

VPLIV GLUKOZAMINA NA LOKALIZACIJO KATEPSINA C IN E TER CITOTOKSIČNOST CELIC NARAVNIH UBIJALK

Janja Božič

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija

Mentor: prof. dr. Veronika Stoka, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija
Somentor: dr. Iztok Dolenc, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. dr. Vito Turk, predsednik, MPŠ in Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija
prof. dr. Janko Kos, član, Institut »Jožef Stefan« in Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija
prof. ddr. Boris Turk, član, MPŠ in Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Janja Božič

VPLIV GLUKOZAMINA NA LOKALIZACIJO KATEPSINOV C IN E
TER CITOTOKSIČNOST NARAVNIH CELIC UBIJALK

Doktorska disertacija

ROLE OF GLUKOZAMINE ON THE LOCALIZATION OF CATHEPSIN
C AND E AND CYTOTOXICITY OF NATURAL KILLER CELLS

Doctoral Dissertation

Mentor: prof. dr. Veronika Stoka

Somentor: dr. Iztok Dolenc

Ljubljana, Slovenija, avgust 2018

Zahvala

Povzetek

Glukozamin (GlcN) je naravni derivat glukoze, ki se uporablja kot prehransko dopolnilo, največkrat za zmanjševanje bolečine pri osteoartritisu. Mehanizem delovanja GlcN na izboljšanje klinične slike pri osteoartritisu še vedno ni dokazan, prav tako pa še niso raziskani mehanizmi delovanja GlcN na druge celične vrste. V tej doktorski nalogi smo raziskovali učinek GlcN na celice naravne ubijalke (NK celice), imunske celice, ki so prva obramba telesa proti rakastim in z virusi okuženim celicam. Pokazali smo, da GlcN zniža citotoksičnost NK celic in da je ta inhibicija reverzibilna ter odvisna od koncentracije. GlcN doseže znižanje citotoksičnosti s spremembo razporeditve katepsina C in hkrati zmanjša njegovo aktivnost v celici, ki pa je posledica izločanja katepsina C iz celice. Podobno spremembo v lokalizaciji smo opazili tudi pri katepsinu E. V nadaljevanju smo pokazali, da katepsin C in katepsin E nista kolokalizirana in da se katepsin E ne nahaja v citotoksičnih granulah, tako kot katepsin C. Glavni vzrok za znižanje citotoksičnosti NK celic pa ni v spremembi lokalizacije samih katepsinov, pač pa v spremembi razporeditve citotoksičnih granul. GlcN namreč prepreči polarizacijo NK celic tako, da vpliva na signalne poti, ki kontrolirajo premikanje granul. Pokazali smo, da GlcN podaljša fosforilacijo ERK kinaze in s tem sproži njen premik v jedro, kjer kinaza deluje na druge substrate kot v citosolu. Vzrok za podaljšano fosforilacijo ERK kinaze je v znižani fosforilaciji transkripcijskega faktorja FOXO1, ki je regulator ERK kinaze. GlcN, poleg znižane fosforilacije FOXO1, zviša nivo njegove O-glikozilacije. Podoben vpliv ima GlcN tudi navzdol v signalni poti ERK kinaze, in sicer na paksilin. Paksilin je adapterski protein, ki je direktni substrat ERK kinaze in kontrolira premih granul. GlcN zniža fosforilacijo paksilina in zviša njegovo O-glikozilacijo, kar vpliva na polarizacijo granul. Dodatno smo pokazali, da TNF α , citokin, ki ga sproščajo NK celice, ne vpliva na njihovo citotoksičnost. Prav tako ne vpliva na viabilnost NK celic niti na viabilnost tarčnih K562 in U937 celic. TNF α je vplival na viabilnost U937 celic le ob dodatku CHX. Pri skupnem delovanju TNF α in CHX povzroči apoptozo U937 celic, med katero pride do poškodb lizosomov ter izpusta njihove vsebine in postopne razgradnje endogenega inhibitorja cisteinskih katepsinov stefina B. Naši rezultati kažejo, da GlcN vpliva na aktivacijo signalne poti NK celic in s tem na imunosupresijo NK celic, ter da TNF α nima povratnega učinka na citotoksičnost NK celic.

Abstract

Glucosamine (GlcN) is a naturally occurring derivative of glucose and an over-the-counter food additive. However, the mechanism underlying GlcN action on cells is unknown. In this doctoral dissertation, we investigated the effect of GlcN on natural killer (NK) cells. We showed that GlcN decreases NK cell cytotoxicity in a dose-dependent manner and that this inhibition is reversible. We demonstrated that GlcN affects NK-92 cell cytotoxicity by altering the distribution of cathepsin C, a cysteine protease required for granzyme processing in cytotoxic granules. The relocation of cathepsin C due to GlcN was shown to be accompanied by a decrease in the intracellular enzyme activity and its extracellular secretion. Similarly, the relocation of endosomal aspartic cathepsin E was observed. Furthermore, we elucidated that repositioning of cathepsin C is a consequence of altered signaling pathways of cytotoxic granule movement. The inhibition of phosphorylation upstream and downstream of ERK by GlcN disturbed the polarized release of cytotoxic vesicles. Considerable changes in the ERK phosphorylation dynamics, but not in those of p38 kinase or JNK, were observed in the IL2-activated NK-92 cells. GlcN causes prolonged phosphorylation of ERK kinase, as well as its nuclear translocation, which changes its substrates. The prolonged ERK phosphorylation is a consequence of decreased phosphorylation of the transcription factor FOXO1, an upstream negative regulator of ERK phosphorylation. Similarly, a protein downstream of the ERK phosphorylation cascade, paxillin, was less phosphorylated, resulting in a diffuse distribution of cytotoxic granules. Additionally, we showed that TNF α , a cytokine released by NK cells, has no effect on NK cell cytotoxicity, neither on the viability of NK, K562, nor U937 cells. Furthermore, TNF α effect U937 only in combination with CHX, an inhibitor of the proteasome. Apoptosis of K562 cells by TNF α /CHX causes the release of cathepsins from lysosomes and stepwise degradation of endogenous cysteine cathepsin inhibitor stefin B. Taken together, our results suggest that dietary GlcN affects signaling pathway activation of NK-92 immune cells and that TNF α has no effect on NK cell cytotoxicity.

Kazalo

Slike	xiii
Tabele	xv
Kratice	xvii
1 Uvod	1
1.1 Imunski sistem.....	1
1.1.1 Prirojeni imunski odziv	2
1.2 Celice naravne ubijalke (NK celice)	2
1.2.1 Proces citotoksičnosti	3
1.2.1.1 Stopnja prepoznave.....	3
1.2.1.2 Efektorska stopnja	4
1.2.1.2.1 Signalne poti, ki privedejo do migracije citotoksičnih granul	5
1.2.1.2.2 Citotoksične granule	5
1.2.1.2.2.1 Grancimi	6
1.2.1.2.2.2 Perforin	6
1.2.1.3 Zaključna stopnja.....	6
1.2.1.4 Smrt tarčne celice.....	6
1.2.2 Sproščanje citokinov	7
1.3 Apoptoza	8
1.3.1 Zunanja (ekstrinzična) pot	8
1.3.2 Notranja (intrinzična) pot	8
1.3.3 Apoptoza povzročena preko perforina in grancimov	9
1.4 Proteaze	10
1.4.1 Cisteinske proteaze.....	10
1.4.1.1 Cisteinski katepsini	10
1.4.1.2 Cisteinski katepsini v celicah naravnih ubijalkah.....	11
1.4.1.2.1 Katepsin C.....	12
1.4.2 Aspartatne proteaze	13
1.4.2.1 Aspartatni katepsini.....	14
1.4.2.1.1 Katepsin D	14
1.4.2.1.2 Katepsin E.....	15
1.5 Glukozamin.....	16
2 Namen dela	21
3 Materiali in metode	23
3.1 Materiali	23
3.1.1 Laboratorijska oprema	23
3.1.2 Kemikalije in reagenti	24
3.1.3 Pufri in gojišča.....	25
3.1.4 Protitelesa.....	27
3.1.4.1 Primarna protitelesa.....	27
3.1.4.2 Sekundarna protitelesa	27
3.1.5 Rekombinantni katepsini	27
3.1.6 Sesalske celične kulture	27

3.2	Metode.....	28
3.2.1	Celične kulture	28
3.2.1.1	Gojenje celičnih linij	28
3.2.1.2	Primarne mišje NK celice	28
3.2.1.2.1	Dovoljenje etične komisije za delo z mišmi.....	28
3.2.1.2.2	Priprava primarnih NK celic.....	28
3.2.2	Meritve na pretočnem citometru	28
3.2.2.1	Test citotoksičnosti NK celic	28
3.2.2.2	Določanje deleža apoptotskih celic	29
3.2.2.3	Določanje deleža celic s poškodovanimi lizosomi	29
3.2.3	Priprava celičnih lizatov in analiza proteinov	29
3.2.3.1	Priprava totalnih celičnih lizatov	29
3.2.3.2	Priprava jedrnih in citosolnih celičnih lizatov	29
3.2.3.3	Določanje koncentracije proteinov v vzorcu	30
3.2.3.4	Imunoprecipitacija.....	30
3.2.3.5	Določanje tipa N-glikozilacije proteinov.....	30
3.2.3.6	Merjenje aktivnosti katepsinov	31
3.2.3.7	Ločevanje proteinov na NaDS-PAGE	31
3.2.3.8	Prenos po Westernu in imunodetekcija proteinov	31
3.2.4	Imunocitokemija	32
3.2.5	Fluorescentna konfokalna mikroskopija.....	32
3.2.5.1	Analiza mikroskopskih slik	32
3.2.6	Statistična analiza	32
4	Rezultati	33
4.1	Glukozamin zmanjša citotoksičnost NK-92 celic	33
4.2	Vpliv glukozamina na katepsin C in E	34
4.2.1	Vpliv glukozamina na aktivnost katepsinov.....	34
4.2.2	Glukozamin ne vpliva na spremembo tipa N-glikozilacije	36
4.2.3	Lokalizacija katepsina C in katepsina E v NK-92 celicah in vpliv GlcN na njuno lokalizacijo	36
4.3	Glukozamin prepreči polarizacijo granul v NK celicah	39
4.3.1	Glukozamin podaljša čas fosforilacije ERK kinaze	41
4.3.2	Glukozamin povzroči premestitev fosforilirane ERK kinaze v jedro	43
4.3.3	Glukozamin vpliva na fosforilacijo FOXO1 in paksilina	45
4.4	Vpliv TNF α na citotoksičnost NK-92 celic in na celično smrt U937	46
4.4.1	TNF α ne vpliva na citotoksičnost NK-92 celic	46
4.4.2	TNF α skupaj s cikloheksimidom (CHX) povzroči apoptozo U937	47
4.4.2.1	Apoptoza povzročena s TNF α povzroči poškodbe na lizosomih in sprostitve katepsina D v citoplazmo.....	48
4.4.2.2	Med apoptozo sproženo s TNF α pride do razgradnje stefina B	48
5	Razprava	51
6	Zaključki	59
	Literatura	61
	Bibliografija	75
	Biografija	76

Slike

Slika 1: Komponente prirojenega in pridobljenega imunskega sistema.....	1
Slika 2: Proces citotoksičnosti celic naravnih ubijalk.	3
Slika 3: Shema signalnih poti, ki privedejo do polarizacije NK celic.	5
Slika 4: Delovanje grancimov v tarčni celici.	7
Slika 5: Notranja in zunanja pot apoptoze.	9
Slika 6: 3D shematski prikaz vezavnih mest substrata v aktivno mesto papainu podobnih proteaz.....	11
Slika 7: Shematski prikaz regulacije citotoksičnosti NK celic s katepsini.....	12
Slika 8: Tetramerna struktura katepsina C.....	13
Slika 9: Mehanizem katalize aspartatnih proteaz.	14
Slika 10: Tridimenzionalna struktura katepsina D.....	15
Slika 11: Kristalna struktura intermediatne oblike katepsina E.	16
Slika 12: Shematični prikaz domnevnega mehanizma glukoamina na rakaste celice.	19
Slika 13: Postopek frakcionacije celic po REAP metodi.....	30
Slika 14: GlcN zmanjša citotoksičnost NK-92 celic proti K562 celicam.	33
Slika 15: Reverzibilen efekt GlcN na zmanjšanje citotoksičnosti NK-92 celic proti K562 celicam.....	34
Slika 16: Katepsinska aktivnost v celičnih lizatih. V NK-92 celicah aktiviranih z IL-2, v kontroli ali celicah z dodanim 5mM GlcN, smo izmerili aktivnost katepsina C, E in cisteinskih katepsinov s tremi različnimi fluorogeni substrati. Rezultati so prikazani kot sprememba glede na kontrolo.	34
Slika 17: Vpliv GlcN na aktivnost rekombinantnih katepsinov.....	35
Slika 18: Aktivnost katepsina C v mediju NK2 celic.	35
Slika 19: Imunodetekcija Katepsina E in C v aktiviranih NK-92 celicah.	36
Slika 20: Vpliv prisotnosti GlcN v mediju na tip N-glikozilacije v NK-92 celicah.....	36
Slika 21: Vpliv GlcN na lokalizacijo katepsina C in katepsina E v NK-92 celicah.....	38
Slika 22: GlcN vpliva na polarizacijo citotoksičnih granul proti tarčni celici.	40
Slika 23: Delež polariziranih NK-92 celic.	41
Slika 24: Imunodetekcija prforina kaže količino perforina v celičnih lizatih z ali brez GlcN.....	41
Slika 25: Časovna odvisnost aktivacije NK-92 celic z IL-2 ter vpliv prisotnosti GlcN na fosforilacijo MAP kinaz.....	42
Slika 26: Denzitometrično določevanje fosforilacije MAP kinaz.	43
Slika 27: GlcN povzroči premik p-ERK v jedro.	44
Slika 28: Vpliv GlcN na razmerje med p-ERK v jedru in p-ERK v citoplazmi aktiviranih NK-92 celic.....	44
Slika 29: Imunodetekcija p-ERK in ERK v jedrnih in citosolnih lizatih celic NK-92, ki so rastle brez prisotnosti GlcN (-) ali v prisotnosti GlcN (+).....	45
Slika 30: Vpliv GlcN na delež fosforilirane oblike FOXO1.	45
Slika 31: Vpliv GlcN na delež fosforilirane oblike paksilina.	46
Slika 32: Vpliv TNF α na citotoksičnost NK-92 celic.....	46
Slika 33: Vpliv TNF α na NK-92, U937 in K562 na viabilnost celičnih linij.	47
Slika 34: TNF α v kombinaciji s CHX sproži apoptozo celične linije U937.....	47
Slika 35: Vpliv TNF α /CHX na integriteto lizosomov v celicah U937.	48
Slika 36: Imunodetekcija katepsina D v celičnih lizatih U937 celic med apoptozo sproženo s TNF α /CHX.	48

Slika 37: Imunodetekcija katepsina D v totalnih lizatih U937 celic pri različnih časih tretiranja celic s $\text{TNF}\alpha$ /CHX. 49	
Slika 38: Shematični prikaz vpliva GlcN na polarizacijo citotoksičnih granul NK-92 celic.	56
Slika 39: Poenostavljen mehanizem apoptoze sprožene s $\text{TNF}\alpha$ /CHX v celicah U937.	58

Tabele

Tabela 1: Receptorji NK celic (Pegram in sod., 2011).	4
Tabela 2: Substrati grancimov.....	7
Tabela 3: Mehanizmi na katere vpliva glukozamin pri raku.	18

Kratice

AD	..	atopični dermatitis
AO	..	osteoartritis
Bid	..	protein smrti, ki reagira z BH-3
BSA	..	goveji serumski albumin
CD	..	označevalec pripadnosti
CHX	..	cikloheksimid
CLR	..	lektinski receptorji tipa C
SMAC	..	drugi mitohondrijski aktivator kaspaz
DAMP	..	molekulski motivi stresnih molekul
DC	..	dendritične celice
DiOC18	..	3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanine Perchlorate
DMEM	..	po Dulbeccu spremenjeno gojišče Eagle
DMSO	..	dimetil sulfoksid
DNA	..	deoksiribonukleinska kislina
DTT	..	ditiotreitol
EGF	..	epidermalni rastni faktor
ER	..	endoplazemski ritikulum
FADD	..	na Fas vezan protein z domeno smrti
FasL	..	Fas ligand
FOXO	..	ang. Forkhead box O
GlcN	..	glukozamin
GlcNAc	..	N-acetil glukozamin
GM-CSF	..	granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči faktor

HRP	..	hrenova peroksidaza
HSP	..	protein vročinskega šoka
ICAD	..	inhibitor CAD
IFN	..	interferon
IL	..	interleukin
IQGAP	..	protein, ki je podoben proteinu, ki aktivira Ras GTPazo
IS	..	imunološka sinapsa
JNK	..	C-Jun N-terminalna kinaza
KIR	..	ubijalski imunoglobulinu podobni receptorji
LFA-1	..	antigen, ki je povezan z limfocitno funkcijo 1
MAP kinaza	..	Kinaza, ki jo aktivira mitogen
MHC	..	poglavitni sistem tkivne skladnosti
MOMP	..	permeabilizacija zunanje membrane mitohondrija
MTOC	..	center, ki organizira mikrotubule
NaDS- PAGE	..	natrijeva dodecil sulfatna poliakrilamidna gelska elektroforeza
NK celice	..	celice naravne ubijalke
NLR	..	NODu podobni receptorji
OA	..	osteoarthritis
p38	..	z mitogenom aktivirana kinaza
PAMP	..	molekulski motivi patogenih mikroorganizmov
PARP	..	poliADP-riboza polimeraza
PBS	..	Fosfatni pufer z NaCl
PCS	..	Programirana celična smrt
PI	..	propidijev jodid
PI3K	..	fosfoinozimid 3-kinaza
PLC	..	fosfolipaza C
pNK	..	primerne NK celice
SMAC	..	drugi mitohondrijski aktivator kaspaz
RNA	..	ribonukleinska kislina

ROS	..	reaktivne kisikove zvrsti
	.	
RPMI 1640	..	Roswell Park Memorial Institute medij
	.	
SD	..	standardna deviacija
	.	
SDS	..	natrijev dodecil silfat
	.	
tBid	..	cepljena oblika molekule bid
	.	
TLR	..	receptorji podobni Toll receptorju
	.	
TNF	..	dejavnik tumorske nekroze
	.	
TRAIL	..	TNFi podoben ligand, ki sproža apoptozo
	.	
Vav 1	..	pro onkogenska vav kinaza
	.	

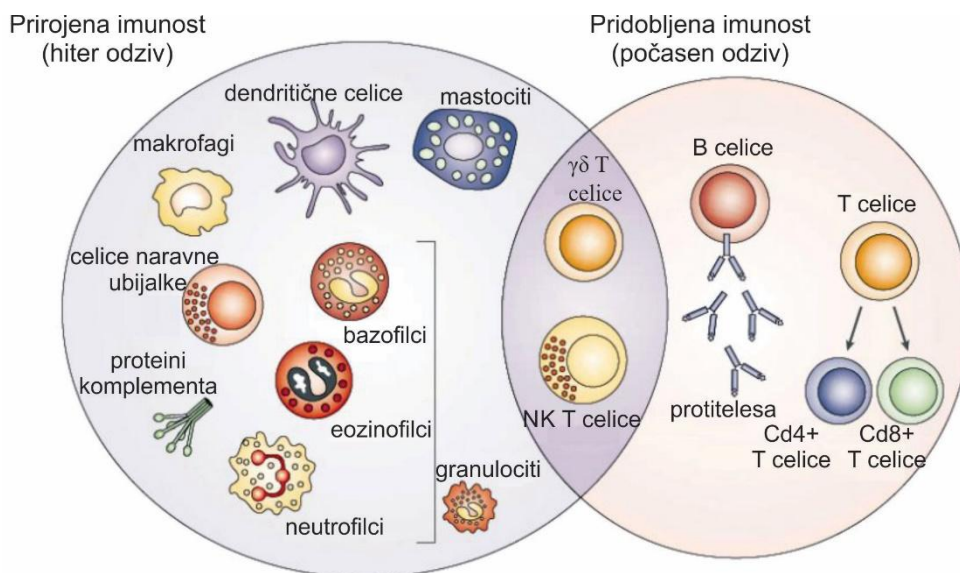
Poglavje 1

Uvod

1.1 Imunski sistem

Imunski sistem (beseda izhaja iz latinske besede *immunis*, kar pomeni prost ali nedotaknjen) je nujno potreben za naše preživetje, saj smo v okolju vedno izpostavljeni različnim patogenom. Sistem sestavlja interaktivna mreža limfoidnih organov, celic, humoralnih faktorjev in citokinov, ki nas ščitijo pred tujki, kot so patogene bakterije, alergeni in toksične snovi. Glavna naloga imunskega sistema je hitra prepoznava tujka, zaustavitev njegovega delovanja in optimalna odstranitev. Imunski sistem je poleg živčnega sistema najbolj kompleksen in natančno reguliran sistem človeškega telesa (Delves in Roitt, 2000; Parkin in Cohen, 2001).

Imunski sistem delimo glede na hitrost in specifičnost reakcije na dve veji: prirojeni odziv in pridobljeni odziv (Parkin in Cohen, 2001). Začel se je razvijati že pri zgodnjih oblikah življenja, kot so protozoje, ki že imajo receptorje, ki ločijo med lastnim in tujim. Prirojeni imunski odziv je tako prisoten pri vseh živalskih vrstah in je evolucijsko zelo ohranjen. Za razliko od prirojenega, se je pridobljeni imunski odziv začel razvijati na nivoju primitivnih vretenčarjev (Buchmann, 2014). Prirojeni odziv je hitrejši od pridobljenega, vendar je slabše specializiran in manj specifičen. Pri obrambi pred tujki se oba sistema prepletata in dopolnjujeta in tako organizmu zagotavljata učinkovito obrambo (Parkin in Cohen, 2001).



Slika 1: Komponente prirojenega in pridobljenega imunskega sistema. Prirojena imunost deluje kot prva linija obrambe pred tujki in je sestavljena iz proteinov komplementa in različnih celic, kot so granulociti, mastociti, makrofagi, dendritične celice in celice naravne ubijalke. Pridobljena imunost se razvije počasneje, vendar je na račun tega zelo specifična in ima spomin. Pridobljena imunost je sestavljena predvsem iz protiteles, B celic in T celic. T celice predstavljajo most med obema sistemoma (Dranoff, 2004).

1.1.1 Prirojeni imunski odziv

Prirojeni imunski sistem ima vlogo zaznavanja in zagotavljanja obrambe v prvih fazah okužbe. Receptorji prirojenega imunskega sistema prepoznajo osnovne molekulske motive patogenih mikroorganizmov (PAMP), ki so splošno izraženi na patogenih ali na okuženih celicah, in molekulske motive stresnih molekul (DAMP) (Medzhitov, 2007). Ko ti motivi aktivirajo receptorje, pride do kaskade dogodkov, ki sprožijo proizvodnjo mediatorjev obrambe imunskih in ne-imunskih celic. Mediatorji obrambe primarnega imunskega sistema so citokini, ki se vežejo na specifične receptorje na celicah ter sprožijo znotrajcelične signalne poti in povzročijo biološki efekt. V prirojeni imunosti so ti citokini interferoni, IL-12, TNF, IL-6 in IL-18. Glavni receptorji pridobljenega imunskega odziva so membranski receptorji iz TLR skupine in CLR skupine. Poleg membranskih receptorjev pri prepoznavi pomagajo še citosolni receptorji in receptorji vnetja (skupina receptorjev NLR). Med citosolne receptorje spadajo receptorji, ki zaznavajo virusno RNA (RLRji) in receptorji, ki zaznavajo virusno DNA (DDX41, DAI, IFI16, cGAS and LRRFP1). Po zaznavi ti receptorji sprožijo različne poti in privedejo do povišanega izražanja interferonov in vnetnih citokinov (Biorn, 2016). Pomemben del prirojenega imunskega odziva je tudi komplement. Komplement je sistem proteinov v plazmi, ki ob interakciji s patogeni sproži kaskado reakcij, kar privede do vnetnega odziva ali pa označitve patogenov za odstranitev z makrofagi. Pri delovanju prirojenega imunskega sistema pomagajo različne celice, ključni pa so monociti, makrofagi, dendritične celice, eozinofilci, mastociti in celice naravne ubijalke (NK celice) (Biorn, 2016; Parkin in Cohen, 2001).

Monociti so tip krvnih mononuklearnih fagocitov z zelo različnimi funkcijami. Monociti se lahko diferencirajo v makrofage, dendritične celice ali vnetne monocite, lahko pa ostanejo nespremenjeni v tkivih ali pa potujejo v limfne žleze. V prirojeni imunosti imajo pomembno vlogo, saj lahko proizvajajo TNF in dušikov oksid, ki sta pomembna za resolucijo vnetja (t.j. mehanizem, ki vnetje konča in sproži popravilne procese z odstranitvijo vnetju prizadetih celic) (Jakubzick in sod., 2017). Makrofagi so velike fagocitne celice, ki izvirajo iz krvnih monocitov. Njihova posebnost je izredna heterogenost, kar privede do različnih bioloških vlog, ki so pogojene z okoljem v katerem se nahajajo. Makrofage na grobo delimo v dva podtipa, M1 in M2 makrofage. M1 makrofagi imajo povečano izražanje vnetnih citokinov in jih imenujemo tudi vnetni makrofagi, medtem ko imajo M2 makrofagi protivnetne lastnosti. V naravi v organizmu ne najdemo samo teh dveh skrajnih tipov, ampak široko paleto makrofagov z lastnostmi med M1 in M2 tipom. Makrofagi na svoji površini izražajo receptorje, ki lahko ločijo med tujimi in lastnimi determinantami in tako prepoznajo patogene, ki jih fagocitirajo. V vnetnem odzivu imajo pomembno vlogo tudi pri odstranjevanju nekrotičnih in apoptotičnih celic (Parihar in sod., 2010). Povezavo med prirojenim in pridobljenim imunskim sistemom predstavljajo dendritične celice (DC) in eozinofilci. DC so levkociti, katerih glavna naloga je predstavitev antigenov na njihovi površini, zato jih imenujemo tudi specializirane antigen predstavitvene celice. Za prirojeno imunost so DC pomembne, ker imajo zmožnost odziva na sprožen imunski odziv, saj izražajo receptorje za zaznavo mikrobnih motivov ter lahko prevzamejo antigen in ga nato predstavijo na svoji površini. Poleg tega lahko migrirajo do mesta okužbe, kjer se aktivirajo in nato preidejo v bezgavke (Mellman, 2013). Eozinofilci prav tako spadajo med levkocite, vendar so ti v krvi zastopani v nizkem številu. Osnovna funkcija eozinofilcev je izločanje toksičnih proteinov in prostih radikalov, ki ubijejo patogene. Raziskave so pokazale, da granule eozinofilcev vsebujejo tudi kemokine, citokine in rastne hormone, ki so vključeni v regulacijo imunskega mikrokolja, vnetnega odziva in tkivnega ravnovesja in preoblikovanja (Shamri in sod., 2011). Mastociti imajo podobno funkcijo kot eozinofilci. Na svoji površini imajo širok spekter receptorjev prirojenega imunskega odziva, ki tujek zelo hitro prepoznajo in sprožijo vnetni proces. Poleg teh receptorjev imajo tudi visoko afinitetne receptorje za IgE, ki imajo vlogo pri alergijah. Pomembno vlogo pri prirojeni imunosti igrajo tudi NK celice, ki so prva obramba proti virusnim okužbam in pri rakastih celicah. NK celice za razliko od ostalih celic v prirojeni imunosti napadajo stresne celice, ki so okužene ali transformirane in ne samih patogenov.

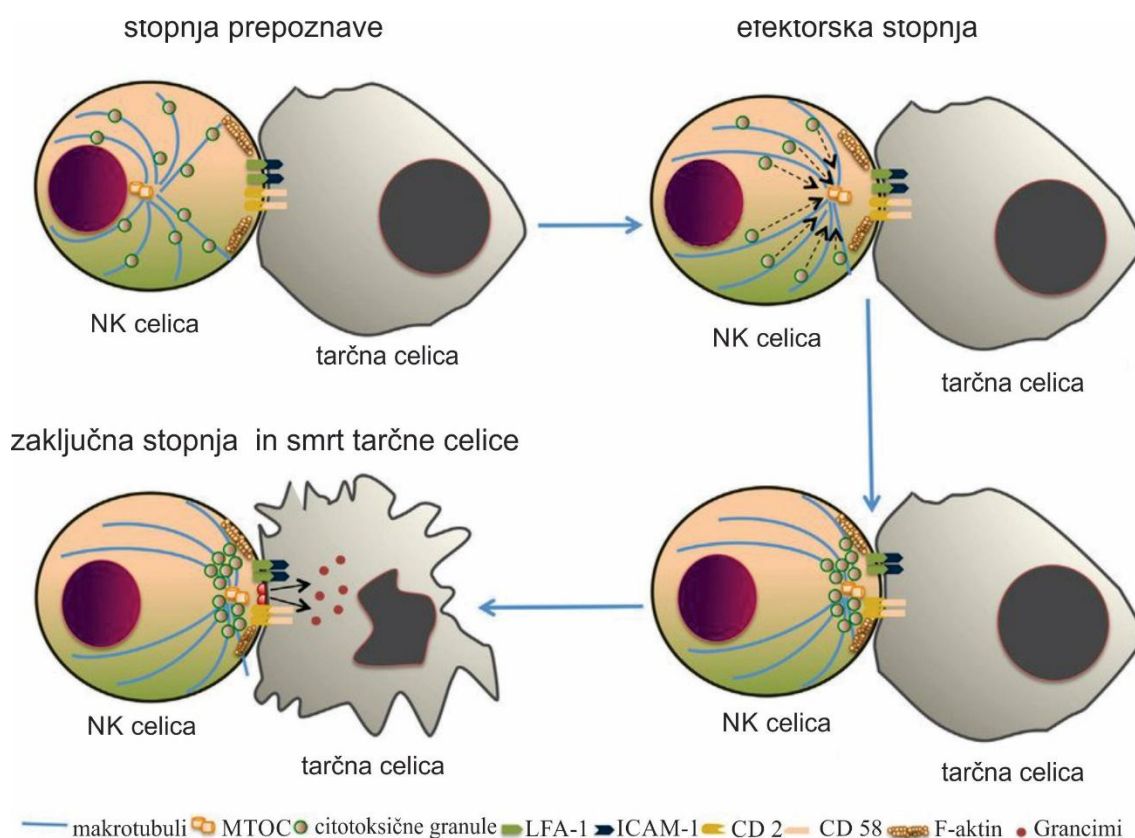
1.2 Celice naravne ubijalke (NK celice)

NK celice so del prirojenega imunskega sistema, ki imajo zmožnost lize tarčnih celic in so hkrati tudi zgodnji vir imunoregulatornih citokinov. Populacija NK celic predstavlja 15 % celotne

populacije limfocitov. Pri ljudeh jih fenotipsko od ostalih limfocitov ločimo po izraženem CD56 in po odsotnem izražanju CD3 (Robertson in Ritz, 1990). Človeške NK celice lahko delimo na dve podskupini, ki ju ločimo glede na gostoto izražanja CD56 na celični površini, na CD56bright in na CD56dim NK celice. Ti dve podskupini imata različne fenotipske in funkcionalne lastnosti, ki prispevajo tudi k različni vlogi v imunskem odzivu. CD56dim NK celice so bolj citotoksične in izražajo višje nivoje receptorjev podobnih Ig in receptorja CD16. Naloga CD56bright NK celic pa je izražanje velikih količin citokinov, ki naprej aktivirajo monocite (Cooper in sod., 2001).

