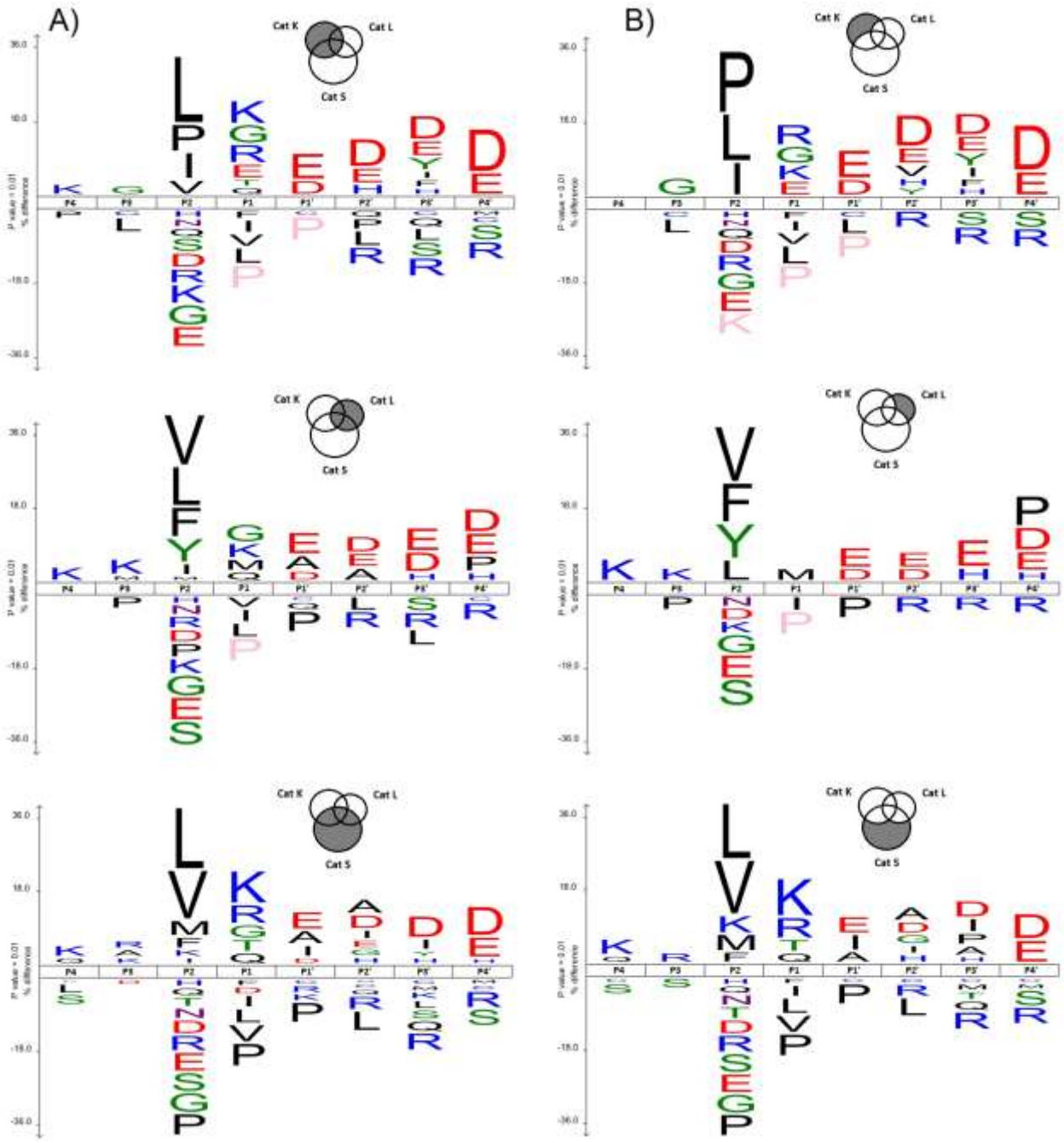


Accepted Article

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 3: IceLogos indicating the cleavage site specificity for cathepsins K, L and S after FPPS analysis.

IceLogos based on all (A) or unique (B) cleavage sites detected with cathepsin K, L and S. At each position surrounding the cleavage site, significantly under- and over-represented amino acids (p-value was set to 0.01) are shown as letters whose size corresponds to the percentage of difference with their average proteome occurrency. Residues shown in pink were never observed at that position.