1.2.1 Proces citotoksičnosti

Glavna naloga NK celic je obramba pred celicami, ki so okužene z virusi in rakastimi celicami. To obrambo NK celice izvedejo s pomočjo svoje efektorske funkcije, kjer se po prepoznavi tarčne celice med njo in NK celico tvori imunološka sinapsa (IS), v katero se sprosti vsebina citotoksičnih granul. Citotoksične granule so veliki specializirani sekretorni vezikli NK celic, ki vsebujejo toksične efektorske molekule. Proces citotoksičnosti je natančno reguliran proces, ki ga lahko razdelimo na tri stopnje: stopnja prepoznave, efektorska stopnja in zaključna stopnja (Mace in sod., 2014).



Slika 2: Proces citotoksičnosti celic naravnih ubijalk. Citotoksičnost NK celic je natančno reguliran proces najprej pride do stopnje prepoznave, kjer se celici prepoznata in se tvori imunološka sinapsa. V efektorski stopnji pride do fokusiranja citotoksičnih granul in MTOC proti tarčni celici. V zaključni stopnji pa pride do sprostitve vsebine granul, smrti tarčne celice in regeneracije NK celice (Paul in Lal, 2017).

1.2.1.1 Stopnja prepoznave

NK celice pri svojem raziskovanju in iskanju tarčnih celic pridejo v kontakt z mnogimi različnimi celičnimi tipi. Kaj je odgovorno, da pridejo celice v kontakt ni znano, vendar ko so v kontaktu nastopi prepoznavanje preko receptorjev. NK celice nimajo specializiranih antigen specifičnih receptorjev, ampak na svoji površini izražajo aktivacijske in inhibitorne receptorje. Ti receptorji

določajo, ali bo prišlo do aktivacije NK celic, ali ne. V literaturi sta omenjena dva načina aktivacije: »missing self« in »induced self«. Pri prvem načinu NK celice napadejo tarčne celice, ki na svoji površini ne izražajo poglobitnega sistema tkivne skladnosti I (MHC razreda I), ki je pri zdravih celicah po navadi izražen. Drugi, »induced self« način aktivacije opisuje aktivacijo NK celic po prepoznavi celičnih stresnih ligandov, ki se izrazijo na površini tarčne celice po maligni transformaciji ali virusni okužbi (Pegram in sod., 2011). Glavne skupine receptorjev človeških NK celic in njihove funkcije so opisane v tabeli 1. Če receptorji prepoznajo celico kot tarčo, se interakcija med NK in tarčno celico okrepi, pri čemur pomagajo adhezijske molekule kot je LFA-1 (antigen 1 povezan z limfocitno funkcijo). Po adheziji celic se začne tvorjenje aktivacijske IS, ki se naprej nadaljuje v efektorski stopnji.

Tabela 1: Receptorji NK celic (Pegram in sod., 2011).

Skupina receptorjev	Značilnosti
<i>Družina KIR receptorjev</i>	Ubijalski imunoglobulinu podobni receptorji (KIR receptorji) so tip 1 transmembranski glikoproteini z dvema ali tremi Ig podobnimi domenami in imajo citoplazemski rep. KIR receptorji so lahko inhibitorni ali aktivacijski in prepoznavajo molekule MHC razreda I in njim podobne molekule.
<i>CD94-NKG2 heterodimerni receptorji</i>	CD94-NKG2 heterodimerni receptorji so iz družine lektinov tipa C. Ti receptorji prepoznajo ne-klasične MHC molekule, HLA-E in naj bi preprečevali neustrezno aktivacijo NK celic. Tudi ti receptorji so lahko tako inhibitorni kot tudi aktivacijski.
<i>NKG2D receptor</i>	NKG2D receptor je strukturno le malo podoben družini NKG2 receptorjev, saj je izražen kot homodimer in ne tvori heterodimerov s CD94. Je izključno aktivacijski receptor, ki veže molekule povezane s stresnim odzivom, te pa so velikokrat izražene v rakastih celicah.
<i>Receptorji naravne citotoksičnosti</i>	Spadajo v s družino Ig receptorjev in so izključno aktivacijski receptorji. V to skupino spadajo NKp46, NKp80 in NKp30, ki so stalno izraženi in pa NKp44, ki se izrazi po aktivaciji z IL-2. Glavni ligandi teh receptorjev so virusni hemaglutinini.
<i>Levkocitni imunoglobulinom podobni receptorji</i>	So inhibitorni receptorji, ki vežejo molekule MHC razreda I. Njihova vloga ni povsem znana, po navadi prevladujejo drugi inhibitorni receptorji NK celic.

1.2.1.2 Efektorska stopnja

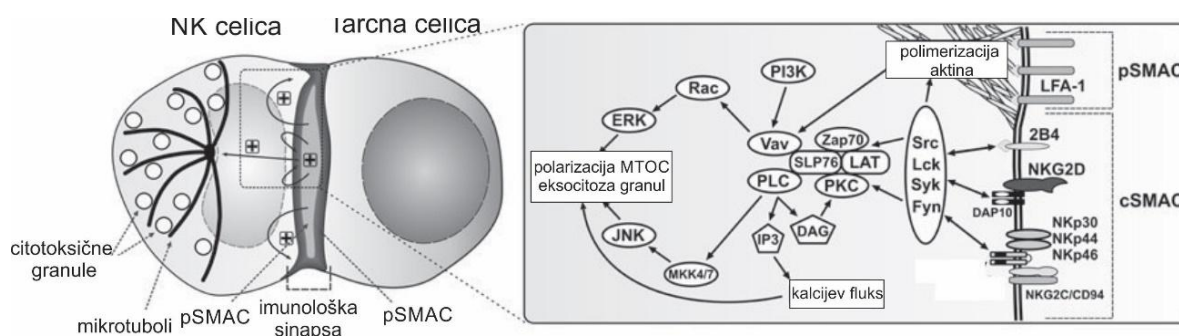
Na začetku efektorske stopnje pride do polimerizacije in reorganizacije F-aktina in končne formacije stabilne IS. Pomemben del te faze je aktivacija kaskade kinaz, ki privedejo do premikanja citotoksičnih granul do IS. Ta proces se najprej začne s premikanjem granul po mikrotubulah do centra, ki organizira mikrotubule (MTOC), nato pa MTOC skupaj z granulami polarizira do sinapse. Fuzija med membrano granul in celično membrano omogoči sprostitvev toksične vsebine granul v IS (Orange, 2008). Glavne efektorske molekule, ki se sprostijo, so

perforin in grancimi. Prvi polimerizira na membrani tarčne celice v cilindrične pore in tako naredi pore v membrani in omogoči vstop grancimov v tarčno celico, ki nato sprožijo apoptozo tarčne celice.

1.2.1.2.1 Signalne poti, ki privedejo do migracije citotoksičnih granul

Kaskadni procesi signalnih poti, ki vplivajo na lokacijo granul, so razvejani in večplastni. Ključnega pomena pri migraciji granul in MTOC so signalne poti, ki se aktivirajo po nastanku IS. Najprej se aktivirajo signalne molekule, Src, Vav 1, PI3K in PLC, nakar te molekule naprej aktivirajo družino MAP kinaz (Krzewski in Coligan, 2012). Za premikanje granul in MTOC sta pomembni dve glavni signalni poti: PI3K-ERK (Chen in sod., 2007; Jiang, 2000) in PLC-JNK (Li in sod., 2008), kinaza p38 pa naj ne bi bila ključna v tem procesu. Za sprožitev premikanja granul mora biti stimulirana vsaj ena od obeh poti, kar je odvisno od aktivacijskega receptorja. Tako na primer, aktivacija preko NKG2D stimulira tako JNK, kot ERK pot in tudi p38 kinazo (Chini in sod., 2000; Li in sod., 2008), IL-2 pa le ERK signalno pot (T. K. Yu in sod., 2000). Novejše raziskave so pokazale vlogo ogrodnih proteinov, kot so IQGAP, KSR1, MP1 in paksilina, v signaliziranju, kjer lahko delujejo kot centri, ki povezujejo GTPaze, kinaze in njihove substrate (Sacks, 2006). IQGAP tvori signalosom, ki lahko regulira sekvenčno fosforilacijo in tako vpliva na signalne poti. Awasthi in sodelavci so pokazali, da IQGAP kolokalizira z ERK kinazo, ki jo veže v signalosom in tako regulira njeno aktivacijo (Awasthi in sod., 2010). Na koncu poti migracije granul po citoskeletu je ogrodni protein paksilin, ključni prejemnik fosfatne skupine signalnih poti ERK in JNK. Paksilin je adapterski protein, ki interagira s proteini, ki vežejo aktin in proteini, ki regulirajo aktin in je v NK celicah lokaliziran pri MTOC in ima pomembno funkcijo pri polarizaciji granul (March in Long, 2011).

Po novejših raziskavah so pomembni regulatorji funkcije NK celic tudi transkripcijski faktorji, vendar je mehanizem njihovega vpliva največkrat še neznan. Znani transkripcijski faktorji, ki vplivajo na funkcijo NK celic, so BLIMP1, EOMES, ETS-1, GATA-3, HELIOS, KLF4, T-bet, TOX, FOXO1 in FOXO3 (Y. C. Deng in sod., 2015; Luevano in sod., 2012).



Slika 3: Shema signalnih poti, ki privedejo do polarizacije NK celic. Po prepoznavi celic se med njima tvori imunološka sinapsa. Na zunanji strani sinapse so adhezijske molekule, kot je LFA-1, ki je del periferne supermolekularne aktivacijske gručice (pSMAC). V središču cSMAC pa se nahajajo aktivacijski receptorji. Aktivacijski receptorji naprej sprožijo kaskado reakcij, ki povzroči polarizacijo MTOC in granul. Na sliki vidimo, da se lahko ta proces aktivira po dveh poteh (Krzewski in Coligan, 2012).

1.2.1.2.2 Citotoksične granule

Citotoksične granule imajo lastnosti lizosomov, zato jih dostikrat imenujemo tudi veliki sekretorni lizosomi (Topham in Hewitt, 2009). Poleg lastnosti lizosomov imajo tudi nekaj lastnosti endosomov, ki jih v zrelih lizosomih ne najdemo, kot je na primer manoza-6-fosfatni receptor (Burkhardt in sod., 1990). Granule so heterogeni vezikli in lahko merijo med 50 -1000 nm, glede na njihovo stopnjo razvoja jih lahko delimo na tri tipe. Tip 1 so popolnoma zrele citotoksične granule, vmesne granule in granule tipa 2, ki pa predstavljajo različni razvojni stopnji pred tipom 1. Poleg različnih encimov, ki so tipični za lizosome, vsebujejo tudi posebne proteine, ki se nahajajo le v citotoksičnih granulah (Blott in Griffiths, 2002). Ti proteini so grancimi, perforin, FasL, TRAIL, granulozin in majhni protimikrobni peptidi. Citotoksične granule vsebujejo

tudi multi-vezikularna telesca, ki vsebujejo katepsine in druge lizosomske hidrolaze, kot so α -glukozidaze in kisle fosfataze (Burkhardt in sod., 1990).

1.2.1.2.2.1 Grancimi

Grancimi spadajo med nevtrofilne serinske proteaze. Do danes pri ljudeh poznamo 5 različnih grancimov in sicer grancim A, B, H, K in M (Grossman in sod., 2003). Grancimi so izraženi kot proencimi, ki se morajo pred sekrecijo iz granul najprej proteolitično aktivirati. Grancime primarno aktivira katepsin C, če ta ni izražen ga lahko nadomesti katepsin H (D'Angelo in sod., 2010; Meade in sod., 2006; Smyth in sod., 1995). Grancima A in K sta si sorodna in oba cepita substrat za argininom ali lizinom. Grancim B cepi za aspartatom, medtem ko grancim H cepi za hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki (fenilalanin, triptofan ali tirozin). Grancim M cepi za metioninom ali levcinom (Grossman in sod., 2003; Kam in sod., 2000).

1.2.1.2.2.2 Perforin

Perforin je multi-domenski protein, ki se v NK celicah izraža konstitutivno (Voskoboinik in sod., 2010). N-terminalni del perforina ima signalni peptid in domeno s kompleksom za napadanje membrane (MACPF domena) (Rochel in Cowan, 1996). C-terminalni del perforina pa ima domeno podobno EGF in C2 domeno, ki omogočata vezavo na membrano v odvisnosti od kalcija. Te različne domene omogočajo perforinu, da oligomerizira in tako tvori pore v membrani tarčne celice (Voskoboinik in sod., 2005). Tudi perforin v granulah je v neaktivni obliki in se mora pred sekrecijo iz granul proteolitično aktivirati. C-terminalni del perforina lahko cepi vrsta različnih lizosomskih proteaz (House in sod., 2017), med drugimi tudi katepsin L (Konjar in sod., 2010). Nespecifično procesiranje perforina se je verjetno razvilo kot prednost, saj je na ta način malo verjetno, da lahko virusni peptidi inhibirajo celoten nabor proteaz, ki imajo sposobnost aktivacije perforina (House in sod., 2017). Perforin je za citotoksičnost najpomembnejši efektorski protein, saj se že majhno znižanje njegovega izražanja pozna na znižanju citotoksičnosti (Thiery in sod., 2011). Njegovo pomembnost potrjuje tudi dejstvo, da so mutacije perforina povezane z različnimi avtoimunskimi boleznimi (Chia in sod., 2012; Grom in sod., 2003).

1.2.1.3 Zaključna stopnja

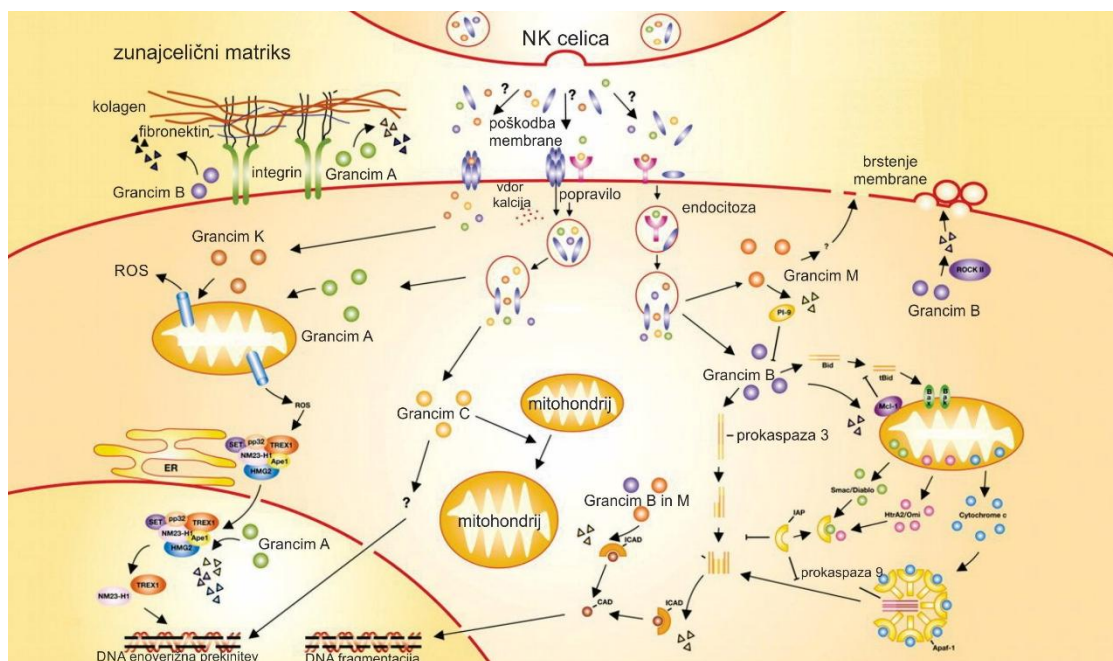
Ko NK celica izpusti vsebino granul v imunološko sinapso, vstopi v fazo izčrpanosti in regeneracije. Najprej pride do prenosa signalov preko fosfatidilserina ali deregulacije receptorjev. To povzroči, da se celica sprosti, nakar pride do odlepljanja NK celice od tarčne celice. Med tem procesom pa grancimi povzročijo smrt tarčne celice. Ko se NK celica odlepi se popolnoma regenerira in je nato ponovno pripravljena na naslednji proces prepoznavanja in ubijanja (Mace in sod., 2014). NK celica lahko opravi več zaporednih ubojev pred izčrpanostjo, koliko in kako hitro pa žal še ni znano, zanimiv podatek je, da lahko ubije več kot 200 tarčnih celic v 16 urah (Bhat in Watzl, 2007).

1.2.1.4 Smrt tarčne celice

Vsebinska citotoksičnost granul je v imunološki sinapsi izpostavljena nevtralnemu pH in fiziološkim nivojem kalcijevih ionov, kar povzroči, da lahko perforin oligomerizira in povzroči nastanek por. Te omogočajo vstop grancimov v citoplazmo tarčne celice, kjer sprožijo apoptozo. Točen mehanizem dostave grancimov v tarčno celico še ni znan, obstajata dva predlagana načina. Prvi način je, da perforin naredi pore v plazemski membrani velike do 20 nm, kar omogoča preprosto prehajanje grancimov. Drug način predlaga, da perforin in grancimi vstopijo v tarčno celico s pomočjo endocitoze, nakar perforin tvori pore v endosomski membrani in tako omogoča sprostitve grancimov v citoplazmo tarčne celice (Krzewski in Coligan, 2012). Grancimi v tarčni celici sprožijo apoptozo tako, da sprožijo nastanek reaktivnih kisikovih spojin (ROS), ki povzročijo škodo na mitohondrijih ali povzročijo poškodbe na DNA Ti efekti so sproženi v odvisnosti od kaspaz ali brez. Tabela 2 prikazuje substrate grancimov.

Tabela 2: Substrati grancimov. Glavna naloga grancimov, po tem, ko pridejo v tarčno celico, je, čim prej sprožiti apoptozo tarčne celice. To naredijo preko cepitve različnih substratov, ki naprej aktivirajo apoptotske mehanizme (Krzewski in Coligan, 2012).

Grancim	Način sprožitve apoptoze	Substrati
Grancim A	Od kaspaz neodvisno	Mitohondrijski respiratorni kompleks, SET kompleks, poli-ADP-ribozna polimeraza, lamini, histoni
Grancim B	Od kaspaz odvisno ali neodvisno	Kaspaze 3-,7,-8 in 10, Bid, tubulin α , ROCK II, lamin B, ICAD, DNA-PKcs, PARP
Grancim H	Od kaspaz odvisno ali neodvisno	Kaspaza 3, adenovirusni 100Ksestavljalni protein,
Grancim K	Od kaspaz neodvisno	BID, SET kompleks, p35
Grancim M	Od kaspaz odvisno ali neodvisno	FADD, survivin, HSP, TRAP1, ICAD, PARP, ezrin, tubulin α , serpin



Slika 4: Delovanje grancimov v tarčni celici. Slika prikazuje poenostavljen prikaz delovanja grancimov v tarčni celici in njihove glavne substrate. Povzeto po (Bots in Medema, 2006).

1.2.2 Sproščanje citokinov

Druga pomembna naloga NK celic je sproščanje citokinov in kemokinov, ki so pomembni za regulacijo imunskega odgovora. Produkcija in sproščanje citokinov iz NK celic ima vpliv na prirojen in pridobljen imunski odziv, njihovo nekontrolirano sproščanje pa je povezano z mnogimi bolezenskimi stanji predvsem s kroničnim vnetjem (Vivier in sod., 2008). NK celice lahko sproščajo imuno-regulatorne citokine IL-5, IL-10, IL-13, TNF- α , IFN- γ rastni faktor GM-CSF in kemokine MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 in RANTES (Fehniger in sod., 1999). Najpomembnejša citokina,

ki ju NK celice proizvajajo v največjih količinah sta TNF- α in IFN- γ (Roda in sod., 2006). Tako TNF- α kot IFN- γ imata protivirusno delovanje (Biron in sod., 1999) in sposobnost aktivacije in regulacije drugih imunskih celic, kot so dendritične celice, T celice in B celice (Vivier in sod., 2008). Preko TNF receptorja TNF α regulira apoptozo NK in sosednjih celic in tako sodeluje pri omejitvi imunskega odziva (Ross in Caligiuri, 1997).

1.3 Apoptoza

Apoptoza je eden od mehanizmov programirane celične smrti (PCS). Apoptozo so opisali že leta 1972, zato sta bila v teh letih njen mehanizem in morfološke značilnosti zelo dobro in podrobno raziskana. Apoptoza ima pomembno vlogo pri vzdrževanju celične in tkivne homeostaze, pri diferenciaciji, pri delovanju imunskega sistema in razvoju tkiv. Glavne značilnosti apoptoze so: krčenje celic zaradi razgradnje citoskeleta, kondenzacija jedra in citoplazme ter nastanek apoptotskih teles. Pomemben del apoptoze je tudi odstranitev apoptotskih celic, ki jo izvršijo makrofagi s pomočjo fagocitoze (Kroemer in sod., 2009). Najpomembnejši encimi v apoptotskem mehanizmu so kaspaze, cisteinske proteaze, ki so ključne v procesu sprožitve in izvršitve apoptoze. Poleg same apoptoze obstaja še vrsta alternativnih oblik PCS, kot so: avtofagična celična smrt, nekroptoza, MPT nekroza, piroptoza, ferroptoza, partanatos, entotična celična smrt, NETotična celična smrt, imunogenska celična smrt in celična smrt, odvisna od lizosomov.

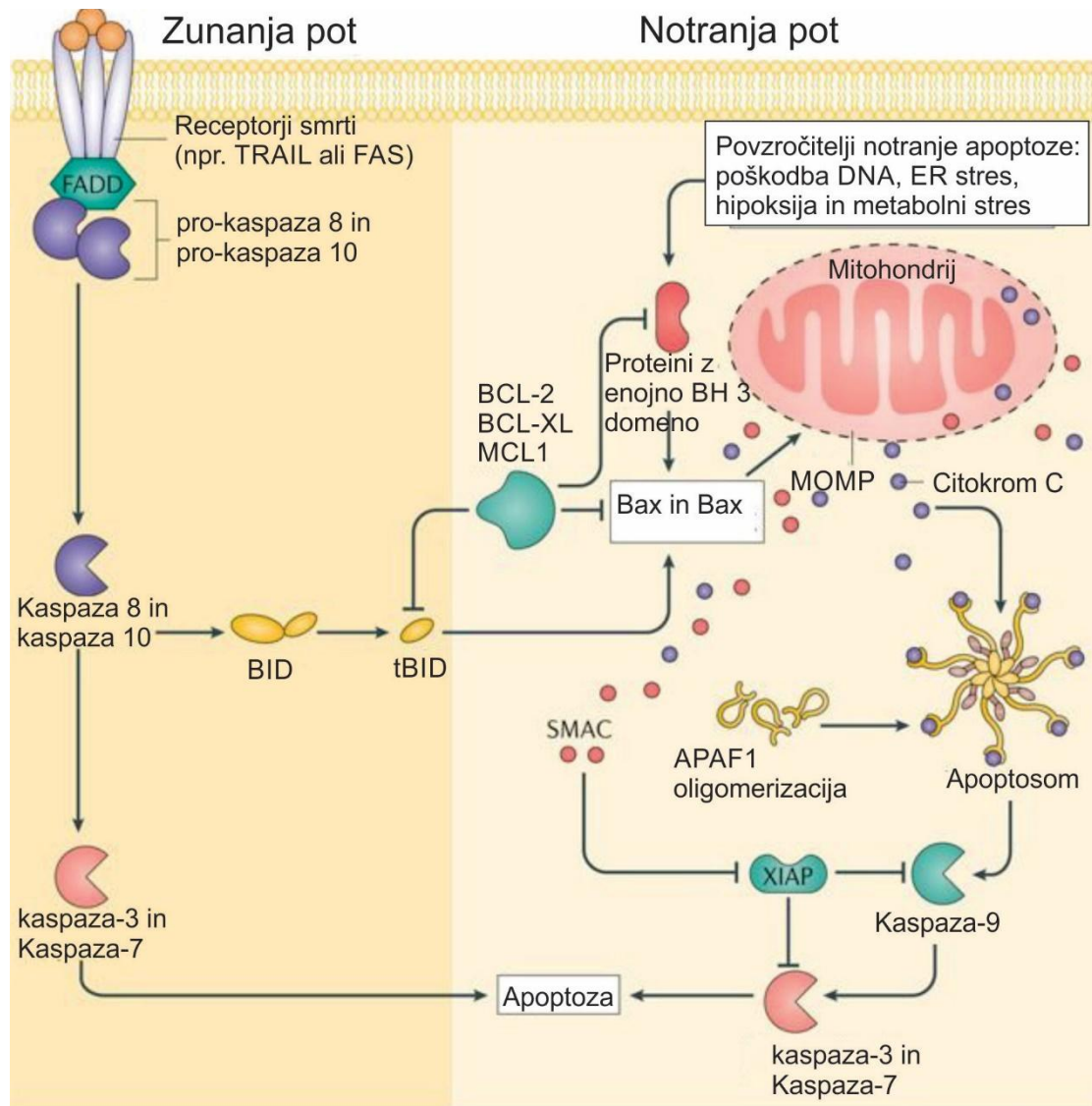
Kaspaze delimo v tri skupine, sprožitvene in izvršitvene kaspaze, ki sodelujejo v apoptozi in vnetne kaspaze. Kaspaze -2,-8,-9 in -10 so sprožitvene kaspaze, ki se po dimerizaciji aktivirajo z avtokatalizo. Sprožitvene kaspaze proteolitično aktivirajo izvršitvene kaspaze -3, -6 in -7 ali Bid. Bid sproži notranjo pot apoptoze, izvršitvene kaspaze pa direktno povzročijo smrt celice s cepitvijo fodrina, gelsolina, U1snRNP, ICAD, STAT1, RIP, Lamin B in drugih proteinov (McIlwain in sod., 2013; Nagata, 2018; Slee in sod., 2001). Glavne poti apoptoze so predstavljene na sliki 5.

1.3.1 Zunanja (ekstrinzična) pot

Zunanjo pot imenujemo tudi pot preko receptorjev smrti, ki jo sprožijo faktorji smrti iz družine TNF. Faktorji smrti so FasL, TNF- α in TRAIL, ki so sintetizirani kot membranski proteini. Da nastanejo njihove proste oblike, jih morajo iz površine celice cepiti metaloproteaze. Prosti faktorji smrti se vežejo na receptorje smrti (Fas, TNF-R, TRAIL-R), ki imajo domeno smrti, ki je potrebna za signaliziranje apoptoze. Receptor smrti se preko domene smrti poveže s FADD, prokaspazo 8 in c-FLIP proteinom in tako nastane kompleks DISC, ki aktivira kaspazo 8. Aktivna kaspaza 8 lahko nato direktno cepi izvršitveno prokaspazo 3, ali pa cepi Bid, ki inducira sprostitev citokroma c iz mitohondrija, oziroma sproži notranjo pot apoptoze (Nagata, 2018).

1.3.2 Notranja (intrinzična) pot

Notranjo pot apoptoze lahko imenujemo tudi mitohondrijska pot apoptoze. To pot sprožijo različne poškodbe v celici, ki so posledica sevanja, delovanja citotoksičnih snovi, oksidativnega stresa in drugih škodljivih vplivov. Notranja pot je regulirana s proteini iz družine Bcl-2, ki vsebuje: proapoptotske proteine z enojno BH3 domeno (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf in Bad), proapoptotske efektorske molekule (Bax in Bak) in antiapoptotske proteine družine Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, A1 in Bcl-B). V zdravih celicah proteini družine Bcl-2 inhibirajo Bax in Bak. Poškodbe v celicah povzročijo povišano izražanje proteinov z enojno BH3 domeno, ki delujejo na Bax in Bak, ali pa antagonizirajo učinek Bcl-2 proteinov. Bax in Bak povzročita sprostitev citokroma c iz mitohondrija v citoplazmo, kjer le-ta skupaj z Apaf-1 tvori apoptosom. Apoptosom je heptamerični kompleks na katerem prokaspaza 9 tvori dimer, s pomočjo katerega pride do avtokatalize prokaspaze 9 v aktivno kaspazo 9. Substrat aktivne kaspaze 9 so efektorske kaspaze predvsem kaspaza 3 (Nagata, 2018).



Slika 5: Notranja in zunanja pot apoptoze. Pri zunanji poti apoptoze je osrednji dogodek aktivacija kaspaze 8 ali 10, ki naprej cepita efektivski kaspazi 7 in 3 ali pa BID. Pri notranji poti pa je najpomembnejši dogodek permeabilizacija zunanje mitohondrijske membrane (MOMP), ki dopušča sprostitve citokroma C in tvorjenje apoptosoma. ER, endoplazemski retikulum; tBID, cepljen BID (Ichim in Tait, 2016).

1.3.3 Apoptoza povzročena preko perforina in grancimov

Perforin in grancimi skupaj sprožijo apoptozo tarčnih celic, ki so ali okužene z virusi ali transformirane. Virusi za svoje preživetje uporabljajo metabolizem tarčne celice, ravno zato imajo razvite mehanizme, ki celici preprečujejo apoptozo, da bi jo lahko čim dlje izrabljali. S tem razlogom se je evolucijsko razvila posebna apoptotska pot povzročena preko perforina in grancimov. Grancimi s svojo proteolitično sposobnostjo sprožijo mehanizme apoptoze, perforin pa je odgovoren za dostavo grancimov v tarčno celico. Človek ima 5 vrst grancimov, med njimi sta najbolj raziskana grancim A in B. Grancim B lahko sproži celično smrt, tako da direktno cepi kaspaze, ali da cepi Bid. Bid lahko cepi tudi grancim K. Poleg tega lahko grancim K, tako kot grancim A, cepi tudi komponente SET, ki povzročijo poškodbe na enoverižni DNA. Grancimi A, B in M pa lahko cepijo encime, ki popravljajo DNA. Peti grancim v človeškem telesu je grancim H,

ki lahko povzroči poškodbe na mitohondriju in fragmentacijo DNA (Krzewski in Coligan, 2012; Trapani in Smyth, 2002). Substrati grancimov so natančneje opisani v tabeli 2.

1.4 Proteaze

Encimi so proteini, ki katalizirajo celične reakcije. Delijo se na šest skupin in ena od njih so hidrolaze. Za učinkovito razgradnjo makromolekul v lizosomskem sistemu so potrebne hidrolaze, ki cepijo različne molekule, kot so proteaze, amilaze, lipaze in nukleaze (V. Turk in sod., 2012). Proteaze lahko delimo glede na lokalizacijo (mesto delovanja), načinu cepitve substrata (endopeptidaze in eksopeptidaze), ali pa glede mehanizma encimske reakcije (metalo, cisteinske, aspartatne, serinske proteaze ...) (Rawlings in sod., 2011). Najbolj uveljavljena razdelitev proteaz po Meropsu uporablja klasifikacijo na osnovi strukture (Rawlings in sod., 2010).

Med hidrolazami, ki se nahajajo v lizosomsko-endosomskih veziklih, imajo ključen pomen katepsini. Izraz katepsini se je sprva uporabljal za proteaze, ki so delovale v kislem okolju, danes pa ga uporabljamo za serinski proteazi katepsin A in G, aspartatni proteazi katepsin D in E in za 11 cisteinskih katepsinov (katepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W) (V. Turk in sod., 2012).

1.4.1 Cisteinske proteaze

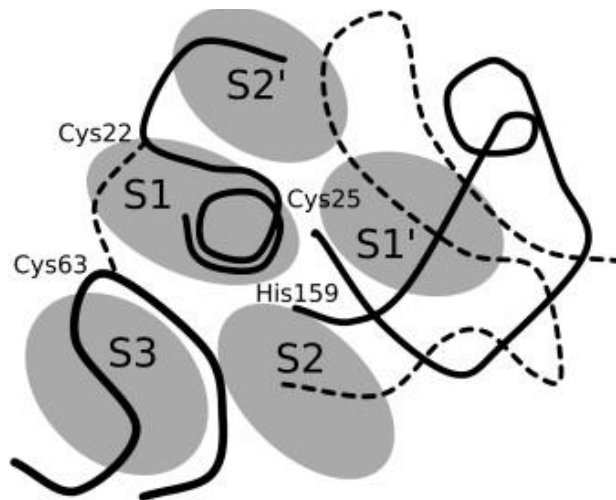
1.4.1.1 Cisteinski katepsini

Cisteinski katepsini spadajo v papainsko družino C1A. Kot omenjeno, je znano 11 cisteinskih katepsinov, ki so si strukturno podobni. Vsi cisteinski katepsini se sintetizirajo kot proencimi z N-terminalno proregijo in signalnim peptidom. Proencimi so zaradi signalne sekvence in N-glikozilacije usmerjeni skozi endoplazemski retikulum in Golgijev aparat v endosom ali lizosom. Katepsini so N-glikozilirani, tip N-glikozilacije pa določa njihov znotrajcelični transport (Niwa in sod., 2012). V preteklosti je veljalo, da se cisteinski katepsini nahajajo le v lizosomih, v zadnjih 15 letih pa je bilo pokazano, da se lahko premestijo tudi v jedro, mitohondrij in citosol ter se izločajo iz celic (Vasiljeva in Turk, 2008). V lizosomu, v prisotnosti kislega pH in s pomočjo aktivacije, poteče odcepitev N-terminalne proregije in nastanek zrele oblike aktivnega encima (Stoka in sod., 2016; V. Turk in sod., 2012). Cisteinske katepsine sestavljata dve domeni, L in R domena, med katerima je aktivno mesto, ki ga sestavljata evolucijsko ohranjena aminokislinska ostanka Cys in His. L domeno sestavljajo 3 α -vijačnice, D domeno pa tvorijo β -strukture.

Glede na cepitev substrata katepsine ločimo v endopeptidaze in eksopeptidaze. Večina cisteinskih katepsinov je preferenčno endopeptidaz, kar pomeni, da cepijo poljubno peptidno vez znotraj substrata. Katepsina H in C sta aminopeptidazi in substrat cepita na N terminalnem delu. Prvi odceplja po eno aminokislino, katepsin C pa po dve. Katepsina X in B pa sta karboksipeptidazi, kjer katepsin X odceplja po eno aminokislino, katepsin B pa po dve. Slednji ima poleg eksopeptidazne tudi endopeptidazno aktivnost, kar pa je odvisno od pH. Katepsin B ima namreč dodatno strukturno komponento imenovano zaporna zanka, ki ima dva histidinska aminokislinska preostanka in služi kot sidro za C-končni aminokislinski ostanek substrata. Zaporna zanka je v kislem pH z elektrostatskimi interakcijami povezana s preostalim delom katepsina B, v nevtralnem pH pa se umakne (Illy in sod., 1997; Podobnik in sod., 1997). Optimalni pogoj za aktivnost cisteinskih katepsinov je v reducirajočem rahlo kislem okolju med pH 4,5 in 6,5, katepsini B, H in S pa so lahko aktivni tudi pri višjem pH (V. Turk in sod., 2012).

Večina cisteinskih katepsinov je splošno izraženih v tkivih, kar kaže na to, da so udeleženi pri splošnih procesih razgradnje in obnavljanja v celici. Posebnost so katepsini K, S in W, ki so tkivno specifično izraženi. Katepsin K je v velikih količina izražen v osteoklastih, v epitelijskih celicah in fibroblastih. Katepsin W je izražen predvsem v limfocitih in NK celicah, medtem ko katepsin S najdemo v antigen predstavitvenih celicah, kot so dendritične celice in B-celice (V. Turk in sod., 2012). Cisteinski katepsini imajo poleg primarne vloge pri razgradnji in obnavljanju pomembno vlogo tudi pri procesiranju MHC razreda II, antigenski predstavitvi (Nakagawa in sod., 1998; Unanue in sod., 2016), preoblikovanju kostnega tkiva (Saftig in sod., 1998), celjenju ran, procesiranju pro-hormonov (Brix in sod., 2008; Suban in sod., 2012), razvoju raka, artritisu, srčno-žilnih boleznih (B. Turk, 2006; Vasiljeva in sod., 2007; Vasiljeva in Turk, 2008), diabetesu

(Reiser in sod., 2010), nevronalnih napakah (Pislar in Kos, 2014), vnetju (Colbert in sod., 2009), celični smrti in še mnogih bioloških procesih (Stoka in sod., 2005; B. Turk in Turk, 2009).

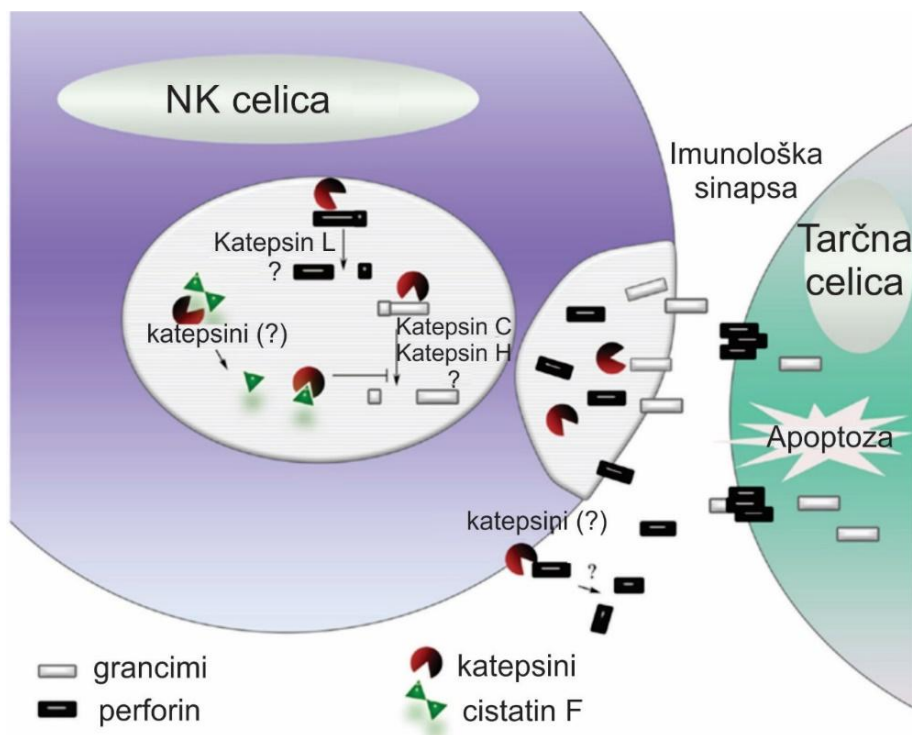


Slika 6: 3D shematski prikaz vezavnih mest substrata v aktivno mesto papainu podobnih proteaz. Vezavna mesta substrata so na levi strani (S1, S3, S2') in na desni strani (S2, S1') reže v aktivnem mestu (V. Turk in sod., 2012).

1.4.1.2 Cisteinski katepsini v celicah naravnih ubijalkah

V NK celicah se izražajo vsi splošno izraženi katepsini kot so katepsin B, L, H, F, X. Med naštetimi je v NK celicah predominantno izražen katepsin W, njegova raven izražanja pa se ob dodatku IL-2 še poveča. Zanimivo je, da je katepsin W kar 21x bolj izražen v NK celicah kot v citotoksičnih T limfocitih in nima znane vloge pri citotoksičnosti NK celic (Perisic Nanut in sod., 2014) (Stoeckle in sod., 2009). Prav tako se ne nahaja v citotoksičnih granulah, ampak v ER ali pa se izloča iz celic.

Najvidnejšo vlogo v NK celicah med katepsini ima katepsin C. Katepsin C je glavna proteaza, ki aktivira grancime s proteolitično cepitvijo N-terminalnega dela pro-grancimov (Brown in sod., 1993; Sutton in sod., 2007). Alternativno lahko grancime cepi tudi katepsin H. Vsekakor pa lahko grancime aktivirajo tudi druge proteaze, saj imajo NK celice miši z izbitim genom za katepsin C in katepsin H še vedno aktivne grancime (D'Angelo in sod., 2010). Poznana je vloga katepsina L, ki je eden od encimov, ki cepijo C terminalni del perforina, vendar vloga katepsina L ni ključna za citotoksičnost celic (Konjar in sod., 2010).

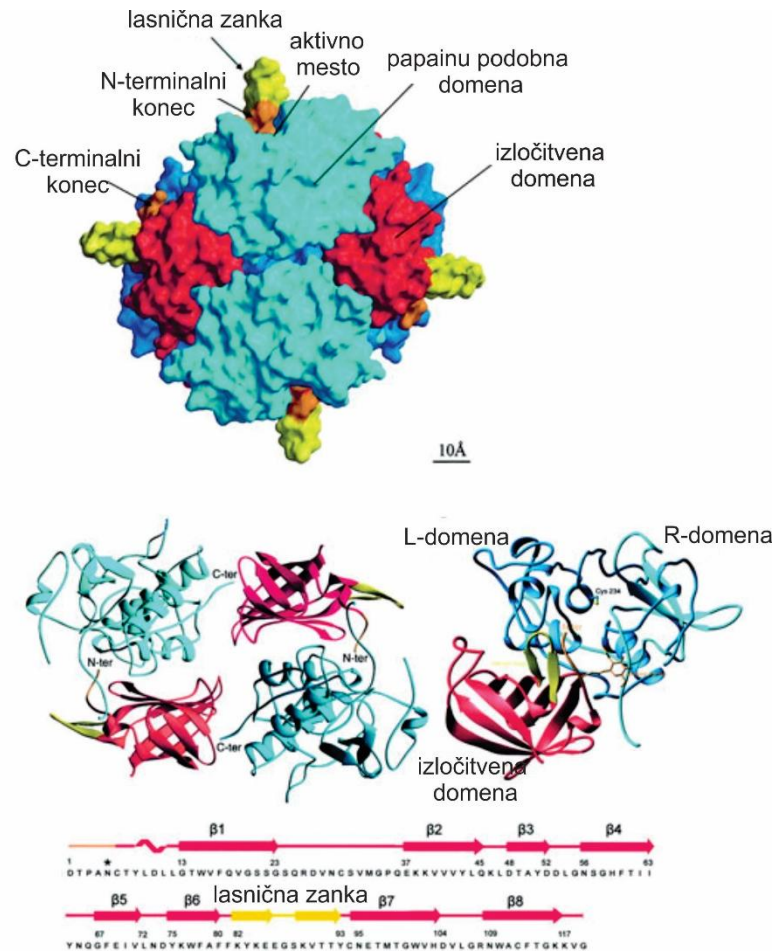


Slika 7: Shematski prikaz regulacije citotoksičnosti NK celic s katepsini. Najpomembnejša mediatorja citotoksičnosti, Grancim A in Grancim B, lahko aktivirata katepsin C in Katepsin H. Katepsin L je ena od proteaz, ki lahko aktivira perforin. Cistatin F je inhibitor katepsinov, ki lahko regulira citotoksičnost (Perisic Nanut in sod., 2014).

1.4.1.2.1 Katepsin C

Katepsin C poznamo tudi pod imenom dipeptidil-peptidaza I. Kot vsi katepsini se izraža kot preproencim dolžine 243 aminokislin (Paris in sod., 1995). Za razliko od drugih katepsinov potrebuje katepsin C za odcepitev pro regije in aktivacijo prisotnost drugih endopeptidaz, najpogosteje katepsin L ali S (Dahl in sod., 2001). Glede na specifičnost je katepsin C eksopeptidaza, ki odceplja dipeptide iz N-terminalnega dela substrata. Optimalni pH za peptidazno aktivnost katepsina C je med 5 in 6. Posebnost katepsina C je njegova velikost v primerjavi z encimi papainove družine in tudi transferazna aktivnost, katere optimalni pH je med 6,8 in 7,7 (McDonald in sod., 1969). Proencim katepsina C je dimer (Dahl in sod., 2001) njegova zrela oblika pa tetramer (Dolenc in sod., 1995). Vsak monomer je v tej strukturi sestavljen iz dveh papainu podobnih domen z aktivnim mestom in s posebno izločitveno domeno. Dodatna izločitvena domena pa pripomore k tetramerni strukturi in določa, da ima dostop do aktivnega mesta encima le N-terminalni del substrata (D. Turk in sod., 2001). Katepsin C ima v svoji strukturi štiri N-glikozilacijska mesta (Dahl in sod., 2001; Ishidoh in sod., 1991).

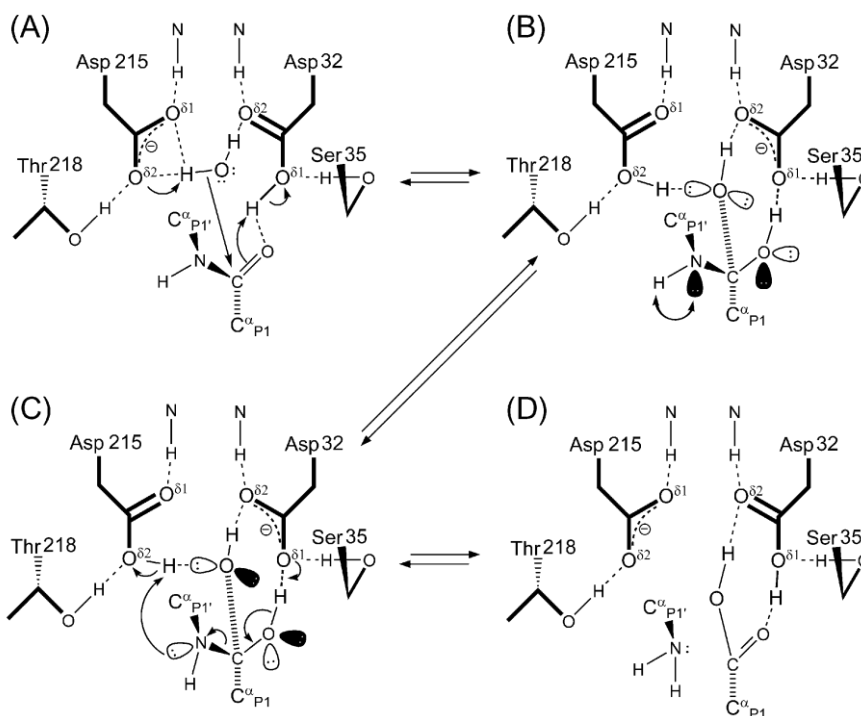
Katepsin C je lizosomska proteaza, ki je široko razširjena med organizmi. Njegova najpomembnejša vloga je aktivacija proencimov serinskih proteaz, kot so grancimi v citotoksičnih granulah NK celic in T-limfocitov, katepsina G, proteaze 3, nevtrofilne elastaze in podobni encimi (Pham in Ley, 1999; Wolters in sod., 2001). Zaradi sposobnosti aktivacije serinskih proteaz je pomanjkanje katepsina C povezano z vrsto različnih bolezni in predstavlja terapevtski potencial pri nekaterih vnetnih boleznih, kot je bronhialna astma, multipla skleroza, revmatoidni artritis, cistična fibroza in sepsa (Guay in sod., 2010). Mutacijo aktivnega mesta, ki povzroči neaktiven encim, so določili pri bolnikih z Papillon-Lefèvrevim sindromom (Hewitt in sod., 2004).



Slika 8: Tetramerna struktura katepsina C. Zgornji model nam prikazuje molekularno površino tetramerne strukture katepsina C. Papainu podobne domene so prikazane z modro, izločitvene domene pa z rdečo, rumeno in oranžno. Srednja slika prikazuje dimer proteina, spodnji del pa sekvenco izločitvene domene (D. Turk in sod., 2001).

1.4.2 Aspartatne proteaze

Aspartatne proteaze delimo v različne klane imenovane AA, AB, AC, AD in AF (Rawlings in sod., 2018). Omejili se bomo na družino A1, v katero spadajo pepsinu podobne proteaze. Aspartatne proteaze imajo v svojem aktivnem mestu dve asparaginski kislini, ki vežeta aktivirano molekulo vode in tako pride do značilne kislinsko-bazične katalize. Vse aspartatne proteaze imajo endopeptidazno aktivnost (Dunn, 2002). V tem delu bomo natančneje predstavili aspartatni katepsin D in E.



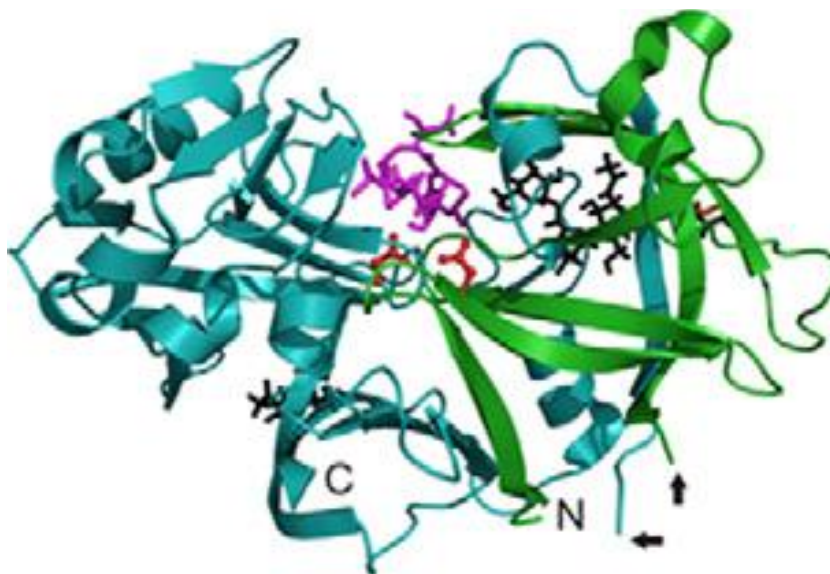
Slika 9: Mehanizem katalize aspartatnih proteaz. Prikazan je kompleks substrata in proteaze ter nukleofilni napad vode in prenos elektronov, pri čemer razpade peptidna vez (Wlodawer in sod., 2012).

1.4.2.1 Aspartatni katepsini

1.4.2.1.1 Katepsin D

Katepsin D je intracelularna aspartatna proteaza. Podobno cisteinskim katepsinom se tudi katepsin D sintetizira kot pre-pro-encim, ki ima N-terminalni signalni peptid, propeptid in katalitično domeno (Faust in sod., 1985). Po odcepitvi signalnega peptida je pro-encim usmerjen v lizosom, kjer se pod kislimi pogoji lahko avtokatalitično procesira do enoverižnega intermediata. Poleg avtokatalitične aktivacije lahko katepsin D aktivirajo tudi cisteinske proteaze (Conner in Richo, 1992). Enoverižen intermedat je naprej podvržen proteolitičnemu procesu, kjer nastane dvoverižna molekula iz lahke (14kDa) in težke (34kDa) verige (Cantor in Kornfeld, 1992; Samarel in sod., 1989). V svoji strukturi ima dve N-glikozilacijski mesti, ki ga pomagata usmerjati v lizosom preko manoze 6-fosfat receptorja (Fortenberry in Chirgwin, 1995), če le tega ni pa preko membranskega proteina sortilina (Canuel in sod., 2008). Katepsin D ima endopeptidazno aktivnost in na substrate optimalno deluje pri pH med 3,5 in 5. Specifično peptidno vez cepi predvsem med dvema hidrofobnima aminokislinama, kot so Leu, Phe in Trp (Barrett, 1977). Poleg tega, da se nahaja v lizosomu, ga lahko določimo tudi v jedru, citoplazmi in pri patofizioloških pogojih tudi zunaj celice. Pro-katepsin D lahko najdemo tudi v mleku, znoju, urinu in semenski tekočini (Davies in Messer, 1984).

Katepsin D je splošno izražen v vseh tkivih. Poleg nespecifične razgradnje v lizosomih je udeležen v specifičnih bioloških procesih, kot je celični cikel, diferenciacija, migracija, ovulacija, oploditev, obnova tkiv in angiogeneza (Khalkhali-Ellis in Hendrix, 2014). Encim lahko deluje kot mediator apoptoze in ima pro-apoptotsko vlogo (Appelqvist in sod., 2012). Prav tako ima vlogo pri rakavih obolenjih, kjer se prekomerno izloča iz celic (Fusek in sod., 2012). Katepsinu D so pripisali vlogo tudi pri nevrodegenerativnih boleznih, saj naj bi prispeval k razgradnji DNA. Povišano izražanje katepsina D se pojavlja ob kožnih boleznih. Pomanjkanje pa se odraža v različnih boleznih povezanih z zgoraj naštetimi biološkimi procesi (Khalkhali-Ellis in Hendrix, 2014; B. Turk in sod., 2002).



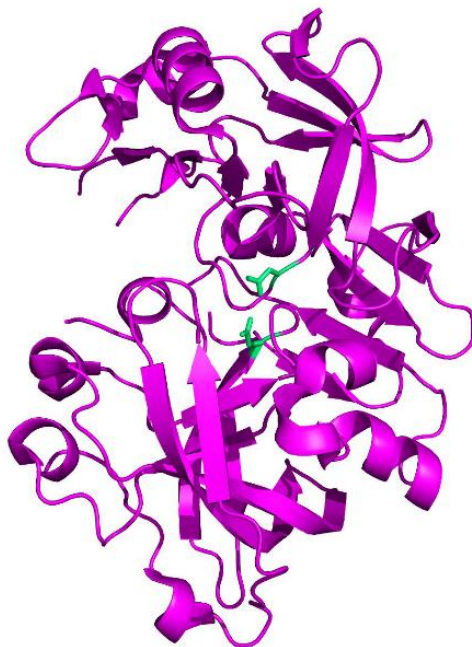
Slika 10: Tridimenzionalna struktura katepsina D. Struktura je sestavljena iz lahke verige prikazane z zeleno in težke verige prikazane z modro. Na sredini vidimo proteolitično režo z aktivnim mestom (rdeče) in vezanim inhibitorjem pepstatinom A (vijolično). N-glikani so prikazani črno (Fusek in sod., 2012).

1.4.2.1.2 Katepsin E

Katepsin E je aspartatna proteaza in se kot drugi katepsini izraža v obliki neaktivnega prekursorja, ki se v kislem avtokatalizira do aktivne oblike (Tsukuba in sod., 2006). Propeptid katepsina E ima pomembno vlogo pri njegovem zvitju in lokalizaciji. Katepsin E optimalno deluje v še bolj kislem pH (3,1), kot njemu soroden katepsin D. Specifično cepi, tako kot katepsin D, med dvema hidrofobnima aminokislinama (Arnold in sod., 1997). Od ostalih aspartatnih proteaz se razlikuje po tem, da se lahko v zreli obliki nahaja kot dimer, iz katerega pod reducirajočimi pogoji hitro nastane aktivna monomerna oblika. Njegova posebnost je aktivnost v nevtralnem območju, kjer se mu spremeni tudi specifičnost. Pokazano je bilo, da pri pH 7,4 cepi med Glu-Ala (Athauda in Takahashi, 2002; Athauda in sod., 1991; Tsukuba in sod., 2006). Katepsin E se večinoma nahaja v endosomih imunskih celic, predvsem v antigen predstavitvenih celicah, limfocitih, mikroglialnih celicah in dendritičnih celicah. Njegovo izražanje se poviša ob aktivaciji B celic. Poleg v imunskih celicah katepsin E najdemo tudi v eritrocitih, epiteljskih celicah prebavnega trakta in osteoklastih, kjer se nahaja na plazemski membrani (Chain in sod., 2005; Muto in sod., 1988; H. Sakai in sod., 1991; Saku in sod., 1991; Sastradipura in sod., 1998; Yoshimine in sod., 1995). Študije so pokazale, da je protein drugače izražen in lokaliziran glede na vrsto celic in glede na živalsko vrsto, kar naj bi bilo odvisno od tipa N-glikozilacije proteina (Tsukuba in sod., 2006; Yasuda in sod., 1999).

Fiziološka vloga katepsina E še ni povsem pojasnjena. Pri ljudeh z atopičnem dermatitisu (AD) so opazili nizko izražanje katepsina E, kar so potrdile študije z mišmi z izbitim genom za katepsin E, ki so v normalnih pogojih razvile AD (Tsukuba in sod., 2003). Makrofagi teh mišk imajo okvarjeno lizosomalno shranjevanje, v njih se namreč kopičita LAMP-1 in LAMP-2 proteina, poleg tega pa se zviša vrednost lizosomskega pH (Yanagawa in sod., 2007). Povišano izražanje katepsina E so opazili pri raku želodca, raku materničnega vratu in pri pljučnem raku (Zaidi in Kalbacher, 2012). Najbolj raziskani pa so povišani nivoji katepsina E pri raku slinavke, zaradi česar je kandidat za zgodnji diagnostični marker (Busquets in sod., 2006; Cruz-Monserrate in sod., 2012; Uno in sod., 2000). Na tem področju gredo raziskave v smeri iskanja inhibitorja katepsina E, kot je npr. inhibitor HIV-a, ritonavir, ki v kemijsko modificirani obliki kaže afiniteto do katepsina E (Keliher in sod., 2013). Ena od raziskav je pokazala, da je serumska aktivnosti katepsina E pri bolnikih z rakom dojke povezana z ugodno prognozo (Kawakubo in sod., 2014). Preko katalize cepitve TRAIL iz celične površine lahko katepsin E ustavi rast tumorja in sproži apoptozo rakastih celic prostate (Kawakubo in sod., 2007). Pripisujejo mu tudi vlogo pri antigenem procesiranju v

MHC drugega razreda (Solcia in sod., 1993). Pri starejših podganah so opazili povečanje katepsina E v glia celicah, kar ga povezuje z nevrodegeneracijo (Nakanishi in sod., 1994). Ker je katepsin E kolokaliziran z Alzheimerjevim amiloidnim prekursorskim proteinom, ga povezujejo tudi z Alzheimerjevo boleznijo (Nakanishi in sod., 1997; Zaidi in sod., 2008).