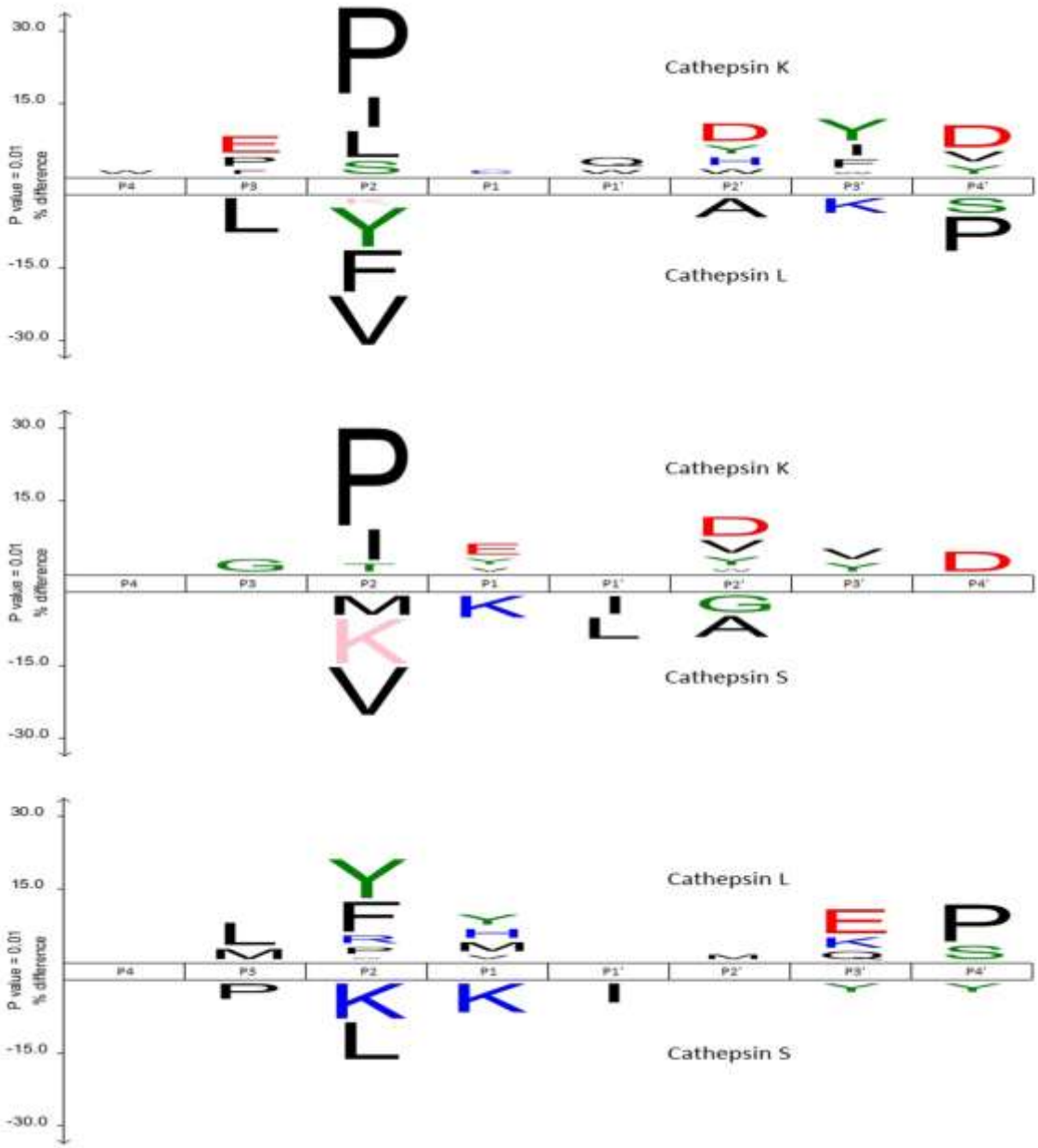


Accepted Article

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 4: Pairwise comparison of substrate preferences for cathepsin K, L and S detected with FPPS.

Cleavage sites specific for cathepsin K, L or S were used to generate iceLogos for direct comparaison of the cleavage site specificity. At each position surrounding the cleavage site, significantly under- and over-represented amino acids (p-value was set to 0.01) are shown as letters whose size corresponds to the percentage of difference with their average proteome occurrency. Residues shown in pink were never observed at that position.