Slika 11: Kristalna struktura intermediatne oblike katepsina E. Slika prikazuje sekundarno strukturo katepsina E, na sredini je z zeleno označeno aktivno mesto proteaze.

1.5 Glukozamin

Glukozamin (GlcN) je naravni amino-monosaharid, ki kot osnovni gradnik lahko sestavlja glikoproteine, proteoglikane in glukozaminoglikane. Je biokemijski prekursor za vse amino sladkorje v človeškem telesu. GlcN se v telesu biosintetizira iz fruktoze-6-fosfata in glutamina. D-glukozamin se nato hitro acetilira v N-acetilglukozamin, ki se naprej porabi za izgradnjo glikoziliranih proteinov in lipidov (Duan in sod., 2005; Zachara in Hart, 2006). GlcN kot gradnik glukozaminoglikanov prispeva k strukturi in funkciji sklepov. Zaradi tega se široko uporablja kot prehransko dopolnilo pri osteoartritisu (OA) kljub temu, da samo delovanje ni potrjeno (Henrotin in sod., 2013; Henrotin in sod., 2012), mehanizem delovanja pa tudi ni poznan.

Na trgu se GlcN, kot prehranski dodatek največkrat pojavlja v treh oblikah: glukozamin hidroklorid, glukozamin sulfat in N-acetil glukozamin. Te spojine se pridobivajo iz hitina školjk s pomočjo kemičnih in encimatskih postopkov. Druga možnost za pridobivanje glukozamina je kvasna fermentacija (Dalirfardouei in sod., 2016).

Dodatki GlcN se večinoma uporabljajo oralno le redko intravenozno. 90 % zaužitega GlcN se v črevesju hitro absorbira, prav tako pa hitro poteče njegov metabolizem. Tako koncentracija zaužitega GlcN v krvni plazmi v primerjavi z intravenozno aplikacijo doseže le 25 % delež od zaužite koncentracije (Anderson in sod., 2005; Qian in sod., 2013). GlcN pri nobeni oralni dozi ne vpliva na nivo glukoze na tešče, niti na glukozni metabolizem ali občutljivost na inzulin (Simon in sod., 2011). GlcN v celico vstopi preko glukoznih transporterjev predvsem preko GLUT2, ki ima višjo afiniteto do GlcN kot do glukoze (Uldry in sod., 2002). Končna koncentracija GlcN v celici je nižja kot v plazmi, njegova razpolovila doba pa je približno 15 ur, zato priporočajo zaužitje GlcN trikrat na dan vsaj 4-8 tednov, saj naj bi tako dosegli optimalno delovanje na zdravje in potencialni biomedicinski učinek (Henrotin in sod., 2013; Persiani in sod., 2005).

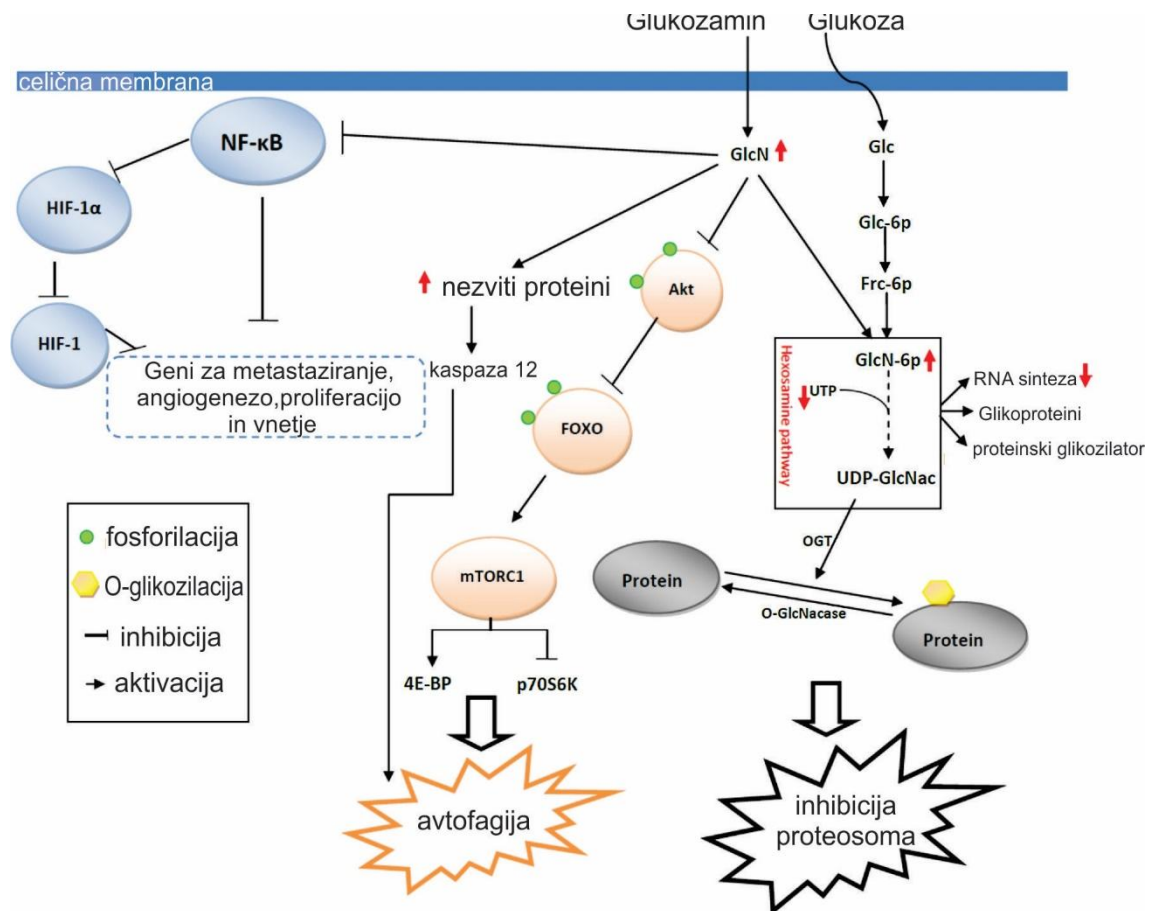
Glukozaminu se pripisuje cela vrsta možnih terapevtskih aplikacij. Pokazano je bilo, da ima protivnetni učinek in da lahko regulira vnetni odziv ter na ta način pomaga pri osteoartritisu (OA) (Imagawa in sod., 2011; Man in Mologhianu, 2014). Mehanizem in učinek njegovega

delovanja pri OA ni znan in rezultati so kontradiktorni. Obstajajo klinične študije, ki potrjujejo, da zmanjšuje bolečino pri bolnikih in izboljša funkcijo kolenskega sklepa pri jemanju GlcN vsaj 3 leta po 1500 mg na dan (Reginster in sod., 2007). Druge klinične študije pa so ovrgle njegovo delovanje (Runhaar in sod., 2017). GlcN inhibira aktivacijo NF- κ B signaliziranja, posledica tega je, da ne pride do izražanja vnetnih faktorjev TNF- α in INF- γ (d'Abusco in sod., 2007). Prav tako inhibira izražanje IL-1 β (Imagawa in sod., 2011). V človeških fibroblastih GlcN inhibira izražanje ciklooksigenaze 2 in matriks metaloproteaze 13, ki sodelujeta pri vnetnem odgovoru (Hong in sod., 2009). GlcN lahko tudi poviša izražanje proti vnetnega GRP78 proteina in zniža izražanje proteinov povezanih z oksidativnim stresom v humanih hondrocitih (Calamia in sod., 2010). Vpliva tudi na znižanje fosforilacije JNK in ERK kinaze ter tako zaustavi z LPS-om sproženo izražanje vnetnih citokinov (Wu in sod., 2010). GlcN lahko regulira produkcijo dušikovega oksida v makrofagih (J. S. Hwang in sod., 2017) in preko spremembe O-glikozilacije zniža izražanje genov vnetnih citokinov v sinovialnih celicah (Someya in sod., 2016). Poleg vpliva na samo vnetje, lahko GlcN in vitro zaustavi aktivacijo T-limfocitov in dendritičnih celic (Ma in sod., 2002) ter inhibira citotoksičnost NK celic (Yagita in sod., 1989).

GlcN lahko deluje tudi kot antioksidant, ima dobre učinke na srce in ožilje in dobro vpliva na kognitivne sposobnosti ter na zdravje kože. Eden glavnih molekularnih mehanizmov na katere vpliva GlcN je sprememba glikozilacije proteinov, kar močno vpliva na številne procese v celicah (Dalirfardouei in sod., 2016). Mnogo raziskav opisuje protirakasto vlogo GlcN na različnih celičnih vrstah. Različni mehanizmi na katere GlcN vpliva pri raku in ustrezne reference so povzete v tabeli 3.

Tabela 3: Mehanizmi na katere vpliva glukozamin pri raku.

Molekularni mehanizem	Vrsta celic /model	Reference
Sprožitev avtofagije preko od mTOR neodvisne poti	HeLa in COS7	(Shintani in sod., 2010)
Sprožitev avtofagije preko fosforilacije ERK in pretvorbe LC3	C2C5	(Kouroku in sod., 2007)
Sprožitev avtofagije preko ER stresa	Humane celice glioma	(M. S. Hwang in Baek, 2010)
Inhibicija proteasoma	Humane celice raka prostate	(Liu in sod., 2011)
Povečano obračanje proteina COX-2 v proteasomu	Rakaste celice pljuč	(Jang in sod., 2007)
Proti-genotoksični efekt	Humani limfociti	(Jamialahmadi in sod., 2014)
Lovilec znotrajceličnih prostih radikalov	Različni rakasti celični tipi	(Mendis in sod., 2008)
Sprožitev apoptoze in zniževanje ravni izražanja HIF-1a	Rakaste celice ustne votline	(Jung in sod., 2012)
Proti rakast vpliv odvisen od IGF-IR/akt	Različni rakasti celični tipi	(Song in sod., 2014)
Znižanje nivoja izražanja COX-2 in IL-8	Rakaste celice dojke	(Chou in sod., 2015)
Inhibicija signalne poti STAT3	Rakaste celice prostate	(Chesnokov in sod., 2009)
Znižanje fosforilacije FOXO	Rakaste celice pljuč	(Z. Yu in sod., 2017)



Slika 12: Shematični prikaz domnevnega mehanizma glukozamina na rakaste celice. Glukozamin lahko povzroči avtofagijo, inhibicijo proteasoma, vpliva lahko na NF-κB signalno pot. FOXO, Forkhead Box protein O1; mTORC1 mammalian Target of rapamycin complex; HIF-1 Hypoxia-induced factors; OGT, O-GlcNac transferaza (Zahedipour in sod., 2017).

Poglavje 2

Namen dela

Zaradi široke uporabe glukozamina, je pomembno preučevati stranske učinke prehranskega dopolnila na vse sisteme in organe. Pomembno je poznavanje mehanizma delovanja, tako na nivoju organizma, kot tudi na celičnem nivoju, saj na ta način lahko preprečimo nepravilno uporabo. Glede na to, da glukozamin največkrat konzumirajo starejši ljudje, ki so bolj senzibilni za različna bolezenska stanja, kot tudi razvoj rakastih obolenj, je vloga zvišane koncentracije glukozamina v imunskem sistemu lahko velikega pomena. Celice naravne ubijalke smo izbrali, zaradi njihove pomembnosti v prvem odgovoru proti rakastim in z virusi okuženimi celicami.

Namen našega dela je bil, da opredelimo vpliv delovanja glukozamina na NK celice, predvsem smo želeli določiti mehanizem delovanja, ki povzroči imunosupresijo NK celic. V doktorskem delu smo želeli ugotoviti kakšen je vpliv GlcN na katepsin C in na katepsin E. V nadaljevanju pa preveriti tudi vlogo TNF- α na citotoksičnost NK celic in vpliv TNF- α v kombinaciji s cikloheksimidom (CHX) na tarčne monocitne celice U937.

Naša hipoteza je bila:

GlcN zniža citotoksičnost NK celic tako, da deluje na glavne mehanizme aktivacije citotoksičnosti. Predvidevali smo, da GlcN ne deluje kot inhibitor katepsinov, ampak indirektno vpliva na fiziološko delovanje katepsinov v NK celicah. Predpostavili smo, da je glavni vzrok za znižanje citotoksičnosti vpliv GlcN na signalne poti in s tem na premikanje citotoksičnih granul. Hipotezo smo razširili na vpliv TNF α na citotoksičnost NK celic. Predvidevali smo, da TNF α zviša citotoksičnost NK celic in da sam ne vpliva na NK celice same ali na tarčne celice, ampak vpliva na tarčne celice v kombinaciji s CHX.

Poglavje 3

Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Laboratorijska oprema

- 0,5 mL in 1,5 mL mikrocentrifugirke (Costar)
- 15 mL, 50 mL centrifugirke (BD Biosciences)
- Aparatura za PCR 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)
- Avtomatske pipete (Eppendorf)
- Bralnik mikrotitrskih plošč TECAN Infinite M1000 (Tecan)
- Centrifuge (Eppendorf, Domel)
- digestorij (Wesemann)
- fazno kontrastni svetlobni mikroskop CX 40-RPLS (Olympus)
- filmi Biomax Light Film (Kodak)
- hladilniki in zamrzovalniki
- inkubator s kontrolirano atmosfero – 37 °C in 5 % CO₂ (Binder)
- Invertni konfokalni mikroskop LEICA TCS SP5 X
- Invertni mikroskop Olympus IX81 (Olympus)
- Kadička za agarozno elektroforezo Easy Cast Electrophoresis System Model #81A (Owl Scientific Inc.)
- Kadička za poliakrilamidno gelsko elektroforezo BioRad (BioRad)
- Kamera Olympus U-LH100L (Olympus)
- Koncentracijske enote Amicon Ultra-4 in Ultra-15, MWCO 10 kDa (EMC Millipore)
- Krovna stekelca (Deck Glaser 24x60 mm, Engel Brecht)
- laminar M18 (Iskra PIO)
- ledomat AF200 (Scotsman)
- magnetno mešalo D-6011 (NeoLAB)
- Mikrotitrna plošča s 96 luknjicami (Costar)
- Model za pripravo gelov za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (BioRad)
- Nanodrop ND-1000 (Babtech International)
- Napajalnik za elektroforezo in prenos Western Lightning Volt™ Power Supply OSP-300 (Thermo Scientific)
- naprava za NaDS PAGE in prenos western EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech)
- Napredni sistem za dokumentacijo gelov in membran G:BOX (Syngene)
- Neubauerjeva števna komora (Improved Neubauer, Blaubrand)
- nitorcelulozna membrana NC45 (Serva)
- pH-meter MP 220 (Mettler Toledo)
- pipetor (Brand/Eppendorf)
- Polistirenske petrijevke premera 6 cm, 10 cm ali 15 cm (TPP)
- posode za tekoči dušik Arpege 40/70 (Air Liquide)
- potočni material za enkratno uporabo za delo s celicami (centrifugirke, Petrijeve posode,... (Greiner); tkivne plošče, zamrzovalne vial, strgalo za celice,... (TPP); epruvete za pretočni citometer (Falcon))

- pretočni citometer FACSCalibur (BD)
- Programsko orodje Cell-F (Olympus)
- Programsko orodje Image J
- Razvijalec fotografskega filma 3RX-101A (Konica-Minolta)
- skrinja s temperaturo -80 °C (Sanyo)
- Sonikator Ultrasonic 450D (Branson, Thistle Scientific)
- steklovina (čaše (Simax), erlenmajerice (Schott), merilni valji, pipete, Pasteurjeve pipete (Brand),...)
- stresalnik Vibromix 314 EVT (Tehtnica)
- Svetlobotesna kaseta Hypercassette™ (Amersham Biosciences)
- tehtnici PB5001-S in AB104-S (Mettler Toledo)
- termomešalnik Thermomixer compact (Eppendorf)

3.1.2 Kemikalije in reagenti

- 3,3 - Dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate (DiOC18) (Sigma)
- aneksin V in vezavni pufer za aneksin V (Affymetrix eBioscience)
- Akridin oranž (Sigma Aldrich)
- APS (amonijev persulfat; Serva)
- cikloheksimid (Sigma)
- D-(+)-glucosamine hydrochloride (Sigma Aldrich)
- DTT (ditiotritol; Fermentas)
- E64d ((2S,3S)-trans-epoksisukcinil-leucilamido-3-metil-butan etil ester; Peptide Research Institute)
- ECL plus reagent za detekcijo prenosov po Westernu (GE Healthcare Bio-science AB)
- EDTA (Serva)
- Endoglikozidaza H (Endo H; New England Biolabs)
- Glutamax (Gibco-Invitrogen)
- GlyPheDMK (Enzyme Systems Products)
- Goveji serumski albumin (New England Biolabs)
- H-Gly-Phe-AMC (Bachem AG)
- IPTG (Sigma-Aldrich)
- KYS-1 (Peptide Institute Inc.)
- Mešanica inhibitorjev fosfataz (G-Biosciences)
- Mešanica inhibitorjev proteaz (Sigma Aldrich)
- N-acetilcistein (Sigma Aldrich)
- N—actil glukozamin (Sigma Aldrich)
- N-glikozidaza F (PNGaza F; New England Biolabs)
- NP-40 (Sigma Aldrich)
- Označevalec velikosti proteinov PageRuler Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas)
- Paraformaldehid (Sigma Aldrich)
- Penicilin/Streptomycin (Gibco-Invitrogen)
- Pepstatin A-penetratin (EMD Millipore)
- Posneto mleko v prahu (Pomurske mlekarne)
- ProLong Gold antifade z DAPI (Invitrogen)
- propidijev jodid (Sigma Aldrich)
- Reagent za določanje koncentracije proteinov (Biorad)
- rekombinantni interleukin 2 (IL-2; Cell Science)
- TEMED (N,N,N', N'-tetrametiletildiamin; Merck)
- TNF (dejavniki tumorske nekroze; darilo prof. Vandenabeele-a)
- TRIS (serva)
- Trypan Blue (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- Zarodni serum goveda toplotno inaktiviran FBS_{hi} (Atlanta Biologicals)

- Z-Phe-Arg-AMC (Bachem AG)
- zVAD (benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilketon; Bachem AG)
- Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare)
- NK Cell Isolation Kit II, mouse (Miltenyi Biotec)

3.1.3 Pufri in gojišča

Pufer TBS

50 mM Tris/HCl
500 mM NaCl
pH 7,0

Pufer TBST

TBS
0,05 % Tween-20

Pufer za prenos po Westernu

25 mM Tris
192 mM L-Gly
15 mM NaDS
20 % metanol

Nanašalni pufer za NaDS-PAGE (6x)

375 mM Tris/HCl
6 % NaDS
48 % glicerol
100 mM DTT
0,03 % bromfenol modro
pH 6,8

Pufer za NaDS-PAGE

25 mM Tris
192 mM L-Gly
0,1 % NaDS

Raztopina za pripravo 4 % koncentracijskega gela za NaDS-PAGE

1,33 ml 40 % akrilamid/bisakrilamid
2,5 mL 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
6,4 mL H₂O
0,1 mL 10 % NaDS
0,05 mL 10 % APS
0,025 mL TEMED

Raztopina za pripravo 12,5 % ločevalnega gela za NaDS-PAGE

3,125 mL 40 % akrilamid/bisakrilamid
2,5 mL 1 M Tris-HCl (pH 8,8)
3,6 mL H₂O
0,1 mL 10 % NaDS
0,05 mL 10 % APS
0,005 mL TEMED

Lizirni pufer za študij fosforiliranih proteinov

20 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
1 mM EDTA

1 % NP-40
10 % glicerol
1 mM Na_3VO_4
10 mM NaF
10 mM β -glicerolfosfat

Acetatni pufer 1

50 mM CH_3COONa
0,5 mM EDTA
150 mM NaCl
pH 5,6

Acetatni pufer 2

50 mM CH_3COONa
150 mM NaCl
pH 4

Pufer PBS

6,6 mM Na_2HPO_4
13,4 mM NaH_2PO_4
150 mM NaCl
pH 7,0

Laemmli pufer (4x)

240 mM Tris-Cl
8 % SDS
40 % glicerol
20% β -mercaptoethanol
0.04% bromfenol modro

Pufer za lizo rdečih krvnih celic –RBC lizirni pufer

155 mM NH_4Cl
10 mM KHCO_3
0,1 mM EDTA
pH 7,3
sterilna filtracija (0,2 μM)

RIPA pufer

50 mM Tris/HCl
100 mM NaCl
0,1 % (w/v) NaDS
1 % (w/v) NP-40
0,5 % (w/v) deoksiholne kisline
1 mM EDTA
pH 8,0

Pufer za frakcionacijo celičnih lizatov

0,1 % NP-40 v PBS

Blokirni pufer za membrane

5 % mleko v prahu v TBST

Blokirni pufer za imunocitokemijo

3 % BSA v PBS
0,1 % Triton-X-100

Gojišče RPMI- 1640 (Sigma-Aldrich)

3.1.4 Protitelesa

3.1.4.1 Primarna protitelesa

- Kozja poliklonska protitelesa proti katepsinu C (Santa Cruz Biotechnology)
- Kozja poliklonska protitelesa proti katepsinu E (R&D Systems)
- Mišja monoklonska proti β -aktinu (Sigma-Aldrich)
- Mišja monoklonska protitelesa proti fosfo-Ser (Santa Cruz Biotechnology)
- Mišja monoklonska protitelesa proti fosfo-Thr (Cell Signaling Technology)
- Mišja monoklonska protitelesa proti humanemu perforinu (pf-344) (Mabtech)
- Mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu D (Kopitar-Jerala in sod., 2001)
- Mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu C (Santa Cruz Biotechnology)
- Mišja monoklonska protitelesa proti O-GlcNAc (Cell Signaling Technology)
- Zajčja monoklonska protitelesa proti ERK (Cell Signaling Technology)
- Zajčja monoklonska protitelesa proti fosfo-ERK (Cell Signaling Technology)
- Zajčja monoklonska protitelesa proti fosfo-JNK (Cell Signaling Technology)
- Zajčja monoklonska protitelesa proti fosfo-p38 (Cell Signaling Technology)
- Zajčja monoklonska protitelesa proti FOXO1 (Cell Signaling Technology)
- Zajčja monoklonska protitelesa proti paksilin (Cell Signaling Technology)
- Zajčja poliklonska protitelesa proti JNK (Cell Signaling Technology)
- Zajčja poliklonska protitelesa proti p38 (Cell Signaling Technology)
- Zajčja poliklonska protitelesa proti stefinu B (Abcam)

3.1.4.2 Sekundarna protitelesa

- Alexa Fluor 488 protimišja (Invitrogen)
- Alexa Fluor 488 protizajčja (Invitrogen)
- Alexa Fluor 546 protimišja (Invitrogen)
- Kozja poliklonska protitelesa proti mišjemu IgG in IgM konjugirana s HRP (Jackson Immunoresearch)
- Kozja poliklonska protitelesa proti zajčjemu IgG konjugirana s HRP (Jackson Immunoresearch)

3.1.5 Rekombinantni katepsini

- Rekombinantni človeški katepsin L smo izrazili v kvasovki *Pichia pastoris* po že uveljavljenem postopku. Encim smo očistili s standardnimi kromatografskimi tehnikami v skladu z opisanimi postopki (Mihelic in sod., 2006).
- Rekombinantni človeški katepsin C smo izrazili v insektnih celicah s pomočjo bakulovirusnega sistema in ga nato očistili v skladu z opisanimi postopki (Dahl in sod., 2001; Paris in sod., 1995)
- Rekombinantni človeški katepsin E smo izrazili v inkluzijskih telescih *E. Coli* in ga nato ponovno zvilili in očistili kot je opisano (Puizdar in sod., 2012).

3.1.6 Sesalske celične kulture

- 4T1 – mišje žlezne tumorske celice (ATCC)
- Izolirane mišje primarne NK celice
- K562 - človeške krvotvorne rakaste celice (darilo E. Viver, Marseille, France)
- NK-92 - človeška celična linija celic naravnih ubijalk pridobljenih iz krvi (darilo E. Viver, Marseille, France)

- U937 – človeške celice levkemijskega monocitnega limfoma

3.2 Metode

3.2.1 Celične kulture

3.2.1.1 Gojenje celičnih linij

Suspenzijsko celično linijo NK-92 smo gojili v RPMI-1640 gojišču z dodanim 20 % hiFBS, 1 % glutamina, 1 % penicilin/streptomicina in 100U/ml IL-2. Celično linijo K562 in U937 smo prav tako gojili v gojišču RPMI-1640, le da smo mu dodali le 10 % hiFBS, 1 % glutamin in 1% penicilin/streptomicin. Vse suspenzijske linije smo gojili pri gostoti 3×10^5 celic/ml do gostote 1×10^6 , število celic smo določili s pomočjo števne komore in barvila triptan modro. Pritrjeno mišjo celično linijo 4T1 smo gojili v gojišču DMEM z 10 % FBS, 1 % glutamin in 1% penicilin/streptomicina. Linijo smo pustili rasti do 90 % konfluentnosti nato smo jo s pomočjo tripsinizacije precepili. Vse celične linije smo gojili v inkubatorju na 37°C in 5 % CO₂.

Vse celične linije smo zamrzovali v 90 % FBS in 10 % DMSO. Najprej smo določili število celic nato smo jih centrifugirali in ponovno suspendirali v mediju za zamrzovanje ter jih po en mililiter prenesli v kriogene vialle. Zamrzovali smo med 5×10^6 in 10^7 celic na vijalo. Vijale smo zamrzili na -80°C v posodi z izopropanolom, ki omogoča počasno zamrzovanje. Celice smo na hitro odtajali v kopeli 37°C in jih prestavili v rastni medij, nato pa centrifugirali, da smo odstranili DMSO in jih še enkrat suspendirali v primerni količini rastnega medija.

3.2.1.2 Primarne mišje NK celice

3.2.1.2.1 Dovoljenje etične komisije za delo z mišmi

Živali so bile nastanjene v hlevčku na Institutu »Jožef Stefan« pod pogoji, ki so v skladu s slovensko zakonodajo za zaščito živali in za delo s poskusnimi živalmi (Dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih, št. U34401-36/2014/10 in U34401-28/2016/4).

3.2.1.2.2 Priprava primarnih NK celic

Primarne NK celice smo izolirali iz vranice transgenih FVB miši divjega tipa. Vranico smo po izolaciji dali v PBS z 2 % FBS in jo zdrobili na situ. Nato smo celice iz vranice prefiltrirali skozi 70µM sito v 50 ml centrifugirko in jo vrteli 7 minut na 1300 rpm. Supernatant smo zavrgli pelet pa ponovno suspendirali v 5 ml RBC lizirnega pufra in, z vmesnim obračanjem, na ledu inkubirali 4 minute. Po 4 minutah smo dodali 30ml PBS z 2% FBS za nevtralizacijo RBC pufra in vrteli celice 10 minut na 130 rpm. Nato smo nadaljevali z negativno magnetno selekcijo s pomočjo MACS kita za izolacijo NK celic in MACS magnetno kolono po navodilih proizvajalca. Izolirane primarne NK celice smo nato gojili v komplementiranem RPMI-1640 gojišču z dodatkom 100 U/ml IL-2.

3.2.2 Meritve na pretočnem citometru

3.2.2.1 Test citotoksičnosti NK celic

Za določanje citotoksičnosti NK celic proti tarčnim celicami smo uporabljal pretočni citometer. Dan pred meritvijo smo določili število NK celic in jih nato preko noči tretirali z različnimi koncentracijami GlcN, GlcNAc, TNFα. Naslednji dan smo najprej določili število tarčnih celic (K562 ali U937) in jih označili z DiOC18, zelenim fluorescentnim membranskim barvilom. 10^6 celic v 1 ml PBS smo dali v centrifugirko z 10 µl 30 µM DiOC18 in barvilo inkubirali 20 minut na 37°C, nato pa smo barvilo 3x sprali s PBS. To barvilo nam omogoča da lahko ločimo tarčne celice od efektorskih (NK) celic. Tarčne in efektorske celice smo združili v razmerju E:T = 10:1, jih na kratko (1 minuta) centrifugirali in nato inkubirali 4h na 37°C. Po inkubaciji smo celice ponovno

centrifugirali in jih nato ponovno suspendirali v PBS z barvilom propidijev jodid (PI) v končni koncentraciji 0,5 μ M. PI nam označi celice, ki imajo poškodovano plazemsko membrano, zato lahko vstopi v celico in se veže med bazne pare v DNA. Na pretočnem citometru smo izmerili fluorescenco na FL1 (zelena) in FL3 (rdeča). Rezultate smo analizirali s pomočjo točkastega diagrama, kjer nam dvojno negativne celice predstavljajo žive NK celice. Celice pozitivne na PI so mrtve NK celice. Celice pozitivne na DiOC18 predstavljajo tarčne celice, dvojno pozitivne celice pa mrtve tarčne celice. Citotoksičnost smo izračunali s spodnjo formulo:

$$\text{citotoksičnost (\%)} = \frac{(\text{mrtve tarčne celice (\%)} - \text{spontano mrtve tarčne celice (\%)} \times 100}{(100 - \text{spontano mrtve tarčne celice (\%)})}$$

3.2.2.2 Določanje deleža apoptotskih celic

Po tretiranju celic smo celice prenesli v epruveto za pretočni citometer in centrifugirali 4 min pri 400g. Supernatant smo zavrgli, celicam pa smo dodali aneksin V (končna koncentracija v vezavnem pufru 0,2 μ g/ml) in inkubirali 15 minut. Aneksin V se je vezal na fosfatidilserin, ki se je pri zgodnje apoptotskih celicah izpostavil na zunanji strani plazemske membrane, medtem ko je ostal pri zdravih celicah na notranji strani. Po 15 minutni inkubaciji smo dodali še PI (končna koncentracija 0,2 μ g/ml). Rezultate smo analizirali s pomočjo točkastega diagrama, kjer nam dvojno negativne celice predstavljajo žive celice. Celice pozitivne na aneksin V predstavljajo zgodnje apoptotske celice, dvojno pozitivne celice pa mrtve celice.

3.2.2.3 Določanje deleža celic s poškodovanimi lizosomi

Za določanje poškodb lizosomov v U937 celicah po sprožitvi apoptoze s $\text{TNF}\alpha$, smo uporabili barvilo akridin oranž (AO). AO rdeče obarva organele s kislim pH. Ob poškodbi lizosomov pride do znižanega pH v lizosomih, zato se intenziteta obarvanja z AO zmanjša, kar zaznamo v zmanjšani fluorescenci.

Po končani inkubaciji U937 z $\text{TNF}\alpha$ smo celice 15 minut barvali s 5 μ g/ml AO, nato smo jih centrifugirali in ponovno suspendirali v PBS pufru. Sledila je meritev na pretočnem citometru, kjer smo spremljali fluorescenco v območju rdeče svetlobe (640 nm) in premik spektra k nižjim valovnim dolžinam.

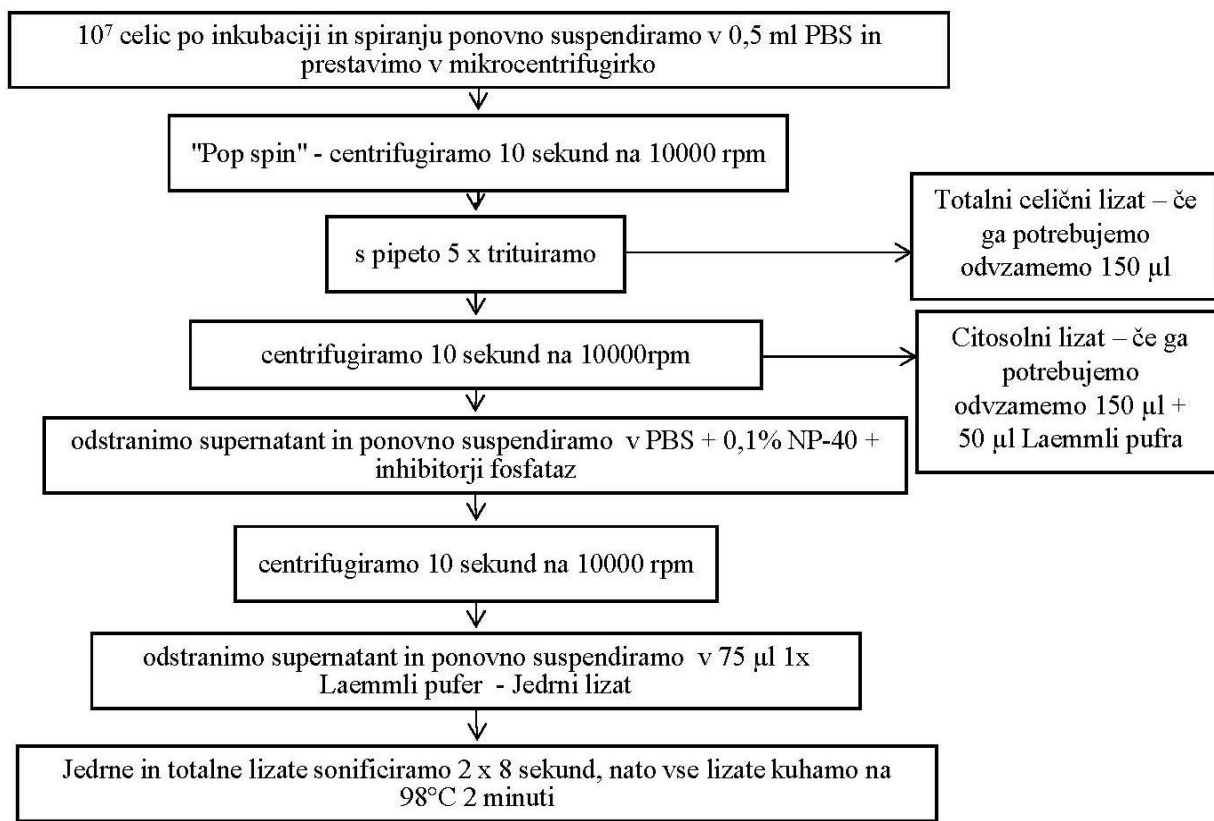
3.2.3 Priprava celičnih lizatov in analiza proteinov

3.2.3.1 Priprava totalnih celičnih lizatov

Dan pred pripravo lizatov smo celice precepili, nato pa smo jih želeno število inkubirali preko noči z GlcN ali pa jih inkubirali s TNF različno dolgo (med 1h in 12h). Po pretečenem času inkubacije smo celice centrifugirali (4 min pri 400 x g in 4°C) in jih 1 x sprali s hladnim PBS pufrom ter nato pelet ponovno suspendirali v hladnem RIPA pufru (2×10^6 celic v 50 μ l pufra) z dodanimi inhibitorji proteaz. Za pripravo NK celičnih lizatov za študiranje fosforiliranih proteinov smo dan pred meritvami NK-92 celice precepili in jih tretirali z GlcN. Naslednji dan smo celice za 4 ure prestavili v gojišče RPMI-1640 brez seruma z 0,5 % BSA in GlcN ter jih po 4h aktivirali z IL-2 (100 U/ml). po končani aktivaciji smo celice odcentrifugirali, sprali in ponovno suspendirali v lizirnem pufru za študijo fosforiliranih proteinov z dodanimi inhibitorji fosfataz.

3.2.3.2 Priprava jedrnih in citosolnih celičnih lizatov

Celice smo pripravili enako kot za pripravo celičnih lizatov za študiranje fosforiliranih proteinov (poglavje 3.2.3.1). Vendar celičnega peleta nismo ponovno suspendirali v pufru za študiranje fosforiliranih proteinov ampak smo naredili frakcionacijo po REAP metodi, opisni v spodnji sliki (Nabbi in Riabowol, 2015).



Slika 13: Postopek frakcionacije celic po REAP metodi.

3.2.3.3 Določanje koncentracije proteinov v vzorcu

Celokupno koncentracijo proteinov v vzorcu smo določali z metodo po Bradfordu. Metoda deluje tako, da se proteini vežejo na barvilo Coomassie (barvilo se veže na bazične amino kislinske ostanke, arginin, lizin in histidin) v kislih pogojih, tako se glede na koncentracijo proteinov barva spreminja iz rjave v modro. Pred meritvijo je potrebno pripraviti umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami BSA (od 0 do 25 µg/ml). Spremembo barve smo merili s pomočjo spektrometra in sicer absorbanco pri 595 nm. Pred meritvijo smo vzorce redčili, da smo dobili koncentracijo znotraj umeritvene krivulje, kar smo kasneje tudi upoštevali pri izračunu koncentracije.

3.2.3.4 Imunoprecipitacija

Totalnim celičnim lizatom v lizirnem pufru za študije fosforiliranih proteinov smo določili koncentracijo proteinov. 100 µl lizata s koncentracijo 5 µg/µl smo dodali primarna protitelesa za FOXO1 (redčitev 1:100) in Paxillin (redčitev 1:50) ter čez noč stresali na 4°C. Protein G sefaroza Fast Flow smo pripravili po priporočilu proizvajalca, nakar smo jo dodali vzorcem in na 4°C stresali 3h. Vzorce smo nato petkrat sprali in jih ponovno suspendirali v 3 x SDS pufru ter 5 minut kuhali na 100°C.

3.2.3.5 Določanje tipa N-glikozilacije proteinov

Za določanje tipa N-glikozilacije smo totalnim celičnim lizatom v RIPA pufru brez SDS odstranili sladkorje z deglikozidazama PNGaza F in Endo H. Poznamo tri tipe N –glikozilacije; visoko

manozni tip, kompleksni tip in mešani tip. PNGaza F odstrani vse sladkorje, ki so vezani na amidni dušik asparagina, Endo H pa odstrani le visoko manozni tip glikozilacije. Lizate smo najprej denaturirali in nato po priporočilu proizvajalca dodali eno ali drugo deglikozidazo ter ju pustili delovati 1h na 37°C. Po pretečeni inkubaciji smo dodali nanašalni pufer in vzorce skuhal.

3.2.3.6 Merjenje aktivnosti Katepsinov

Aktivnost Katepsinov smo določali z uporabo treh različnih sintetičnih fluorogenih substratov.

- Z-Phe-Arg-AMC je substrat specifičen za cisteinske Katepsine, preferenčno ga cepi Katepsin L
- H-Gly-Phe-AMC je substrat specifičen za Katepsin C
- KYS-1 je substrat specifičen za Katepsin E

Celičnim lizatam smo izmerili koncentracijo in nato v črno mikrotitersko ploščo odpipetirali 100 µg proteinov in dodali acetatni pufer 1 do končnega volumna 200 µl. Za merjenje aktivnosti z Z-Phe-Arg-AMC in H-Gly-Phe-AMC substratoma smo dodali še 10 mM DTT in vzorce inkubirali 10 minut pri 37°C. Po inkubaciji smo dodali še substrat (20 µM) in takoj pričeli meriti fluorescenco s Tecan fluorimetrom. Pri obeh substratih je valovna dolžina za vzbujanje 370 nm, valovna dolžina emisije pa 460nm. Aktivnost Katepsina E smo merili po enakem postopku, le da smo tu uporabili acetatni pufer 2 brez DTT in da je končna koncentracija substrata KYS-1 1µM. Valovna dolžina vzbujanja produkta cepitve je 328 nm, emisije pa 393 nm. Sprememba fluorescence v časovni enoti, oziroma naklon dobljene premice, je pri nespremenjeni koncentraciji substrata sorazmeren encimski aktivnosti.

Za določanje zunajcelične Katepsinske aktivnosti smo enako število celic gojili 4h v mediju brez seruma, nato smo medij 10x skoncentrirali s pomočjo centrifugalnega koncentratorja. Aktivnost smo merili v 40 µl vzorca, kateremu smo dodali 160 µl acetatnega pufra ter nadaljevali kot pri merjenju aktivnosti v celičnih lizatih.

Po enakem postopku smo merili tudi aktivnost rekombinantnih Katepsinov L, C in E. Najprej smo določili potrebno koncentracijo proteina, nato pa smo vzorcu dodali glukozamin in določali inhibicijo razgradnje substrata.

3.2.3.7 Ločevanje proteinov na NaDS-PAGE

Za ločevanje proteinov smo uporabili poliakrilamidno gelsko elektroforezo z dodanim denaturantom natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE) pod reducirajočimi pogoji (dodan DTT končna koncentracija 12mM). Pripravili smo 4 % koncentracijski gel in 12,5 % ločevalni gel ter nanесли vzorce in proteine ločevali v elektroforeznem pufru pri konstantnem toku 35mA na gel. Vsem vzorcem totalnih celičnih lizatov smo pred nanašanjem dodali nanašalni pufer NaDS-PAGE in jih 5 minut kuhali pri 98°C. Za določanje velikosti proteinov v vzorcih smo nanесли proteinske standarde PageRuler.

3.2.3.8 Prenos po Westernu in imunodetekcija proteinov

Po ločitvi proteinov na NaDS-PAGE, smo z metodo po Westernu proteine prenesli na nitrocelulozno membrano. Prenos je potekal 3h v pufru za prenos po Westernu pri električni napetosti 300V in konstantnem toku 250mA. Po prenosu smo membrane 1 h blokirali s 5 % mlekom v prahu, raztopljenim v TBST pufru, nakar smo na membrane nanесли zelena protitelesa redčena v TBST s 3 % BSA (redčitev po priporočilu proizvajalca). Membrane s protitelesi smo preko noči stresali na 4°C. Naslednje jutro smo odstranili protitelesa in membrano 5 x po 10 minut spirali s TBST pufrom, nakar smo na membrano za 1 uro dodali sekundarna protitelesa. Nato smo ponovili proces spiranja in na koncu smo za detekcijo dodali ECL reagent. Kemiluminiscenco smo zaznavali s pomočjo filma ali pa z naprednim sistemom za dokumentacijo gelov in membran G:BOX.

3.2.4 Imunocitokemija

Tretiranim ali netreniranim NK (primarnim ali NK-92) celicam smo v razmerju 1:1 dodali tarčne (K562 ali 4T1) celice in jih skupaj inkubirali 60 minut na 37°C. Medtem smo objektna stekelca prevlekli s polilizinom, da so se celice trdneje prijele stekelc. Po inkubaciji smo celice s pomočjo citospina pritrdili na objektna stekelca in jih nato 15 minut fiksirali v 4 % paraformaldehidu. Po fiksaciji smo stekelca 4x sprali s hladnim PBS in nato celice 30 minut blokirali in prmeabilizirali v blokirnem pufru za imunocitokemijo. Na objektna stekelca s celicami smo nato dali 100 µl primarnih protiteles (redčitev po priporočilu proizvajalca) redčenih v blokirnem pufru za imunocitokemijo. Primarna protitelesa smo inkubirali 15 minut na sobni temperaturi, nato smo protitelesa odstranili in stekelca 6 x sprali s hladnim PBS pufrom. Po spiranju smo za 15 minut dodali ustrezna fluorescentna sekundarna protitelesa in jih nato trikrat sprali s hladnim PBS pufrom. Na koncu smo vzorcem dodali ProLong Antifade reagent z barvilom DAPI in jih prekrili s krovnim stekelcem, ki smo ga pritrdili s prozornim lakom.

Za lokalizacijo fosforilirane ERK smo NK-92 celice najprej dali za 4 ure v medij brez seruma in nato 60 minut aktivirali z IL-2, jih fiksirali in nadaljevali po zgoraj opisanem postopku.

3.2.5 Fluorescentna konfokalna mikroskopija

Za fluorescentno mikroskopijo smo uporabljali invertni konfokalni laserski mikroskop LEICA TCS SP5 X. Ta mikroskop ima laser z belo svetlobo (WLL), ki ima območje vzbujanja med 470nm in 670nm in 405 nm diodni laser za vzbujanje DAPI. Uporabljali smo oljni objektiv HCX PL APO 60 x (N.A. = 1.4). Emisija signalov je ločena z akustooptičnem delivcu žarka (AOBS), ki omogoča natančno transmisijo fluorescenčnega signala, ki ga zaznajo trije detektorji, dva hibridna (HyD) in eden s fotopomnoževalko (PMT). Vse slike so bile pridobljene pri zaslonki z majhno odprtino (angl. pinhole) = 1AU (airy unit). Pridobljene optične rezine smo naprej analizirali v programu LAS AF ali ImageJ.

3.2.5.1 Analiza mikroskopskih slik

Kolokalizacijo proteinov smo določali s programom Leica LAS AF in kolokalizirano območje predstavili na slikah. Polarizacijo citotoksičnih granul smo ovrednotili s pomočjo programa ImageJ (Schindelin in sod., 2012). S kanalom za vidno svetlobo smo določili konjugate NK celic in tarčnih celic, za konjugate smo šteli tiste celice, ki so bile v kontaktu in je bila membrana med njima sploščena. Nato smo določili NK celico znotraj konjugata in jo razdelili na štiri enake dele (uporabili smo Draw concentric quadrants makro v programu ImageJ). NK celico, ki je imela v kvadrantu, obrnjenemu proti tarčni celici, več kot 50 % fluorescentne intenzitete označenega perforina, smo smatrali kot polarizirano.

Jedro translokacijo fosforilirane ERK kinaze smo prav tako določevali v ImageJ po protokolu iz članka (Noursadeghi in sod., 2008), ki smo ga modificirali za analizo ene celice. Določili smo področje jedra in citoplazme in velikost obeh področji. Nato smo analizirali intenziteto fluorescence fosforilirane ERK kinaze v posameznih področjih in pridobljene intenzitete delili z velikostjo področja. Tako smo dobili koncentracijo fosforilirane ERK kinaze v jedru in citoplazmi. Razmerje med njima smo pokazali v grafu.

3.2.6 Statistična analiza

Vsi podatki so bili analizirani s programom Microsoft Excel 2016, grafi so bili prav tako izrisani v Excel ali pa v Corel Draw. Za analizo slik smo uporabili program ImageJ. Vsi podatki so prikazani kot povprečje $\pm$ standardna deviacija (SD) vsaj treh ponovitev ali pa kot je navedeno v rezultatih.

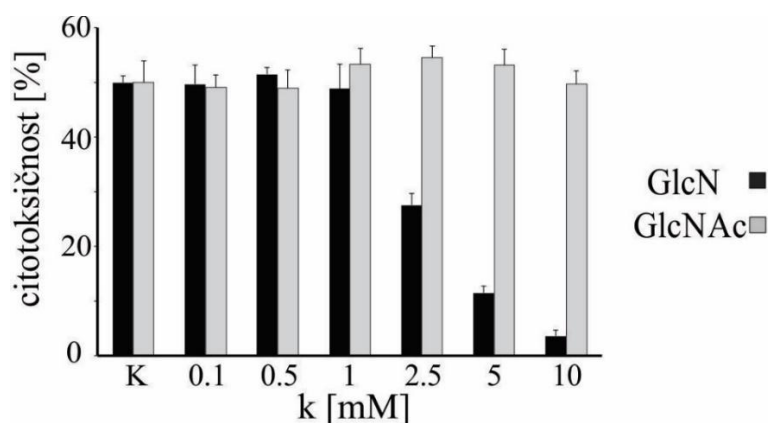
Poglavje 4

Rezultati

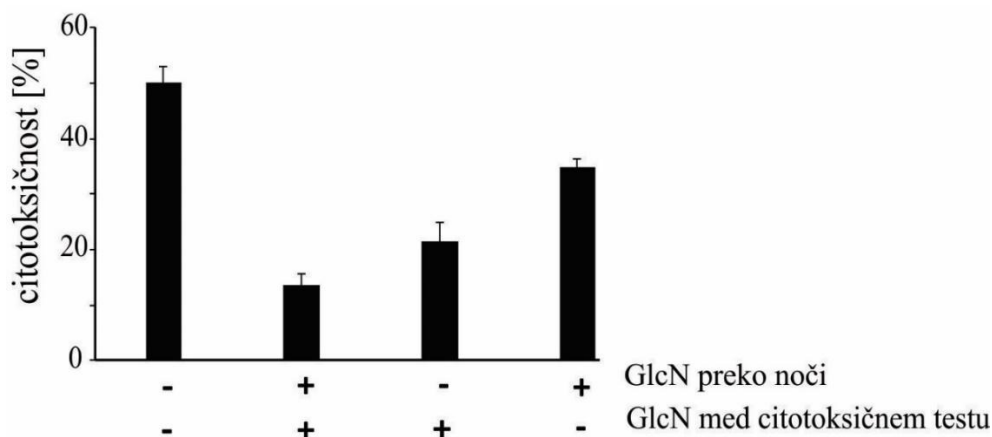
4.1 Glukozamin zmanjša citotoksičnost NK-92 celic

NK-92 celice smo preko noči tretirali z različnimi koncentracijami GlcN in GlcNAc (območje med 0.1 – 10 mM) in jih po tretiranju združili s tarčnimi K562 celicami, nato pa jih skupaj inkubirali štiri ure pri 37°C. Po koncu inkubacije smo na pretočnem citometru izvedli meritve citotoksičnosti s pomočjo barvil DiOC18 in PI. Ugotovili smo, da GlcN inhibira citotoksičnost NK-92 celic pri koncentracijah višjih od 2.5 mM, pri koncentraciji 10 mM pa popolnoma inhibira njihovo citotoksičnost (slika 14). GlcNAc pri enakih koncentracijah nima vpliva na citotoksičnost NK-92 celic proti tarčnim K562 celicam (slika 14). Prav tako smo preverili, ali imata GlcN in GlcNAc sama po sebi vpliv na viabilnost katere od obeh celičnih linij, in potrdili, da tako GlcN kot GlcNAc pri nobeni uporabljeni koncentraciji ne vplivata na viabilnost celic.

V nadaljevanju smo preverili tudi ali je efekt GlcN na citotoksičnost NK-92 celic reverzibilen ali ireverzibilen (slika 15). Ko smo celice tretirali z glukozaminom preko noči in med samim citotoksičnim testom je bila citotoksičnost 50 %. Ko smo celice tretirali le preko noči, se je citotoksičnost zmanjšala na 35 %. Celice tretirane le med citotoksičnim testom pa so pokazale le 20 % citotoksičnosti v primerjavi s kontrolo. S tem smo dokazali, da je učinek glukozamina reverzibilen in odvisen od časa predhodne inkubacije.



Slika 14: GlcN zmanjša citotoksičnost NK-92 celic proti K562 celicam. NK-92 celicam so bile preko noči dodane različne koncentracije GlcN in GlcNAc, naslednji dan pa smo izvedli 4h test citotoksičnosti. Napaka predstavlja standardno deviacijo.

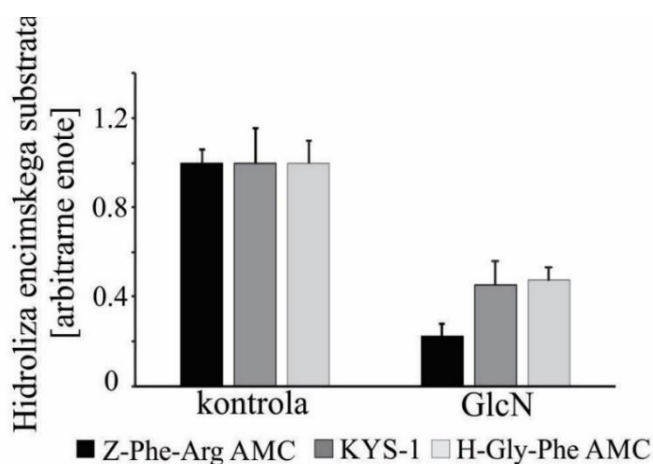


Slika 15: Reverzibilen efekt GlcN na zmanjšanje citotoksičnosti NK-92 celic proti K562 celicam. NK-92 celice smo tretirali s 5mM GlcN v različnih kombinacijah, preko noči in med citotoksičnim testom, samo preko noči ali samo med citotoksičnim testom. Napake predstavljajo standardno deviacijo.

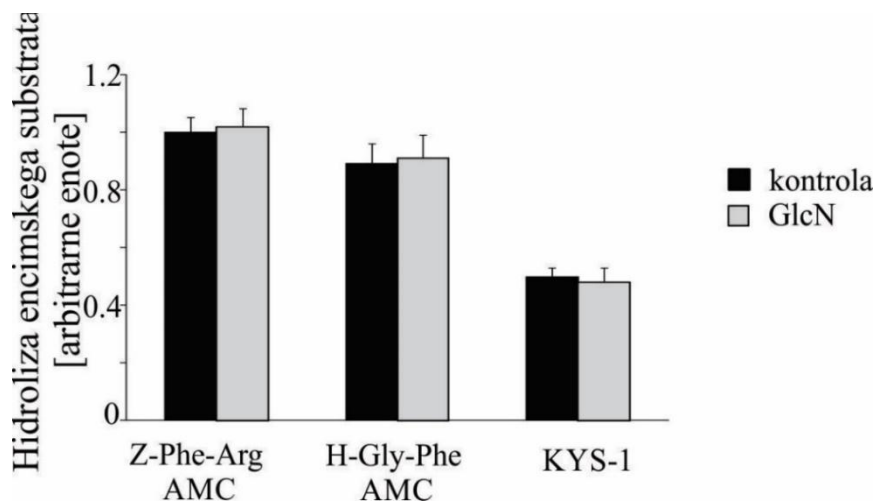
4.2 Vpliv glukozamina na katepsin C in E

4.2.1 Vpliv glukozamina na aktivnost katepsinov

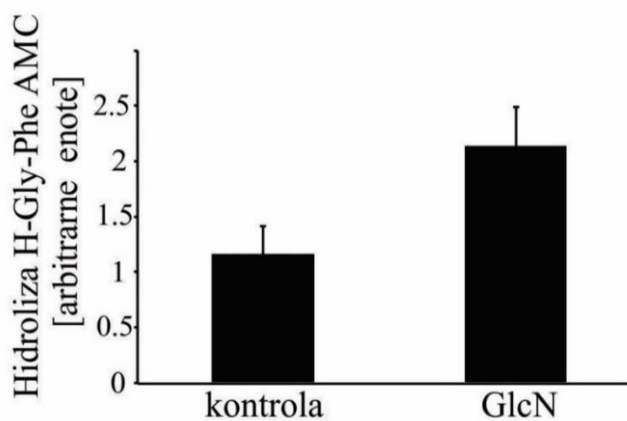
V lizatih smo izmerili aktivnost katepsinov NK-92 celic, ki so bile eno uro aktivirane z IL-2 in predhodno tretirane z GlcN. Aktivnost smo merili s tremi različnimi fluorogenimi substrati (Z-Phe-Arg AMC, KYS-1, H-Gly-Phe AMC) (slika 16). Splošna encimatska aktivnost cisteinskih katepsinov na substrat Z-Phe-Arg AMC, katepsina C in katepsina E v celičnih lizatih se je v GlcN tretiranih vzorcih znižala na približno polovično vrednost v primerjavi s kontrolo. Ker smo želeli preveriti ali GlcN deluje na katepsine kot inhibitor, smo izmerili encimsko aktivnost rekombinantnih katepsinov v prisotnosti visokih koncentracij GlcN. Ugotovili smo, da GlcN ne inhibira rekombinantnih katepsinov L, C in E (slika 17). S tem smo pokazali, da GlcN v celicah ne vpliva direktno na katepsine, ampak obstaja drugi vzrok za znižanje aktivnosti. V naslednjem koraku smo izmerili katepsinsko aktivnost v mediju celic (slika 18) in ugotovili, da se aktivnost katepsina C v GlcN tretiranih vzorcih podvoji, kar nakazuje na izločanje katepsina C iz celic. Izločanje tega katepsina smo potrdili z prenosom po Westernu in pokazali da se ob dodatku GlcN zniža količina katepsina C in E v celičnih lizatih (slika 19).



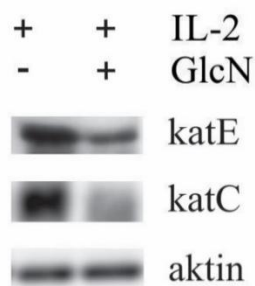
Slika 16: Katepsinska aktivnost v celičnih lizatih. V NK-92 celicah aktiviranih z IL-2, v kontroli ali celicah z dodanim 5mM GlcN, smo izmerili aktivnost katepsina C, E in cisteinskih katepsinov s tremi različnimi fluorogenimi substrati. Rezultati so prikazani kot sprememba glede na kontrolo.



Slika 17: Vpliv GlcN na aktivnost rekombinantnih katepsinov. Izmerili smo aktivnost rekombinantnega katepsina L (substrat Z-Phe-Arg AMC), C (substrat H-Gly-Phe AMC) in E (substrat KYS-1).



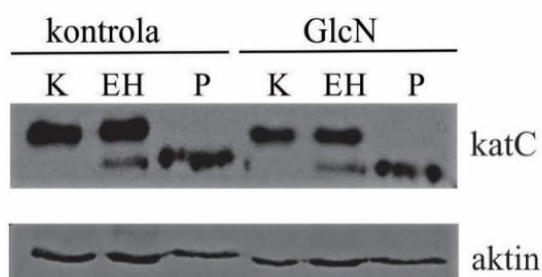
Slika 18: Aktivnost katepsina C v mediju NK2 celic. NK-92 celice so bile aktivirane z IL-2 nato smo vzeli medij, ga skoncentrirali in izmerili aktivnost katepsina C v mediju s pomočjo substrata H-Gly-Phe AMC. Rezultati so prikazani kot sprememba aktivnosti katepsina C v mediju celic, ki so rastle v prisotnosti 10 mM GlcN glede na medij kontrolnih celic.



Slika 19: Imunodetekcija Katepsina E in C v aktiviranih NK-92 celicah. Količina katepsina E in C v aktiviranih NK-92 celicah v kontroli in po dodanem GlcN. Aktin predstavlja kontrolo za enako nanašanje vzorcev.

4.2.2 Glukozamin ne vpliva na spremembo tipa N-glikozilacije

Vsi katepsini so N-glikozilirani in N-glikozilacija vpliva na njihovo lokalizacijo, zato smo preverili ali prisotnost glukozamina v mediju vpliva na tip N-glikozilacije katepsina C. Celične lizate smo inkubirali z deglikozidazama (PNGase F in EndoH) in obdelane lizate nato analizirali s prenosom po Westernu (slika 20). Pokazali smo, da prisotnost GlcN v mediju, v katerem rastejo NK-92 celice, ne vpliva na tip N-glikozilacije katepsina C in da je večina katepsina C kompleksno N-glikozilirana.