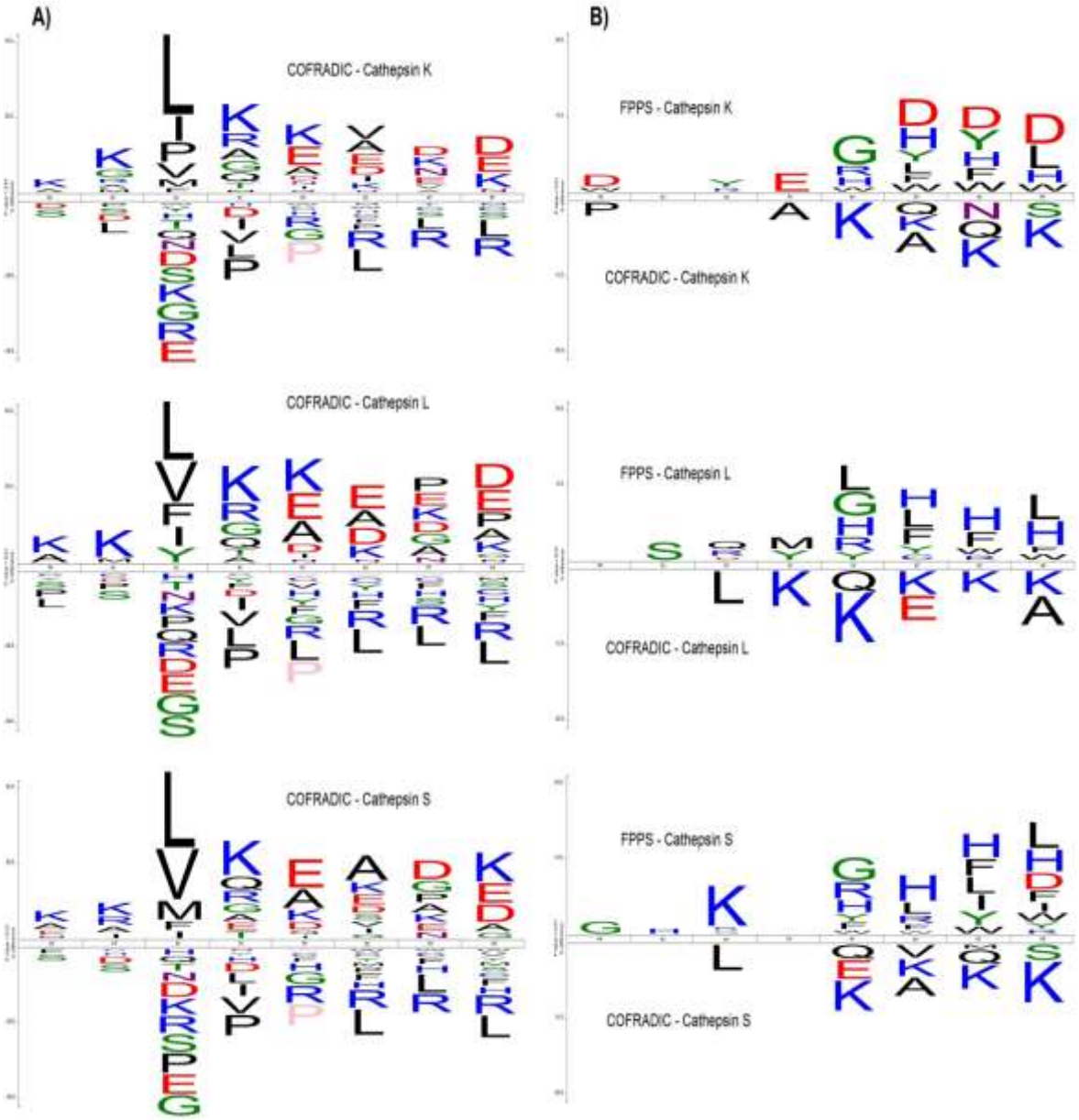


Accepted Article

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 5: Comparison of the cleavage site specificity detected with FPPS and COFRADIC.

IceLogos based on all cleavage sites detected with cathepsin K, L and S after N-terminal COFRADIC analysis. (B) Comparison between FPPS and COFRADIC data revealed almost identical substrate specificities in the P4 – P4' positions. At each position surrounding the cleavage site, significantly under- and over-represented amino acids (p-value was set to 0.01) are shown as letters whose size corresponds to the percentage of difference with their average proteome occurrency. Residues shown in pink were never observed at that position.



This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article