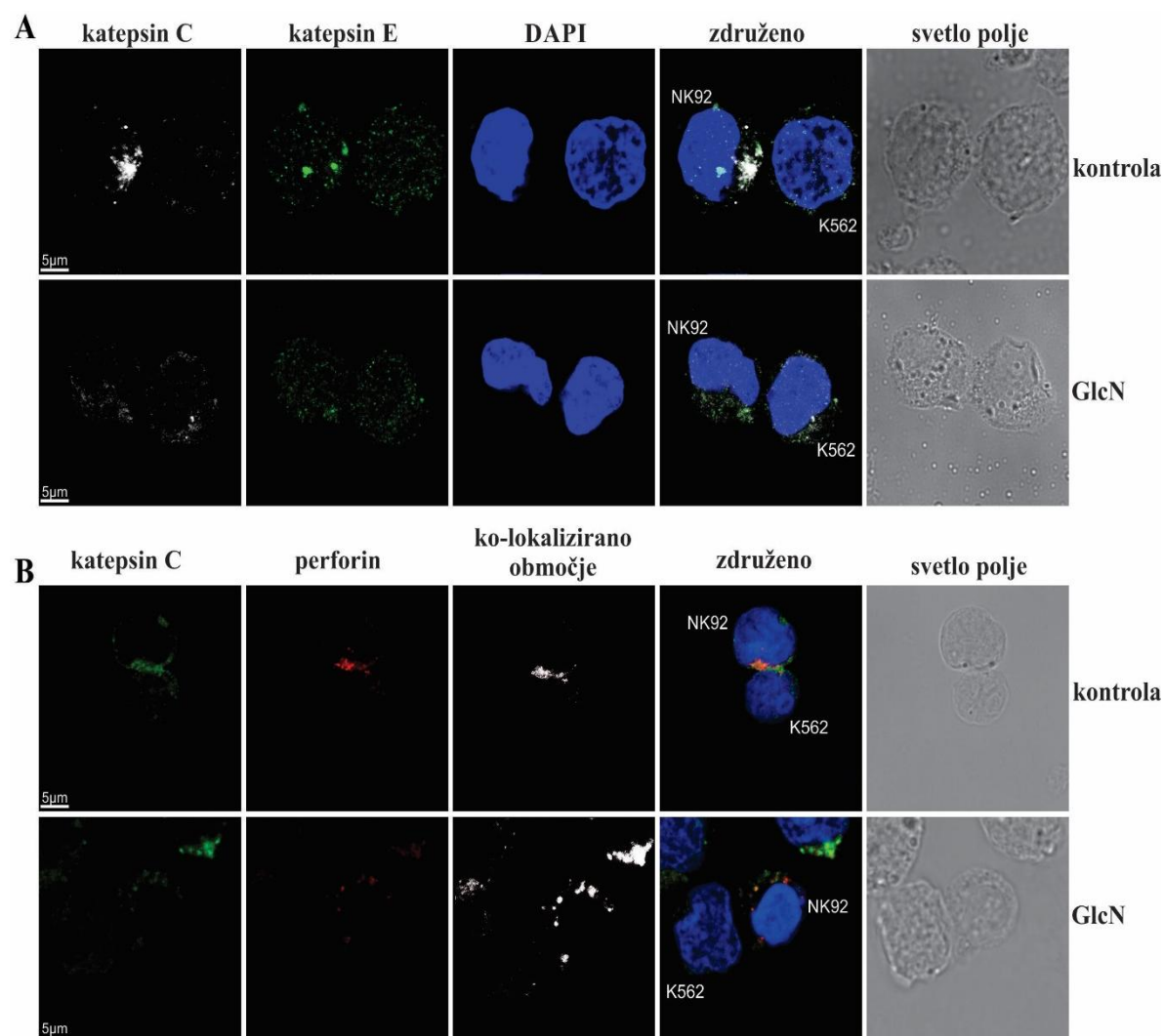
Slika 20: Vpliv prisotnosti GlcN v mediju na tip N-glikozilacije v NK-92 celicah. Tip N-glikozilacije v NK-92 celicah z ali brez prisotnosti GlcN v mediju smo preverili s pomočjo dveh glikozidaz EndoH (EH) in PNGaseF (P). Oznaka K predstavlja kontrolne vzorce brez glikozidaz. Aktin predstavlja kontrolo nanašanja vzorca na elektroforezni gel.

4.2.3 Lokalizacija katepsina C in katepsina E v NK-92 celicah in vpliv GlcN na njuno lokalizacijo

Lokalizacijo katepsina C in E v NK-92 celicah smo določili s pomočjo konfokalne fluorescentne mikroskopije v konjugatih NK-92 in K562 celic. Pokazali smo, da katepsina nista kolokalizirana (slika 21 A). Za dokaz, da se katepsin C nahaja v citotoksičnih granulah katepsin E pa ne, smo v konjugatih poleg katepsina E označili katepsin C (slika 21A). Encima sta se nahajala v ločenih

veziklih. V nadaljevanju pa smo pokazali, da sta katepsin C in perforin kolokalizirana (slika 21B), kar dokazuje, da se katepsin C nahaja v citotoksičnih granulah, katepsin E pa ne.

Konjugate smo uporabili za določevanje vpliva glukozamina na lokalizacijo obeh katepsinov (slika 21). Na sliki 21B lahko vidimo, da sta katepsin C in perforin v NK-92 celicah fokusirana proti tarčni K562 celici medtem ko sta v GlcN tretiranih konjugatih razporejena po celotni celici. Iz rezultatov lahko sklepamo, da GlcN vpliva na lokalizacijo citotoksičnih granul v NK-92 celicah. Poleg tega pa lahko v GlcN tretiranih NK-92 celicah vidimo tudi drugačno razporeditev katepsina E, iz česar lahko sklepamo, da GlcN prav tako vpliva na razporeditev endosomov v NK-92 celicah.



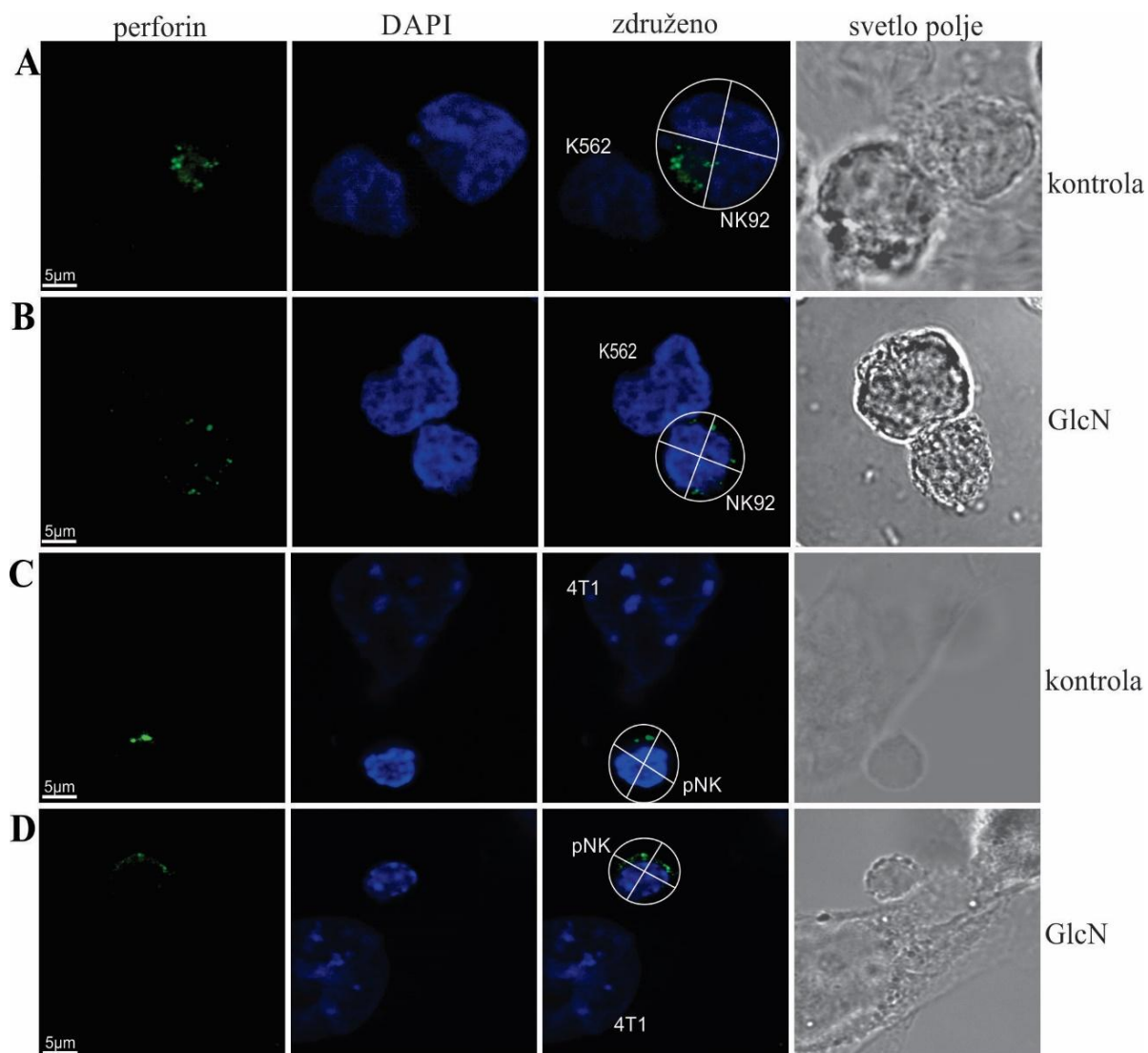
Slika 21: Vpliv GlcN na lokalizacijo katepsina C in katepsina E v NK-92 celicah. **(A)** Znotrajcelična lokalizacija katepsina C (belo) in katepsina E (zeleno) v NK-92 celicah v kontaktu z K562 celico. DAPI (modro) predstavlja jedra obeh celic v konjugatu, s pomočjo svetlega polja smo določili konjugate. Spodnje slike prikazujejo lokalizacijo katepsina C in E v konjugatih ob prisotnosti GlcN. **(B)** Znotrajcelična lokalizacija katepsina C (zeleno) in perforina (rdeče) ob prisotnosti GlcN ali brez. Slike s ko-lokaliziranim območjem prikazujejo izračunano ko-lokalizacijo perforina in katepsina C s pomočjo LAS AF programa. S pomočjo svetlega polja smo določili konjugate celic.

4.3 Glukozamin prepreči polarizacijo granul v NK celicah

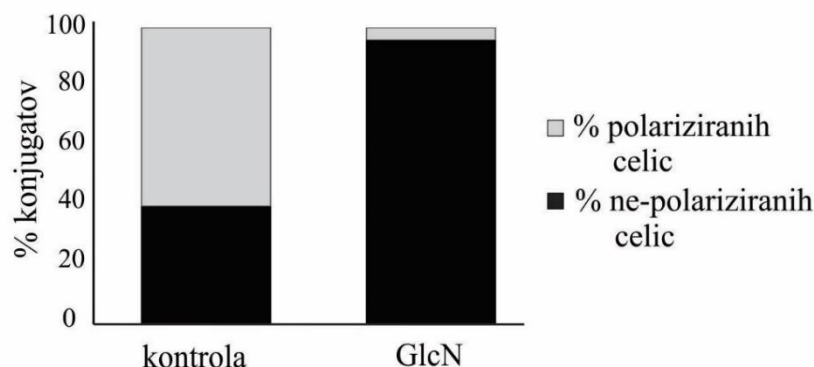
V naslednjem koraku smo želeli kvantificirati vpliv GlcN na polarizacijo citotoksičnih granul NK celic. NK-92 celicam in mišjim primarnim NK celicam smo preko noči dodali 5mM GlcN in jih nato naslednji dan združili z enakim številom tarčnih celic (K562 in 4T1). Po enournem kontaktu smo jih fiksirali in označili perforin. Vzorce smo pripravili v treh bioloških ponovitvah. Na sliki 22 so predstavljeni reprezentativni konjugati kontrolnih in z GlcN tretiranih celic. Vidimo lahko, da so granule s perforinom v kontrolnih celicah fokusiran proti tarčni celici (slika 22A) pri z GlcN tretiranih celicah pa so razpršene po celotni citoplazmi celice (slika 22B). Enak učinek GlcN je viden v primarnih NK celicah (slika 22C in 22D).

Statistično analizo razporejenosti citotoksičnih granul v NK-92 celicah smo naredili v programu ImageJ. NK celice smo razdelili na štiri enake dele in nato analizirali nahajanje perforina v četrtini, ki se je dotikala tarčne celice (razdelitev celice je prikazana na združeni sliki) in ga primerjali s porazdelitvijo perforina po celotni celici. V 60 % vseh kontrolnih lizatov so bile granule polarizirane proti tarčni celici, medtem ko je bilo v GlcN tretiranih celicah le 2 % polariziranih celic (slika 23).

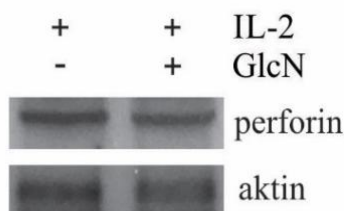
Intenziteta signala pridobljenega z detekcijo perforina je pri celicah, ki so rastle v prisotnosti GlcN, navidezno nižja. Western prenos (slika 24), kjer smo detektirali perforin v celičnih lizatih, prikazuje, da je količina perforina v celicah ostala enaka.



Slika 22: GlcN vpliva na polarizacijo citotoksičnih granul proti tarčni celici. **(A)** prikazuje reprezentativni kontrolni konjugat NK-92 in K562 celic in lokalizacijo perforina (zeleno), za katerega je znano, da se nahaja v citotoksičnih granulah (Ojcius in sod., 1991). **(B)** prikazuje reprezentativni konjugat NK-92 in K562 celic in lokalizacijo perforina (zeleno) v prisotnosti GlcN. **(C)** in **(D)** predstavljata reprezentativna konjugata primarnih mišjih NK celic (pNK) in tarčnih 4T1 celic v prisotnosti GlcN ali brez. DAPI (modro) na vseh slikah predstavlja jedra celic. Na slikah označene z »združeno« lahko vidimo NK celico razdeljeno na četrtine. S pomočjo četrtin smo naredili statistiko porazdelitve polariziranih granul na osnovi nahajanja granul v celici.



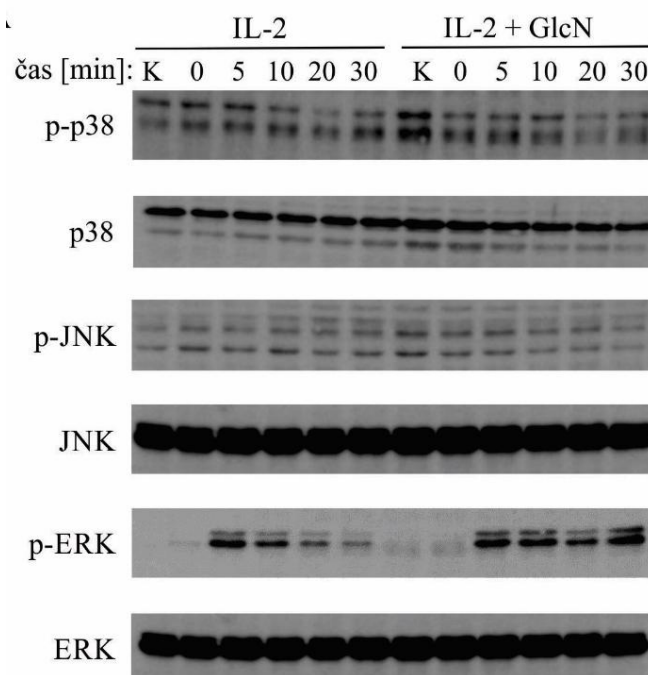
Slika 23: Delež polariziranih NK-92 celic. Graf prikazuje deleže polariziranih in nepolariziranih granul v NK-92 celicah v prisotnosti GlcN, ali pa brez njega. Izračuni so bili narejeni na podlagi podatkov pridobljenih z analizo več kot 60 konjugatov, kot so prikazani na sliki 22.



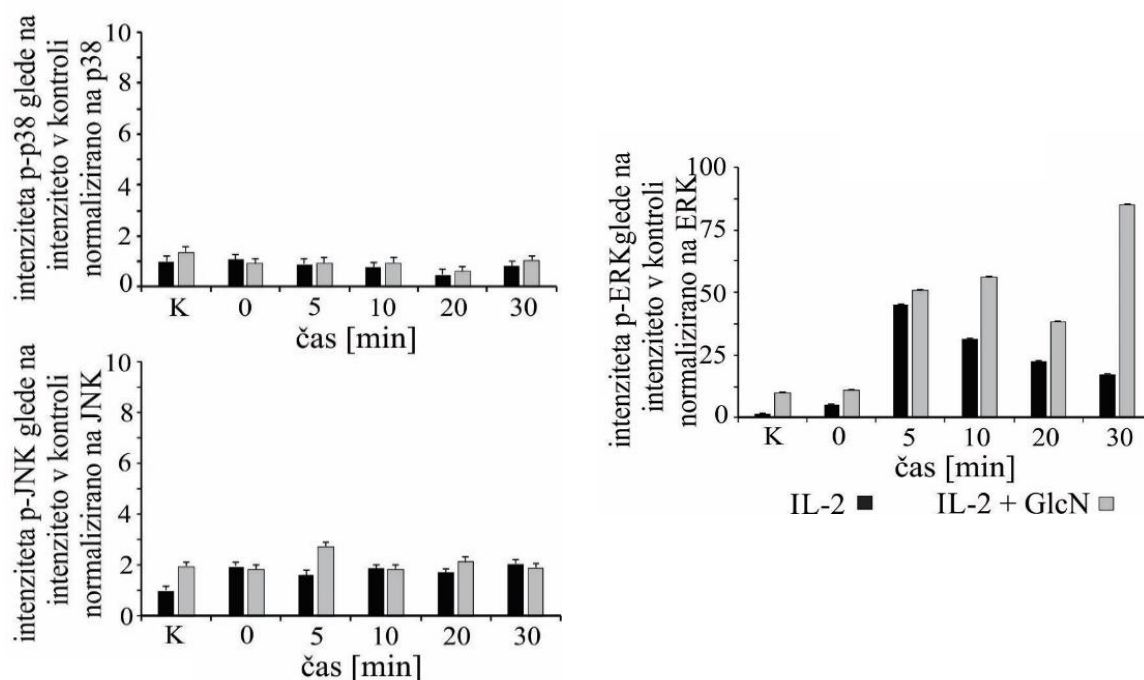
Slika 24: Imunodetekcija prforina kaže količino perforina v celičnih lizatih z ali brez GlcN. Aktin predstavlja kontrolo nanosa. Količina perforina se v celicah zaradi prisotnosti GlcN ni spremenila.

4.3.1 Glukozamin podaljša čas fosforilacije ERK kinaze

Na podlagi rezultatov dobljenih pri mikroskopiranju smo sklepali, da GlcN vpliva na mehanizem premikanja granul, zato smo preverili njegov vpliv na glavne kinaze, ki sodelujejo v procesu fokusiranja granul proti tarčni celici. NK-92 celice smo različno dolgo aktivirali z IL-2, ki je znan aktivator NK celic (K. S. Wang in sod., 1999), in nato s prenosom po Westernu preverjali fosforilacijo treh kinaz (slika 25). Ugotovili smo, da glukozamin ne vpliva bistveno na fosforilacijo JNK (p-JNK), niti na p38 kinaze (p-p38). Prav tako IL-2 ne aktivira JNK in p38 kinaze, vendar le ERK kinazo. V kontrolnih celičnih lizatih NK-92 celic ob dodatku IL-2, pride že v petih minutah do močne fosforilacije ERK kinaze (p-ERK), nakar se zopet hitro defosforilira. V primeru, ko so bile celice predhodno inkubirane z GlcN, smo ugotovili, da GlcN vpliva na kinetiko fosforilacije ERK kinaze tako, da podaljša trajanje prisotnosti fosforilirane oblike ERK. Spremembe količine fosforiliranih oblik kinaz, dobljenih z imunodetekcijo, smo ovrednotili še denzitometrično (slika 26).



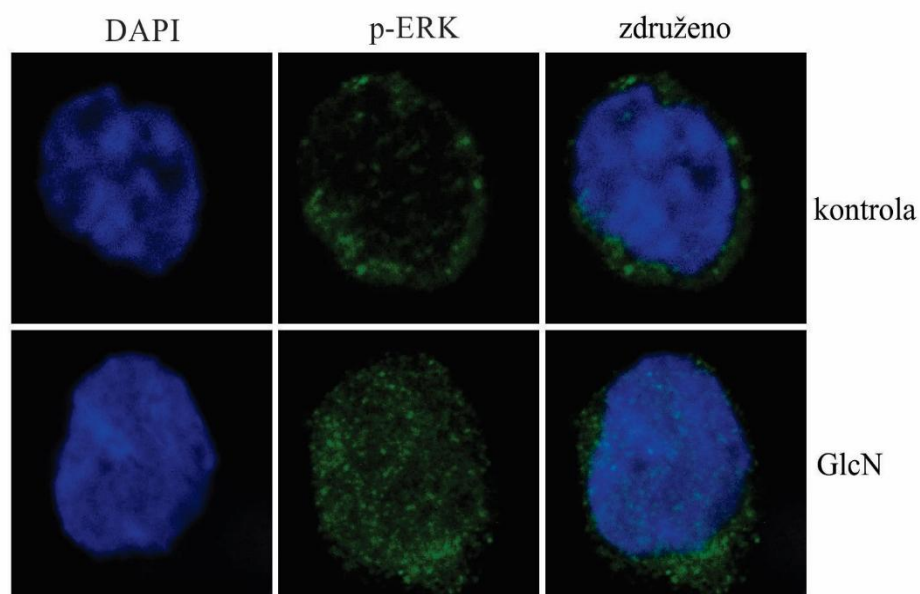
Slika 25: Časovna odvisnost aktivacije NK-92 celic z IL-2 ter vpliv prisotnosti GlcN na fosforilacijo MAP kinaz. Imunodetekcije prikazujejo fosforilacijo p38 (p-p38), JNK (p-JNK) in ERK (p-ERK) kinaze ter njihove ne-fosforilirane oblike, p38, JNK, ERK, ki so hkrati tudi kontrola nanosa količine proteinov na elektroforezni gel. Zelo opazna je časovna sprememba fosforilacije p-ERK, ki pa se ne defosforilira ko celice rastejo v prisotnosti GlcN.



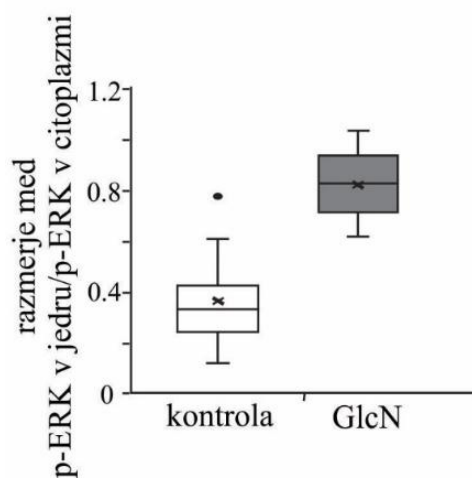
Slika 26: Denzitometrično določevanje fosforilacije MAP kinaz. S pomočjo programa ImageJ smo denzitometrično ovrednotili imunodetekcije iz slike 25 ter jih prikazali kot intenziteto kinaze glede na intenziteto v kontroli normalizirano na ne-fosforilirano obliko kinaze.

4.3.2 Glukozamin povzroči premestitev fosforilirane ERK kinaze v jedro

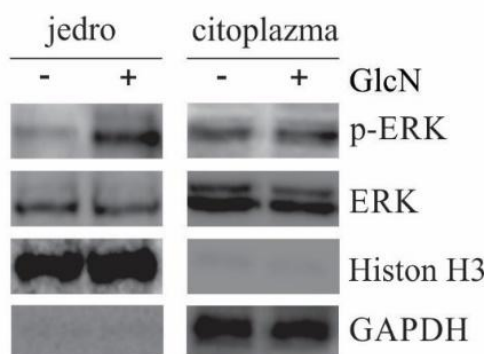
Rezultati določevanja spremembe količine p-ERK in ugotovitev, da GlcN podaljša čas fosforilacije ERK kinaze, smo preverili ali to povzroči premestitev ERK kinaze v jedro. Lokalizacijo smo določali s konfokalnim mikroskopom (slika 27) in pri tem potrdili pričakovanje, da prisotnost GlcN v mediju povzroči premestitev p-ERK v jedro NK-92 celic. Slike pridobljene z mikroskopiranjem smo kvantificirali s pomočjo ImageJ programa in prikazali razmerje med p-ERK v jedru in p-ERK v citoplazmi kontrolnih NK-92 celic gojenih brez GlcN in v NK-92 celic, ki so rastle v prisotnosti GlcN (slika 28). Za potrditev translokacije pa smo naredili tudi jedrne lizate NK-92 celic, v katerih se vidi povišanje p-ERK pri celicah z dodanim GlcN v primerjavi s kontrolnimi celicami (slika 29).



Slika 27: GlcN povzroči premik p-ERK v jedro. Reprezentativna slika lokalizacije p-ERK (zeleno) v aktiviranih kontrolnih NK-92 celicah in v aktiviranih celicah, ki so rastle v prisotnosti GlcN.



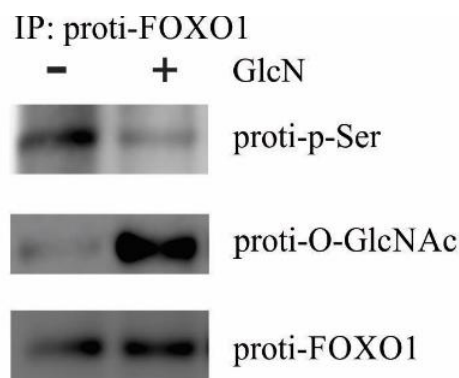
Slika 28: Vpliv GlcN na razmerje med p-ERK v jedru in p-ERK v citoplazmi aktiviranih NK-92 celic. Statistična analiza je bila narejena na 60 individualnih celicah na treh neodvisnih mikroskopskih vzorcih.



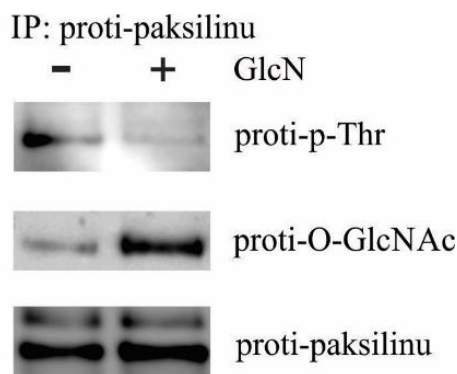
Slika 29: Imunodetekcija p-ERK in ERK v jedrnih in citosolnih lizatih celic NK-92, ki so rastle brez prisotnosti GlcN (-) ali v prisotnosti GlcN (+). Histon H3 predstavlja kontrolo nanosa za jedro, GAPDH pa kontrolo nanosa za citosol.

4.3.3 Glukozamin vpliva na fosforilacijo FOXO1 in paksilina

Na podlagi rezultatov o podaljšani fosforilaciji ERK kinaze v vzorcih z GlcN, smo raziskali vpliv GlcN na faktorje, ki so udeleženi v signalne poti pred in po delovanju ERK NK-92 celic. Tako smo preverili ali prisotnost GlcN vpliva na fosforilacijo transkripcijskega faktorja FOXO1, ki je v signalni poti pred ERK. S pomočjo imunoprecipitacije FOXO1 in nato imunodetekcije fosforiliranih serinov ter O-GlcNAc smo ugotovili, da GlcN zniža delež fosforiliranega FOXO1 in zviša delež njegove O-glikozilacijske oblike (slika 30). Na enak način smo preverili tudi vpliv GlcN na paksilin, ki je v signalni poti za ERK. Pokazali smo, da GlcN tudi v tem primeru zniža delež fosforiliranega paksilina in zviša delež njegove O-glikozilacijske oblike (slika 31).



Slika 30: Vpliv GlcN na delež fosforilirane oblike FOXO1. Imunoprecipitacijo (IP) FOXO1 transkripcijskega faktorja iz lizatov aktiviranih NK-92 celic brez prisotnosti GlcN (-) smo primerjali z deležem fosforilirane oblike FOXO1 celic gojenih v prisotnosti GlcN (+). Temu je sledila primerjava fosforiliranih serinov (p-Ser) ter O-glikoziliranih serinov/treoninov (O-GlcNAc). Imunodetekcija FOXO1 je služila kot kontrola nanosa imunoprecipitiranega proteina.

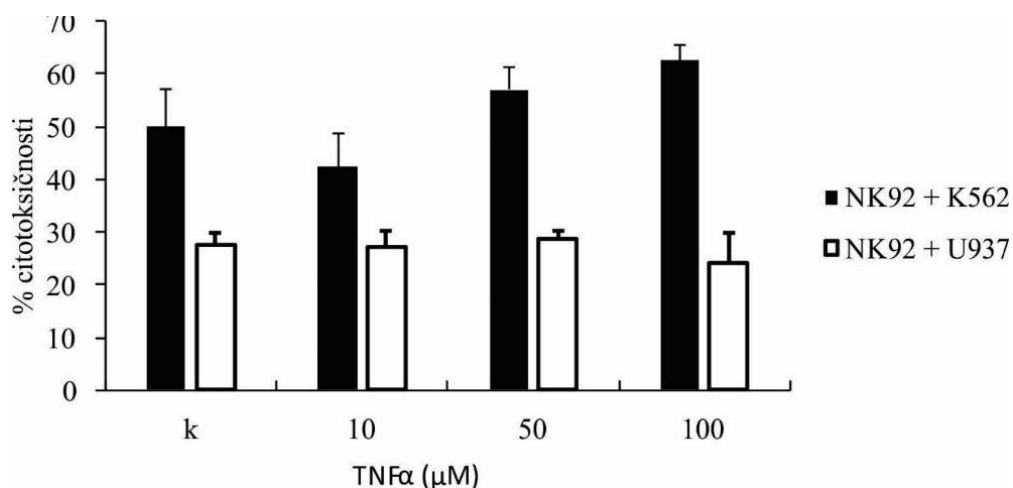


Slika 31: Vpliv GlcN na delež fosforilirane oblike paksilina. Imunoprecipitacijo (IP) paksilina iz lizatov aktiviranih NK-92 celic brez prisotnosti GlcN (-) smo primerjali z deležem fosforilirane oblike paksilina celic gojenih v prisotnosti GlcN (+). Temu je sledila primerjava fosforiliranih treoninov (p-Thr) ter O-glikoziliranih serinov/treoninov (O-GlcNAc). Imunodetekcija paksilina je služila kot kontrola nanosa imunoprecipitiranega proteina.

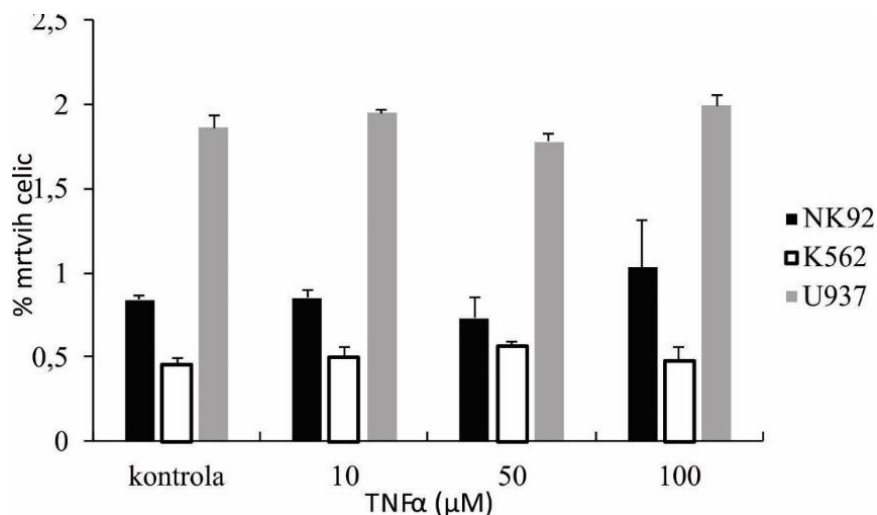
4.4 Vpliv $\text{TNF } \alpha$ na citotoksičnost NK-92 celic in na celično smrt U937

4.4.1 $\text{TNF } \alpha$ ne vpliva na citotoksičnost NK-92 celic

Poleg GlcN bi lahko imeli vpliv tudi drugi dejavniki. Preverjali smo ali citokin $\text{TNF } \alpha$, ki ga izločajo NK celice vpliva na njihovo citotoksičnost. NK-92 celicam smo za 4 ure dodali različne koncentracije $\text{TNF } \alpha$ nato smo izvedli 4h test citotoksičnosti s K562 in U937 tarčnimi celicami. K562 celice so znane kot občutljive tarče za citotoksičnost NK-92 celic, medtem ko U937 niso občutljive na citotoksičnost NK-92 celic. Ugotovili smo, da je kontrolna citotoksičnost NK-92 celic na K562 celice okoli 50% (slika 32) in se le bežno dvigne, medtem ko je citotoksičnost NK-92 celic na U937 pri vseh koncentracijah $\text{TNF } \alpha$ le 27 % (slika 32). Ugotovili smo, da $\text{TNF } \alpha$ ni imel vpliva na posamezne celične linije.



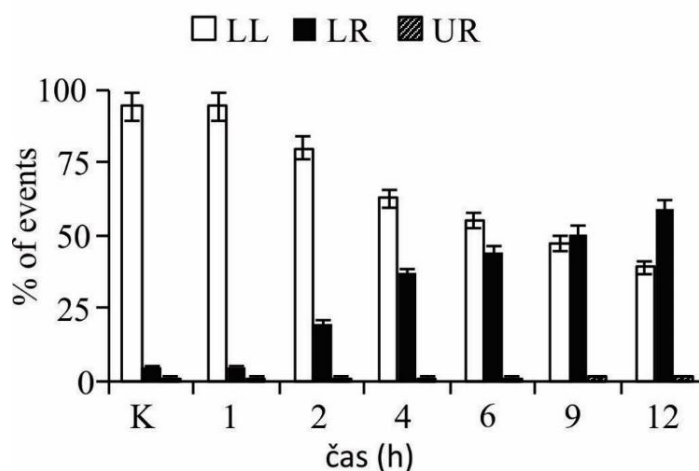
Slika 32: Vpliv $\text{TNF } \alpha$ na citotoksičnost NK-92 celic. Citotoksičnost NK-92 celic na tarčne celice K562 in na tarčne celice U937 v prisotnosti različnih koncentracij $\text{TNF } \alpha$.



Slika 33: Vpliv $\text{TNF}\alpha$ na NK-92, U937 in K562 na viabilnost celičnih linij. Odstotek PI pozitivnih celic v kontrolnih celicah in celicah po dodatku različnih koncentracij $\text{TNF}\alpha$.

4.4.2 $\text{TNF}\alpha$ skupaj s cikloheksimidom (CHX) povzroči apoptozo U937

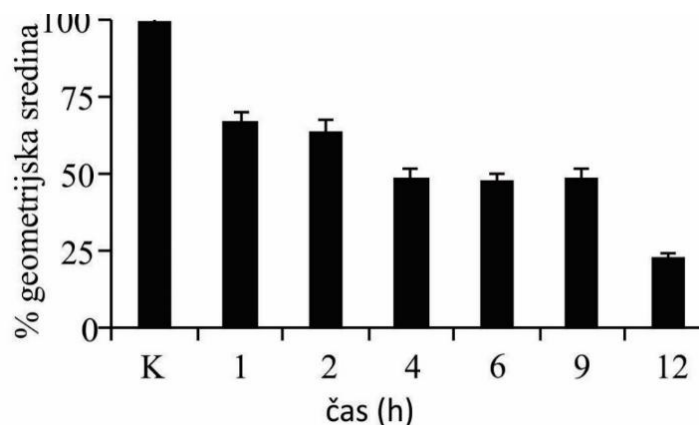
Celični liniji U937 smo dodali 10 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ in 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX-a ter inkubirali v časovnem okviru med 1 uro in 12 urami. Nato smo na pretočnem citometru izvedli test določanja apoptotskih celic s pomočjo barvil Annexin V ter PI (slika 34). Ugotovili smo, da kombinacija $\text{TNF}\alpha$ in CHX sproži zgodnje apoptotske dogodke po 4 urah, po 12 urah pa je apoptotskih celic kar 60 %. S tem smo pokazali, da je apoptoza sprožena s $\text{TNF}\alpha$ odvisna od časa inkubacije.



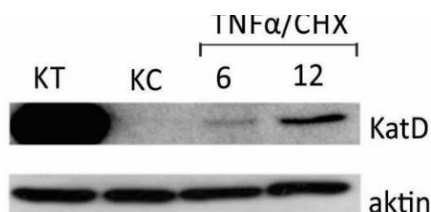
Slika 34: $\text{TNF}\alpha$ v kombinaciji s CHX sproži apoptozo celične linije U937. Graf prikazuje odstotek živih celic (LL), ki so negativne na aneksin in PI. LR predstavlja zgodnje apoptotske celice, ki so pozitivne na aneksin in negativne na PI. UR, predstavlja poznoapoptotske oziroma mrtve celice, ki so pozitivne na aneksin in PI.

4.4.2.1 Apoptoza povzročena s $\text{TNF}\alpha$ povzroči poškodbe na lizosomih in sprostitvev katepsina D v citoplazmo

Glede na znane podatke (B. Turk in Turk, 2009), da med apoptozo pride do poškodb organel in sprostitvev njihove vsebine v citoplazmo, smo preverili integriteto lizosomov po sprožitvi apoptoze s $\text{TNF}\alpha$. Spremljali smo zmanjševanje fluorescence barvila akridin oranž, ki obarva kisle lizosome in ob njihovi poškodbi izgublja intenziteto. Pokazali smo (slika 35), da se poškodbe na lizosomih pojavijo že po prvi uri inkubacije s $\text{TNF}\alpha$, po 12 urah pa so ti popolnoma poškodovani. V skladu s poškodbo lizosomov smo pokazali, da se katepsin D počasi sprošča iz lizosomov, saj smo detektirali znižano vsebnost encima po 6 in 12 urah v primerjavi s kontrolo (slika 36).



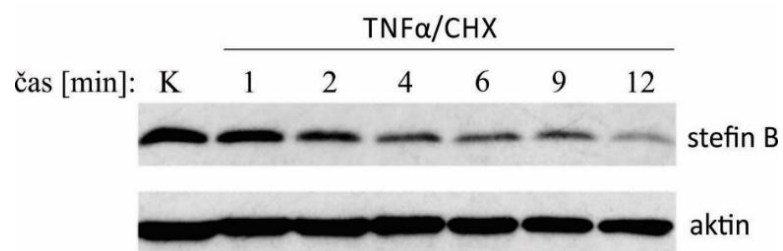
Slika 35: Vpliv $\text{TNF}\alpha$ /CHX na integriteto lizosomov v celicah U937. Odstotno zmanjšanje fluorescence prevzetega barvila akridin orange ob poškodbi lizosomalne membrane. Prikazan je odstotek spremembe geometrijske sredine intenzitete fluorescence, glede na fluorescenco v kontroli (K).



Slika 36: Imunodetekcija katepsina D v celičnih lizatih U937 celic med apoptozo sproženo s $\text{TNF}\alpha$ /CHX. Prikazali smo imunodetekcijo katepsina D v citosolnih lizatih po 6 in 12 urah tretmaja s $\text{TNF}\alpha$ /CHX. KT predstavlja kontrolni totalni lizat, KC predstavlja kontrolni citosolni lizat. Aktin služi kot kontrola nanosa proteinov na elektroforezo.

4.4.2.2 Med apoptozo sproženo s $\text{TNF}\alpha$ pride do razgradnje stefina B

Glede na to, da se zaradi poškodbe lizosomov iz njih sprošča katepsin D, za katerega je znano, da *in vitro* in *ex vivo* razgrajuje citosolni inhibitor cisteinskih katepsinov stefin B, smo spremljali razgradnjo tega inhibitorja med apoptozo povzročeno s $\text{TNF}\alpha$ (slika 37). Pokazali smo, da se razgradnja stefina B začne po 4 urah, po 12 urah pa smo zaznali le še manjši delež stefina B.



Slika 37: Imunodetekcija katepsina D v totalnih lizatih U937 celic pri različnih časih tretiranja celic s $\text{TNF } \alpha$ /CHX. K predstavlja kontrolni lizat, aktin služi kot kontrola nanosa proteinov na elektroforezo.

Poglavje 5

Razprava

Z imunskim sistemom se telo obrani proti različnim patogenom, ki ogrožajo naše zdravje. Za uspešno obrambo telesa je potrebna hitra prepoznavna tujka, zaustavitev njegovega delovanja in optimalna odstranitev. Imunski sistem je eden od najbolj kompleksnih in natančno reguliranih sistemov človeškega telesa (Delves in Roitt, 2000; Parkin in Cohen, 2001). Pomemben del prirojenega imunskega sistema so tudi NK celice, ki imajo zmožnost lize tarčnih celic in so hkrati tudi zgodnji vir imunoregulatornih citokinov. NK celice so prva in ena glavnih obramb telesa proti rakastim in z virusi okuženimi celicami. Njihova citotoksičnost proti tarčnim celicam je natančno reguliran proces, pri katerem pride do usmerjene eksocitoze citotoksičnih granul v imunološko sinapso, ki se tvori med NK in tarčno celico. Napake v delovanju imunskega sistema privedejo do napak v citotoksičnosti NK celic. Njihovo poznavanje pomaga pri razumevanju kompleksnega molekularnega mehanizma delovanja NK celic, hkrati pa izpostavi, kako zelo pomembno vlogo imajo NK celice pri obrambi telesa. Bolezni kot so Wiskott-Aldrich sindrom, Hermansky-Pudlak sindrom, FHL3, FHL4 in vrsta drugih dednih napak, imajo napako v delovanju eksocitoze citotoksičnih granul (Topham in Hewitt, 2009). Zaradi te napake izgubijo citotoksične sposobnosti, kar ima resne imunološke posledice, kot je pomanjkljiva odstranitev rakastih celic ali pa z virusi okuženih celic, kar lahko privede tudi do močnega vnetnega odziva, ki lahko ogrozi življenje človeka (Topham in Hewitt, 2009). Poleg genetskih napak v mehanizmu delovanja NK celic so ugotovili, da na citotoksičnost NK celic vpliva tudi vrsta drugih faktorjev kot so, IL-6 (Cifaldi in sod., 2015), substanca P (Shawver in sod., 2008), Herpes-virus protein (Ishido in sod., 2000), kronično vnetje s hepatitisom C (Lirussi in sod., 2002) in določena kemoterapevtska zdravila (vinblastine, paclitaxel, docetaxel, cladribine, chlorambucil, bortezomib in MG-132) (Markasz in sod., 2007). Glede na te podatke in možne posledice, ki jih lahko ima inhibicija NK celic, je vpliv različnih spojin na delovanje NK celic velikega pomena.

V doktorski nalogi smo raziskovali vpliv GlcN na celice imunskega sistema, bolj natančno na celice naravne ubijalke in na njihovo citotoksičnost. Raziskavi smo dodali še vpogled v vpliv eksogenega TNF α na citotoksičnost NK celic in na promonocitne U937 celice. Glukozamin je široko uporabljeno prehransko dopolnilo, ki ga uporabljajo predvsem starejši za lajšanje bolečin pri osteoartritisu. Učinki GlcN niso potrjeni, različne klinične študije o njegovih učinkih pa so kontradiktorne. V največ primerih se GlcN zaužije, zato je njegov učinek sistemski in ne le na tarčnem področju, vendar vpliv GlcN na ostale sisteme/organe ni dobro raziskan. Prav tako je le malo študij o mehanizmu delovanja GlcN na različne celične tipe. Poleg kliničnih raziskav obstajajo tudi študije, ki prikazujejo, da ima GlcN imunosupresiven učinek (Forchhammer in sod., 2003; Ma in sod., 2002). V teh raziskavah so pokazali, da GlcN inhibira množenje CD4 T celic, nastanek aloreaktivnih citotoksičnih T limfocitov in sekrecijo IFN- γ ter IL-5 v primarnih limfocitih. GlcN prav tako inhibira sekrecijo IL-4 ter IL-5 v sekundarnih T celicah pomagalkah. Pokazali so tudi, da so dendritične celice tretirane z GlcN izgubile 80% sposobnosti antigenske predstavitve. GlcN ima tudi sposobnost preprečiti stimulacijo celic z IL-4 in IL-2 in znižati citotoksično aktivnost TNF- α (Forchhammer in sod., 2003). Študije so pokazale, da GlcN preko NF- κ B poti vpliva tudi na izražanje vnetnih faktorjev TNF- α , INF- γ in IL-1 β (d'Abusco in sod., 2007; Imagawa in sod., 2011).

Pri doktorskem delu smo predpostavili, da GlcN vpliva na delovanje imunskih celic. Rezultati naših raziskav so pokazali, da GlcN znižuje citotoksičnost NK celic, ta inhibicija citotoksičnosti pa je reverzibilna in koncentracijsko odvisna. Za razliko od GlcN, GlcNAc pri enakih koncentracijah nima vpliva na NK celice. Ti rezultati so v skladu z raziskavo iz 90 let, kjer

so ugotovili, da amino sladkorji signifikantno zmanjšajo citotoksičnost NK celic in da acetilirane oblike amino sladkorjev nimajo te lastnosti (Yagita in sod., 1989). Vendar je ta raziskava učinek samo opisala, niso pa določili molekularnega mehanizma po katerem amino sladkorji delujejo na celice. V člankih so avtorji predlagali, da GlcN zmanjša citotoksičnost zaradi znižanja nivoja ATP energije v celici, ki je nujno potreben za pravilno premikanje granul (Yagita in sod., 1989).

Po gojenju NK-92 celic v mediju z dodatkom različnih koncentracij GlcN, smo izmerili inhibitorne učinke pri 2,5 mM koncentraciji, do popolne inhibicije pa je prišlo pri 10 mM koncentraciji GlcN. Uporabljena koncentracija GlcN v mediju, ki je imela učinek je tisočkrat višja kot izmerjena koncentracija v krvi pacientov, ki so prijemali priporočeno dnevno koncentracijo GlcN (1,5g/dan) (Persiani in sod., 2007). Vendar je v celičnem mediju koncentracija glukoze (25 mM) tudi višja kot v krvi, kar delno razloži zakaj je odziv celic pri tako visoki koncentraciji GlcN, saj mora za vstop v celico tekrovati z glukozo. GlcN vstopa v celico preko glukoznih transporterjev GLUT1, GLUT2 in GLUT4 (Uldry in sod., 2002). Afiniteta transporterjev GLUT1 in GLUT4 do GlcN je tri do štirikrat nižja kot do glukoze, višjo afiniteto do GlcN ima le GLUT2 (Uldry in sod., 2002). Tudi sicer se za namen študij celičnih mehanizmov uporabljajo koncentracije GlcN v mM območju, kakršne so bile uporabljene tudi v naših poskusih (J. S. Hwang in sod., 2017; Ma in sod., 2002).

Po dobljenih rezultatih inhibicije citotoksičnosti NK celic smo ugotavljali, kako dolgotrajen je efekt imunosupresije z GlcN. Ugotovili smo, da je učinek GlcN na NK celice reverzibilen. V primeru, ko smo NK celicam med citotoksičnostjo odvzeli GlcN se je citotoksičnost delno obnovila, kar pomeni, da je učinek GlcN zelo dinamičen in se ob zmanjšani dozi lahko izniči. To potrjujejo tudi klinične študije, kjer so ugotovili, da GlcN največji učinek pri pacientih doseže po rednem jemanju več mesecev (Henrotin in sod., 2014).

Številne študije poročajo o vpletenosti cisteinskih in aspartatnih katepsinov v pridobljenem imunskem odgovoru. Katepsini niso udeleženi le pri prirojenem imunskem sistemu, ampak tudi pri pridobljenem. Najbolj je raziskana vloga cisteinskih katepsinov pri regulaciji antigenske predstavitve preko MHC razreda II. Katepsina L in S sta ključna encima pri procesiranju invariantne verige (Ii), ki blokira vezavno mesto za peptide na MHC II molekuli. Katepsini postopno procesirajo invariantno verigo v peptid povezan z invariantno verigo razreda II (CLIP) (Beers in sod., 2003; Ogrinc in sod., 1993). Katepsin S je ključen za odstranitev Ii pri B celicah in dendritičnih celicah, katepsin L pa pri epiteljskih celic timusa (Beers in sod., 2003). Cisteinski katepsin sodelujejo tudi pri procesiranju antigenov v antigenske peptide. Pri tem procesu sodelujeta predvsem katepsin F in katepsin S (Nanut in sod., 2014). Katepsini imajo pomembne vloge tudi v prirojenem imunskem odgovoru, predvsem pri apoptozi imunskih celic, od česar je odvisna resolucija vnetja (Conus in Simon, 2010). Na primer, katepsin D je ključen pri apoptozi nevtrofilcev, saj lahko direktno cepi kaspazo 8 (Conus in sod., 2008). Pri pomanjkanju katepsina D pride do apoptoze nevtrofilcev kasneje, kar *in vivo* podaljša proces vnetja in s tem resolucijo prirojenega imunskega odziva. V apoptozo imunskih celic je vključen tudi katepsin B. Ta se ob apoptozi nevtrofilcev, induciranih z mikrobi, sprosti iz lizosomov v citosol, kjer cepi Bid in tako sproži apoptozo (Blomgran in sod., 2007). Katepsini imajo vlogo tudi pri aktivaciji primarnega imunskega odziva na mikrobno okužbo v dendritičnih celicah. Katepsin B, L, S, F in K namreč sodelujejo pri procesiranju TLR7 in TLR9 receptorja. Če ta dva nista procesirana, ne zaznavata določenih antigenov (Ewald in sod., 2008). Katepsin X sodeluje v imunskem sistemu tako, da pomaga pri razvoju dendritičnih celic, adheziji makrofagov in migraciji T celic. Prav tako so številne študije pokazale, da je lokalizacija in substratna specifičnost katepsinov vključena v regulacijo citotoksičnosti NK celic. Na primer katepsin W je predominantno izražen v NK celicah, ker ima vlogo pri proteolitičnem procesiranju v ER (Nanut in sod., 2014). Najbolj pomemben od katepsinov v tem procesu je katepsin C, vendar tudi ta ni esencialen za citotoksičnost (Sutton in sod., 2007). Katepsin C se nahaja v citotoksičnih granulah (Sutton in sod., 2007), to smo na sliki 20B potrdili tudi mi s kolokalizacijo katepsina C in perforina, kjer sodeluje pri proteolizni aktivaciji grancimov (Brown in sod., 1993). Drug katepsin, ki je vključen v procesiranje glavnih akterjev citotoksičnosti in je prav tako lokaliziran v granulah je katepsin L, ki lahko proteolizno aktivira perforin (Konjar in sod., 2010). Poleg teh dveh cisteinskih katepsinov pa smo v naše delo vključili še aspartatni katepsin E, ki je v NK celicah visoko izražen (Zelesnik in sod., 2015), vendar njegova vloga niti lokalizacija nista znani. Študija iz leta 1991 je pokazala, da GlcN *in vitro* zelo šibko inhibira katepsin B in papain, saj je K_i v mM območju (Giordano in sod., 1991). Glede na to študijo in poznavanje delovanja katepsinov smo postavili delovno hipotezo in preverili vpliv GlcN na encimsko aktivnost, saj v preliminarne raziskavah do sedaj nismo zasledili inhibicije encimov

z GlcN. Predpostavili pa smo, da je ta vpliv lahko indirekten. Naša ugotovitev, da prisotnost GlcN ne vpliva na aktivnost rekombinantnih katepsinov C, L in E, se pa spremeni aktivnost katepsinov v celičnih lizatih NK celic aktiviranih z IL-2, je bila izhodišče za nadaljnje, poglobljene študije. Hkrati so nas ti rezultati spodbudili, da smo poskuse razširili in opazovali lokalizacijo katepsinov med procesom citotoksičnosti.

Pri gojenju NK celic smo uporabljali IL-2, ki je znan aktivator citotoksičnosti (K. S. Wang in sod., 1999; T. K. Yu in sod., 2000), za merjenje aktivnosti pa smo uporabili fluorogene peptidne substrate Z-Phe-Arg AMC, KYS-1, H-Gly-Phe AMC. Podrobne meritve aktivnosti katepsinov v celičnih lizatih so pokazale, da GlcN za 50 ali več odstotkov zmanjša njihovo intracelularno aktivnost. Ker pa GlcN kljub presežku GlcN v *in vitro* reakciji ne inhibira rekombinantne katepsine, smo sklepali, da je njegov vpliv na katepsine in na njihovo celično aktivnost indirekten. Po merjenju aktivnosti katepsinov v celicah, smo določili še spremembo njihove aktivnosti v mediju NK-92 celic. V mediju, ki mu je bil dodan GlcN se je aktivnost katepsina C povečala. Na žalost pa v mediju nismo mogli zaznati aktivnosti drugih cisteinskih katepsinov, oz. katepsina L, niti katepsina E. Za katepsin E smo predvidevali, da je bila koncentracija encima prenizka, da bi jo lahko zaznali, katepsin L pa se izven celice, v nevtralnem pH hitro inaktivira (B. Turk in sod., 1993). Znižanje aktivnosti v celičnih lizatih in zvišana aktivnost encima v celičnem mediju, kaže na to, da se encimi izločajo iz celice. Katepsina C in katepsin E v NK2 celicah nista kolokalizirana. Katepsin C se namreč nahaja v citotoksičnih granulah, kar smo na sliki 20B tudi dokazali s kolokalizacijo perforina in katepsina C. Katepsin E pa je lokaliziran v endosomih NK-92 celic (Sastradipura in sod., 1998). GlcN vpliva na lokalizacijo obeh katepsinov, signal katepsina C in katepsina E je bil v z GlcN tretiranih celicah nižji, prav tako sta oba pri tretiranih celicah bolj razpršena. V skladu z rezultati, ki smo jih dobili z mikroskopiranjem, smo nižjo količino katepsina E in katepsina C v vzorcih z GlcN pokazali tudi na imunoprenosu (slika 18).

Vsi katepsini so N-glikozilirani (V. Turk in sod., 2012), prav tako je znano, da N-glikozilacija regulira znotrajcelično lokalizacijo katepsinov (Niwa in sod., 2012; V. Turk in sod., 2012). Raziskave kažejo, da GlcN lahko spremeni N-glikozilacijo CD25 v T celicah, kar se kaže v zmanjšani molekularni masi CD25. Ta raziskava nas je spodbudila, da preverimo vpliv GlcN na N-glikozilacijo katepsina C, kar bi lahko vodilo do spremembe njegove lokalizacije. V našem primeru GlcN ni vplival na tip N-glikozilacije katepsina C. V tem sklopu rezultatov smo pokazali, da GlcN ne vpliva direktno na katepsine, niti na spremembo nahajanja proteina zaradi spremembe tipa N-glikozilacije. Z mikroskopskimi študijami smo pokazali, da GlcN vpliva na spremembo lokalizacije citotoksičnih granul in endosomov. Poznano je, da ima njihova pravilna lokalizacija ključen pomen za citotoksičnost NK celic (MacNeil in Pohajdak, 2007; Topham in Hewitt, 2009).

Za potrditev hipoteze, da prisotnost GlcN prepreči polarizacijo citotoksičnih granul proti tarčni celici in s tem prepreči citotoksičnost NK celic, smo naredili serijo mikroskopij konjugatov NK in tračnih celic. Konjugate smo analizirali tako, da smo z imunodetekcijo označili perforin in nato NK celice razdelili na štiri dele ter intenziteto v četrtini, ki je v kontaktu s tarčno celico delili s celotno intenziteto perforina (Khaznadar in sod., 2014). Pokazali smo, da je v kontrolnih konjugatih 60% NK-92 celic polariziranih, medtem ko je bilo v konjugatih z dodanim GlcN le 2% polariziranih celic. Ta efekt glukozamina ni omejen le na NK-92 celice, ampak je verjetno splošen, saj smo zelo podobne rezultate dobili s konjugati mišjih primarnih NK celic in mišjih rakastih tarčnih celic 4T1. Analiza slik, dobljenih z meritvami na konfokalnem mikroskopu je pokazala, da je bilo tudi v teh kontrolnih konjugatih znatno večje število polariziranih NK celic kot v vzorcih tretiranih z GlcN. Polarizacija granul je natančno reguliran proces, pri katerem sodeluje vrsta kinaznih kaskad. Številna literatura dokazuje, da so za pravilno premikanje granul v NK celici odgovorne MAP kinaze (Chen in sod., 2007; Li in sod., 2008; Trotta in sod., 2000). Družina MAP kinaz je sestavljena iz ERK kinaze, JNK kinaze in p38. Te kinaze imajo v celicah pomembno vlogo pri celičnem razmnoževanju, apoptozi, onkogenezi, diferenciaciji, vnetju, celični migraciji in reorganizaciji citoskeleta (Cargnello in Roux, 2012). Pri NK celicah MAP kinaze sodelujejo pri polarizaciji in preorientaciji MTOC in citotoksičnih granul. Najprej je bila pri procesu polarizacije opisana signalna pot ERK kinaze, ki se aktivira in prenese signal preko kaskade PI3K-RAC1-PAK-MEK-ERK ter nato vpliva na paksilin (Chen in sod., 2007). Prav tako so pokazali, da ima tudi JNK pomembno vlogo pri aktivaciji NK celic in sicer preko signalne poti Src-PLC-JNK. Po stimulaciji NK celic z NKG2D se aktivirata tako JNK kot tudi ERK signalna pot, p38 pa naj v tem procesu ne bi igral ključne vloge. Vlogo kinaz v NK celicah so preučevali s pomočjo specifičnih inhibitorjev kinaz, ki so drastično zmanjšali citotoksičnost. Polarizacija NK celice lahko torej poteka preko

obeh poti. Katera pot aktivacije se aktivira, JNK ali ERK pot, je odvisno od receptorja, preko katerega aktivacija NK celice poteče. Za citotoksičnost NK celic mora pravilno delovati vsaj ena od obeh poti (Li in sod., 2008). Pokazali so, da IL-2 stimulira ERK, ne pa tudi p38 kinaze (T. K. Yu in sod., 2000). Ni pa podatkov ali IL-2 stimulira tudi JNK. Prvi smo pokazali, da IL-2 v NK-92 celicah aktivira le ERK kinazo, ne pa tudi JNK ali p38 kinaze. V naših pogojih smo stimulirali le AKT-PI3K-ERK signalno pot. GlcN ni vplival na JNK ali p38 kinazo, je pa zelo vplival na dinamiko in spremenil fosforilacijo/aktivacijo ERK kinaz. Že prej so pokazali, da GlcN lahko vpliva na ERK kinazo. Opisan je primer, ko GlcN vpliva na metabolizem hondrocitov in na razvoj OA, tako da vpliva na povišanje fosforilacije ERK kinaze (Wen in sod., 2010). Prav tako je bilo pokazano, da GlcN preko zmanjšane fosforilacije ERK kinaze vpliva na degranulacijo mastocitov in tako zmanjša vnetje v ušesih (S. Sakai in sod., 2010). V nobeni od naštetih raziskav pa ni GlcN vplival na dinamiko ERK kinaze, GlcN je namreč imel v različnih celicah drugačne učinke. Predvidevali smo, da je učinek GlcN na ERK kinazo celično specifičen. Ugotovili smo, da je signalna pot ERK kinaze regulirana glede na obseg in dolžino trajanja fosforilacije ter glede na lokalizacijo v celici (Wortzel in Seger, 2011). Fosforilacija ERK kinaze, ki je stimulirana z rastnimi faktorji, ima tipično prehodno fosforilacijo (Cirit in sod., 2010), kar je v skladu z našimi rezultati. V našem primeru smo v kontrolnih lizatih, po aktivaciji celic z visoko koncentracijo IL-2 (1000U/ml), pokazali hitro in močno aktivacijo ERK kinaze, ki je po 10 minutah že začela padati, po pol ure pa je bila stopnja fosforilacije že za več kot 50% nižja. V tem primeru je bil vpliv GlcN zelo očiten, saj je močno podaljšal trajanje fosforilacije v IL-2 aktiviranih celicah, stopnja fosforilacije se je po 30 minutah še nekoliko povečala. Študije na živčnem sistemu in na rakastih celicah jeter Hep3B so pokazale, da je ERK kinaza, ki je prehodno fosforilirana lokalizirana v citosolu in tako spodbuja proliferacijo celic. Tudi v tem primeru so pokazali, da je podaljšana fosforilacija ERK kinaze povzročila prestavitev fosforilirane kinaze v jedro in s tem je tudi preprečila proliferacijo (Colucci-D'Amato in sod., 2003; Z. Wang in sod., 2006). Cpd5 aktivirane Hep3B celice s podaljšano fosforilacijo ERK kinaze imajo znižano izražanje c-Myc (Z. Wang in sod., 2006). Druga raziskava pa je pokazala, da imajo NK celice, izolirane iz periferne krvi pacientov, obolelimi z različnimi tipi rakavih obolenj znižano izražanje C-Myc, s tem pa so imele te NK celice tudi okvarjeno sposobnost citotoksičnosti (Zakiryanova in sod., 2017). Iz naslednjega lahko sklepamo, da sta podaljšana fosforilacija ERK kinaze in zmanjšana citotoksičnost NK celic povezani. To pa potrjujejo tudi naši rezultati. V skladu z našimi rezultati je tudi raziskava, pri kateri so podaljšano oziroma konstitutivno fosforilacijo ERK kinaze odkrili v NK celicah pacientov z limfoproliferativno boleznijo granulocitov (LDGL). Te NK celice se nekontrolirano množijo in nimajo citotoksične sposobnosti (Epling-Burnette in sod., 2004). Rezultati so sovpadali z rezultati raziskave na Hep3B jetrnih celicah, ki je pokazala, da podaljšana fosforilacija ERK kinaze povzroči premik le te v jedro (Adachi in sod., 2002). Tudi v našem primeru je GlcN povzročil premik fosforilirane ERK kinaze v jedro. Posledica premika fosforilirane ERK kinaze v jedro je sprememba njenih substratov, v tem primeru so njegove tarče transkripcijski faktorji, ki naprej regulirajo izražanje proteinov kot so Elk1, c-Myc, c-Fos in Fra1 (Wainstein in Seger, 2016).

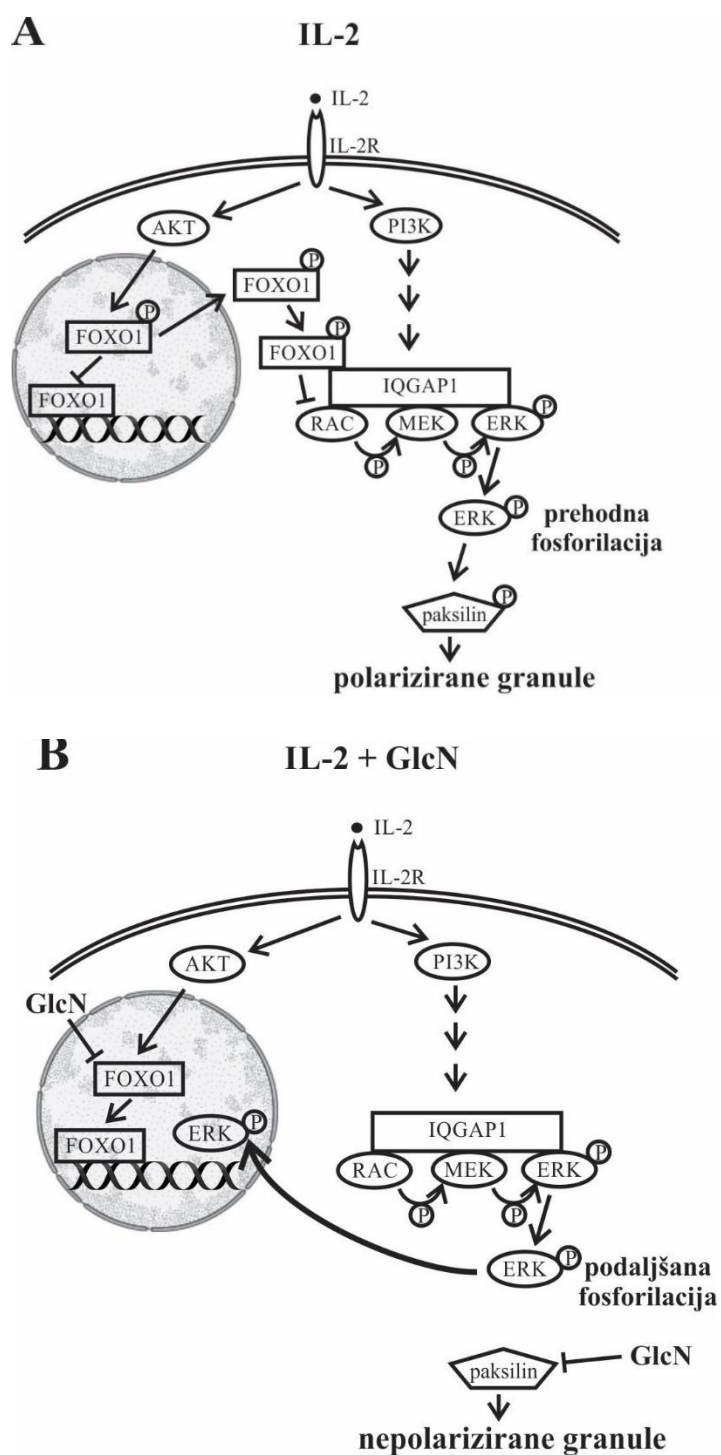
Glede na literaturo smo sklepali, da GlcN ne vpliva le na ERK kinazo, ampak tudi na fosforilacijo drugih proteinov v tej signalni poti ter na proteine, ki regulirajo to pot. FOXO1 je transkripcijski faktor in je znan po tem, da regulira ERK kinazo (Pan in sod., 2017). Po aktivaciji NK-92 celic z IL-2 se FOXO1 fosforilira (Y. Deng in sod., 2015), kar povzroči njegov premik v citosol. Tako zaustavi fosforilacijo ERK kinaze (Pan in sod., 2017). V primeru ko se serin 319 v FOXO1 ne fosforilira, ta ostane v jedru, s tem pa se prepreči vezava na IQGAP1, kar povzroči nekontrolirano fosforilacijo ERK kinaze. IQGAP1 je citoskeletna komponenta NK celic, ki je vključena v regulacijo citotoksičnosti. Utišanje IQGAP1 popolnoma prepreči citotoksičnost YTS celične linije in polarizacijo MTOC ter granul proti tarčni celici, vendar ne prepreči nastajanja konjugatov (Kanwar in Wilkins, 2011). Drugače povedano, naravne celice ubijalke prepoznajo tarčno celico, se nanjo vežejo, vendar je ne uničijo. Študija na mišjih NK celicah je pokazala, da IQGAP1 po aktivaciji NK celic tvori signalosom, na katerem se zaporedoma fosforilirajo RAC, MEK in ERK (Awasthi in sod., 2010). Naši rezultati so pokazali, da aktivacija NK-92 celic z IL-2 povzroči fosforilacijo serinov v FOXO1 in da GlcN prepreči njihovo fosforilacijo. Dodatno pa smo pokazali, da GlcN poviša O-glikozilacijo serinov v FOXO1, kar je tudi verjetno vzrok za znižanje fosforilacije. Do podobnih ugotovitev so prišli v raziskavi, kjer so pokazali učinek GlcN pri raku pljuč ravno zato, ker v rakastih celicah inhibira fosforilacijo FOXO1 in poviša njegovo O-GlcNAc, kar vpliva na ERK signalno pot (Z. Yu in sod., 2017). Več študij je pokazalo, da GlcN povzroči povišano O-glikozilacijo proteinov in s tem regulira različne molekularne mehanizme signalnih poti. Na

primer, GlcN zviša O-glikozilacijo Spl in tako zaščiti PTC (ledvične celice proksimalnih tubulov) pred hipoksijo (Suh in sod., 2014). GlcN prav tako poviša O-glikozilacijo inzulinskih receptorjev v RIN β -celicah ter tako povzroči povišano možnost za njihovo apoptozo (D'Alessandris in sod., 2004).

Poleg pripravljalnega faktorja pred ERK na signalni poti, smo preverili efekt GlcN tudi na paksilin, faktor navzdolj na signalni poti. Paksilin je ogrodni protein, ki je nujno potreben za pravilno polarizacijo NK celic (March in Long, 2011). Glede na to, da smo pokazali, da podaljšana fosforilacija ERK kinaze povzroči njen premik v jedro, smo pričakovali, da zaradi spremenjene lokalizacije ERK ne more oddati fosfatne skupine paksilinu. To hipotezo smo delno potrdili, saj smo pokazali, da se v z GlcN tretiranih celicah fosforilacija na treonilih paksilina zmanjša. Dodatno pa smo pokazali, da GlcN hkrati poviša O-glikozilacijo paksilina, kar pomeni, da ima GlcN direkten vpliv tudi na paksilin. Ti rezultati so v skladu z rezultati na podganjih inzulinskih INS-1 celicah, kjer so prav tako pokazali, da GlcN zniža fosforilacijo paksilina in s tem poveča njegovo O-glikozilacijo (Kwak in sod., 2010). Da bi lahko določili kateri vpliv doprinese več k znižani fosforilaciji paksilina, bi morali narediti še dodatne poskuse.

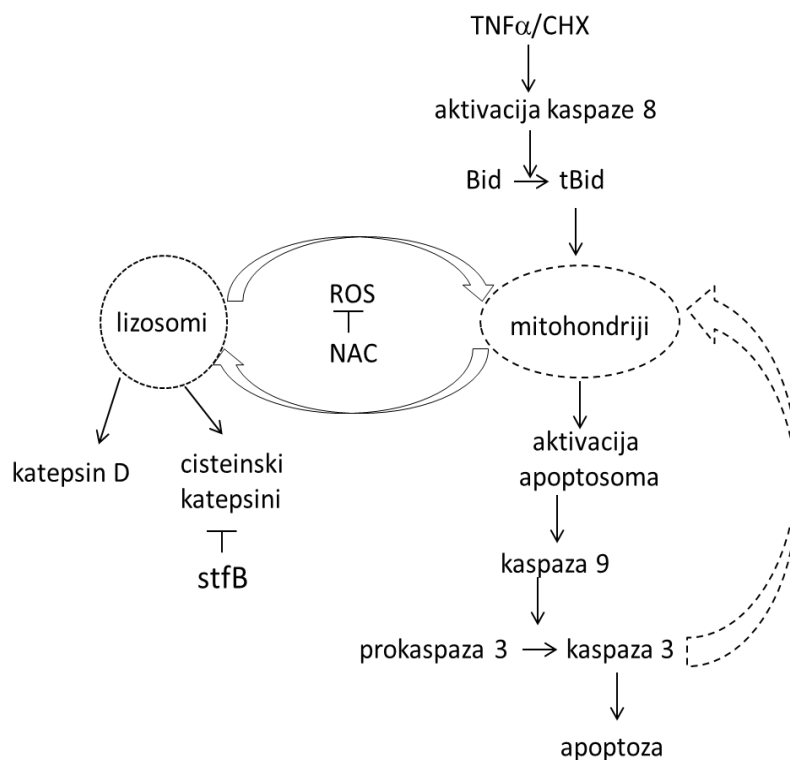
Celotne ugotovitve vpliva GlcN na NK celice smo strnili v poenostavljeni shemi na sliki 38, kjer glede na pridobljene rezultate predlagamo mehanizem delovanja GlcN na ERK signalno pot in s tem na citotoksičnost NK celic.

Poleg blagodejnih učinkov GlcN je pomembno, da preučujemo tudi njegove možne stranske učinke, saj se ob zaužitju GlcN nivo le tega v krvi precej poveča. Naša raziskava je pokazala, da visoke koncentracije GlcN povzročijo znižano citotoksičnost NK celic, ki so prva in pomembna obramba pred rakastimi in z virusi okuženimi celicami. Tako kot naša raziskava, obstajajo tudi druge, ki kažejo na možne negativne učinke GlcN. Za primer navajam raziskavo, kjer so ugotovili, da visoka koncentracija GlcN zniža splošno sintezo proteoglikanov, kar posledično znižuje tudi nastajanje matriksa, to pa je v popolnem nasprotju s trditvami proizvajalcev (Reine in sod., 2016). Vendar se moremo zavedati, da so to učinki, ki so pokazani na celičnih modelih in ne v *in vivo* sistemih, zato naša sklepanja ne smejo biti prenašljiva, saj so *in vivo* procesi precej bolj kompleksni. Za tovrstne dokaze so potrebne *in vivo* študije na živalih ali klinične študije.



Slika 38: Shematični prikaz vpliva GlcN na polarizacijo citotoksičnih granul NK-92 celic. **A.** Poenostavljena shema predstavlja IL-2 aktivirano polarizacijo citotoksičnih granul NK-92 celic. IL-2 povzroči aktivacijo AKT kinaze in PI3K signalne poti. PI3K s pomočjo kompleksa IQGAP1, RAC, MEK in ERK indirektno fosforilira ERK kinazo. Istočasno AKT kinaza povzroči fosforilacijo FOXO1, ki se nato premesti v citosol, kjer se veže na IQGAP1 in tako negativno regulira ERK kinazo. ERK kinaza je zato prehodno fosforilirana in prenese fosfatno skupino na paksilin, ki omogoči premikanje granul. **B.** GlcN zavre fosforilacijo FOXO1 in posledično FOXO1 ostane v jedru, kar povzroči podaljšano fosforilacijo ERK kinaze, zaradi česar se le-ta premesti v jedro. Hkrati GlcN vpliva tudi direktno na fosforilacijo paksilina.

Poleg vpliva GlcN na delovanje NK celic, smo želeli preveriti še vpliv TNF α na citotoksičnost NK celic. Pri tem smo morali preveriti tudi vpliv na preživetje samih NK celice in vpliv na preživetje tarčnih celic. NK celice namreč sproščajo velike količine TNF α , zato nas je zanimalo ali TNF α povratno vpliva na NK celice. Kadar NK celicam dodamo TNFR1 receptor, ki aktivira membranski TNF α na NK celicah, se citotoksičnost NK celic znatno poviša tudi proti celicam, ki sicer niso občutljive na citotoksičnost NK celic (M. X. Yu in sod., 2009). TNF α spodbudi adherenco NK celic na eEND2 tarčne celice, kar kaže na to, da TNF α pomaga novačiti NK celice in da vpliva na njihovo lokalizacijo v telesu (Pilaro in sod., 1994). V naših eksperimentih TNF α ni imel nikakršnega vpliva na citotoksičnost NK-92 celic pri delovanju na K562 tarčne celice. Te tarčne celice so zelo občutljive na citotoksično delovanje NK-92 celic. TNF α prav tako ni imel vpliva na citotoksičnost NK-92 celic proti U937 celicam, ki so manj občutljive tarče. Kot že pokazano, smo tudi mi potrdili, da TNF α nima vpliva na proliferacijo U937 celic (Cossarizza in sod., 1996). TNF α , prav tako nima vpliva na proliferacijo samih NK-92 celic niti na proliferacijo K562 tarčnih celic. Efekt je ostal nespremenjen tudi ob visokih koncentracijah TNF α . TNF α je sprožil apoptozo U937 celic le v kombinaciji s CHX (L. Wang in sod., 2008), kar smo pokazali tudi v naših eksperimentih. Apoptoza sprožena preko TNF α /CHX je bila časovno odvisna. V našem eksperimentu je bilo po 9h okoli 50% zgodnje apoptotskih celic, po 12 urah pa so te že prevladovali. Nekatere študije so predpostavile, da je permeabilizacija lizosomske membrane (LMP) in izpust lizosomske vsebine v citosol zgodnji dogodek v apoptozi sproženi preko TNF α (Guicciardi in sod., 2000; Heinrich in sod., 2004). Nasprotno trdijo raziskave, kjer so pokazali, da je izpust lizosomalne vsebine in nastanek kisikovih reaktivnih spojin dogodek, ki sledi permeabilizaciji mitohondrijske membrane (Huai in sod., 2013). Naši rezultati so pokazali, da se integriteta lizosomov nekoliko zniža že eno uro po sprožitvi apoptoze s TNF α /CHX, lizosomi pa so skoraj popolnoma uničeni po 12 urah. Do sproščanja lizosomske vsebine pride po 6 urah, po 12 urah pa se izpusti še več lizosomske vsebine. To smo pokazali z imunodetekcijo katepsina D v citosolu kar je v nasprotju s hipotezo, da je sproščanje katepsina D v naših eksperimentih odgovorno za cepljenje Bid proteina (Heinrich in sod., 2004). Pri LMP pride poleg sprostitve katepsina D tudi do izločanja cisteinskih katepsinov, ki imajo v citosolu škodljivo proteolitično aktivnost (Repnik in sod., 2012; V. Turk in sod., 2012). Delovaje katepsinov v citosolu regulirajo njihovi endogeni inhibitorji stefini in kininogeni. Dejstvo, da katepsin D lahko razgradi stefin B (Zeleznik in sod., 2015) nas je spodbudilo, da smo preverili količino stefina B med apoptozo, ki je bila sprožena z TNF α /CHX. Tako smo prvič pokazali, da se v apoptozi, ki je sprožena z TNF α /CHX, s časom postopno razgrajuje stefin B, intracelularni inhibitor cisteinskih katepsinov. Razgradnja stefina B bi lahko vplivala na ojačitev apoptoze sprožene s TNF α , vendar nismo uspeli pokazati, kaj je odgovorno za njegovo razgradnjo. Pridobljene rezultate smo strnili v shemi, ki prikazuje mehanističen vpogled na apoptozo sproženo s TNF α /CHX v U937 celicah.



Slika 39: Poenostavljen mehanizem apoptoze sprožene s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ v celicah U937. $\text{TNF}\alpha$ sproži apoptozo U937 preko aktivacije kaspaze 8. Aktivna kaspaza 8 cepi proapoptotski Bid protein v njegovo cepljeno obliko tBid, ki se nato premesti v mitohondrij, kjer sproži notranjo pot apoptoze. Med notranjo potjo apoptoz pride do permeabilizacije mitohondrijev in do nastanka ROS molekul, ki povzročijo permeabilizacijo lizosomalne membrane in izpust cisteinskih katepsinov in katepsina D v citosol. Ta proces spremlja tudi razgradnja stefina B (stfB). Endogenega inhibitorja cisteinskih katepsinov.

Poglavje 6

Zaključki

V doktorskem delu smo raziskali vpliv GlcN na NK celice in predlagali mehanizem njegovega delovanja. GlcN zmanjša citotoksičnost NK celic, ta vpliv je reverzibilen in je koncentracijsko odvisen. Pokazali smo, da GlcN ne vpliva direktno na lokalizacijo in aktivnost katepsina C in E, pač pa vpliva na polarizacijo citotoksičnih granul in endosomov. Potrdili smo, da se katepsin C nahaja v citotoksičnih granulah in prvi pokazali, da se katepsin E v NK celicah ne nahaja v citotoksičnih granulah. Prav tako smo prvi pokazali, da GlcN sproži izločanje teh dveh katepsinov iz NK celic. GlcN prepreči polarizacijo NK celic tako, da vpliva na signalne poti, ki so potrebne za polarizacijo. Sprva smo ugotovili, da GlcN povzroči podaljšano fosforilacijo ERK kinaze in posledično njeno premestitev v jedro, kar spremeni tudi substrate te kinaze. Vzrok za podaljšano fosforilacijo ERK kinaze je zmanjšanje fosforilacije transkripcijskega faktorja FOXO1, kar preprečuje fosforilacijo ERK kinaze. GlcN zmanjša fosforilacijo serinov na FOXO1, tako da poviša O-glikozilacijo serinom in treoninom. Dodatno smo pokazali, da GlcN vpliva tudi navzdol v signalni poti ERK kinaze, in sicer GlcN zmanjša fosforilacijo treoninov paksilina ter hkrati zviša njegovo O-glikozilacijo.

V doktorski disertaciji smo pokazali tudi, da topen TNF α ne vpliva na citotoksičnost NK celic proti K562 tarčnim celicam, niti proti U937 tarčnim celicam. Prav tako TNF α nima vpliva na viabilnost samih NK-92 celic, ali samih K562 in U937 celic. TNF α vpliva na celično linijo U937 le ob dodanem CHX, ko v celicah sproži apoptozo. Dodatno smo pokazali, da se med apoptozo, sproženo s TNF α /CHX, zmanjša integriteta lizosomske membrane, zaradi česar se sprosti lizosomska vsebina, kot so cisteinski katepsini in aspartatni katepsin D. Med tem procesom pride do postopne razgradnje stefina B, endogenega inhibitorja cisteinskih katepsinov.

NK celice so zelo pomembne za prvo obrambo našega telesa proti rakastim in z virusi okuženimi celicami, zato je pomembno preučevati vplive na njihovo citotoksičnost. V tej doktorski nalogi smo prispevali nova spoznanja na tem področju in predlagali mehanizem imunosupresivnega delovanja GlcN.

Literatura

- Adachi, T., Kar, S., Wang, M., & Carr, B. I. (2002). Transient and sustained ERK phosphorylation and nuclear translocation in growth control. *J Cell Physiol*, 192(2), 151-159. doi: 10.1002/jcp.10124
- Anderson, J. W., Nicolosi, R. J., & Borzelleca, J. F. (2005). Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food Chem Toxicol*, 43(2), 187-201. doi: 10.1016/j.fct.2004.11.006
- Appelqvist, H., Johansson, A. C., Linderöth, E., Johansson, U., Antonsson, B., Steinfeld, R., . . . Ollinger, K. (2012). Lysosome-Mediated Apoptosis is Associated with Cathepsin D-Specific Processing of Bid at Phe24, Trp48, and Phe183. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 42(3), 231-242.
- Arnold, D., Keilholz, W., Schild, H., Dumrese, T., Stevanovic, S., & Rammensee, H. G. (1997). Evolutionary conserved cathepsin E substrate specificity as defined by N-terminal and C-terminal sequencing of peptide pools. *Biol Chem*, 378(8), 883-891. doi: DOI 10.1515/bchm.1997.378.8.883
- Athauda, S. B., & Takahashi, K. (2002). Distinct cleavage specificity of human cathepsin E at neutral pH with special preference for Arg-Arg bonds. *Protein Pept Lett*, 9(1), 15-22.
- Athauda, S. B., Takahashi, T., Inoue, H., Ichinose, M., & Takahashi, K. (1991). Proteolytic activity and cleavage specificity of cathepsin E at the physiological pH as examined towards the B chain of oxidized insulin. *FEBS Lett*, 292(1-2), 53-56.
- Awasthi, A., Samarakoon, A., Chu, H. Y., Kamalakannan, R., Quilliam, L. A., Chrzanowska-Wodnicka, M., . . . Malarkannan, S. (2010). Rap1b facilitates NK cell functions via IQGAP1-mediated signalosomes. *Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1923-1938. doi: 10.1084/jem.20100040
- Barrett, A. J. (1977). Human cathepsin D. *Adv Exp Med Biol*, 95, 291-300.
- Beers, C., Honey, K., Fink, S., Forbush, K., & Rudensky, A. (2003). Differential regulation of cathepsin S and cathepsin L in interferon gamma-treated macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 197(2), 169-179. doi: 10.1084/jem.20020978
- Bhat, R., & Watzl, C. (2007). Serial Killing of Tumor Cells by Human Natural Killer Cells - Enhancement by Therapeutic Antibodies. *PLoS One*, 2(3). doi: ARTN e326 10.1371/journal.pone.0000326
- Biorn, C. A. (2016). Innate Immunity In M. G. Katze, M. J. Korth, G. L. Law & N. N. (Eds.), *Viral Pathogenesis* (3 ed., pp. 41-54). London: Tenney S. .
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., & Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*, 17, 189-220. doi: DOI 10.1146/annurev.immunol.17.1.189
- Blomgran, R., Zheng, L., & Stendahl, O. (2007). Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(5), 1213-1223. doi: 10.1189/jlb.0506359
- Blott, E. J., & Griffiths, G. M. (2002). Secretory lysosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(2), 122-131. doi: Doi 10.1038/Nrm732

- Bots, M., & Medema, J. P. (2006). Granzymes at a glance. *Journal of Cell Science*, 119(24), 5011-5014. doi: 10.1242/jcs.03239
- Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., & Jordans, S. (2008). Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie*, 90(2), 194-207. doi: 10.1016/j.biochi.2007.07.024
- Brown, G. R., McGuire, M. J., & Thiele, D. L. (1993). Dipeptidyl Peptidase-I Is Enriched in Granules of Invitro-Activated and Invivo-Activated Cytotoxic T-Lymphocytes. *Journal of Immunology*, 150(11), 4733-4742.
- Buchmann, K. (2014). Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. *Frontiers in Immunology*, 5. doi: Art 459
- 10.3389/Fimmu.2014.00459
- Burkhardt, J. K., Hester, S., Lapham, C. K., & Argon, Y. (1990). The Lytic Granules of Natural-Killer-Cells Are Dual-Function Organelles Combining Secretory and Pre-Lysosomal Compartments. *Journal of Cell Biology*, 111(6), 2327-2340. doi: DOI 10.1083/jcb.111.6.2327
- Busquets, L., Guillen, H., DeFord, M. E., Suckow, M. A., Navari, R. M., Castellino, F. J., & Prorok, M. (2006). Cathepsin E is a specific marker of dysplasia in APC mouse intestine. *Tumour Biol*, 27(1), 36-42. doi: 10.1159/000090154
- Calamia, V., Ruiz-Romero, C., Rocha, B., Fernandez-Puente, P., Mateos, J., Montell, E., . . . Blanco, F. J. (2010). Pharmacoproteomic study of the effects of chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 12(4), R138. doi: 10.1186/ar3077
- Cantor, A. B., & Kornfeld, S. (1992). Phosphorylation of Asn-linked oligosaccharides located at novel sites on the lysosomal enzyme cathepsin D. *Journal of Biological Chemistry*, 267(32), 23357-23363.
- Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K., & Morales, C. R. (2008). Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem Biophys Res Commun*, 373(2), 292-297. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.021
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2012). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases (vol 75, pg 50, 2011). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 496-496. doi: 10.1128/Mmbr.00013-12
- Chain, B. M., Free, P., Medd, P., Swetman, C., Tabor, A. B., & Terrazzini, N. (2005). The expression and function of cathepsin E in dendritic cells. *Journal of Immunology*, 174(4), 1791-1800.
- Chen, X., Trivedi, P. P., Ge, B. X., Krzewski, K., & Strominger, J. L. (2007). Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), 6329-6334. doi: 10.1073/pnas.0611655104
- Chesnokov, V., Sun, C., & Itakura, K. (2009). Glucosamine suppresses proliferation of human prostate carcinoma DU145 cells through inhibition of STAT3 signaling. *Cancer Cell Int*, 9, 25. doi: 10.1186/1475-2867-9-25
- Chia, J., Thia, K., Brennan, A. J., Little, M., Williams, B., Lopez, J. A., . . . Voskoboinik, I. (2012). Fatal immune dysregulation due to a gain of glycosylation mutation in lymphocyte perforin. *Blood*, 119(7), 1713-1716. doi: 10.1182/blood-2011-08-374355
- Chini, C. C. S., Boos, M. D., Dick, C. J., Schoon, R. A., & Leibson, P. J. (2000). Regulation of p38 mitogen-activated protein kinase during NK cell activation. *European Journal of Immunology*, 30(10), 2791-2798. doi: Doi 10.1002/1521-4141(200010)30:10<2791::Aid-Immu2791>3.0.Co;2-D
- Chou, W. Y., Chuang, K. H., Sun, D., Lee, Y. H., Kao, P. H., Lin, Y. Y., . . . Wu, Y. L. (2015). Inhibition of PKC-Induced COX-2 and IL-8 Expression in Human Breast Cancer Cells by Glucosamine. *J Cell Physiol*, 230(9), 2240-2251. doi: 10.1002/jcp.24955

- Cifaldi, L., Prencipe, G., Caiello, I., Bracaglia, C., Locatelli, F., De Benedetti, F., & Strippoli, R. (2015). Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis Rheumatol*, 67(11), 3037-3046. doi: 10.1002/art.39295
- Cirit, M., Wang, C. C., & Haugh, J. M. (2010). Systematic Quantification of Negative Feedback Mechanisms in the Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Signaling Network. *Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36736-36744. doi: 10.1074/jbc.M110.148759
- Colbert, J. D., Matthews, S. P., Miller, G., & Watts, C. (2009). Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response. *European Journal of Immunology*, 39(11), 2955-2965. doi: 10.1002/eji.200939650
- Colucci-D'Amato, L., Perrone-Capano, C., & di Porzio, U. (2003). Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays*, 25(11), 1085-1095. doi: 10.1002/bies.10355
- Conner, G. E., & Richo, G. (1992). Isolation and Characterization of a Stable Activation Intermediate of the Lysosomal Aspartyl Protease Cathepsin-D. *Biochemistry*, 31(4), 1142-1147. doi: Doi 10.1021/Bi00119a024
- Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters, C., Scapozza, L., Yousefi, S., & Simon, H. U. (2008). Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 205(3), 685-698. doi: 10.1084/jem.20072152
- Conus, S., & Simon, H. U. (2010). Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss Medical Weekly*, 140, 4-11. doi: 10.4414/smw.2010.13042
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 22(11), 633-640. doi: Doi 10.1016/S1471-4906(01)02060-9
- Cossarizza, A., Franceschi, C., Monti, D., Salvioli, S., Bellesia, E., Rivabene, R., . . . Malorni, W. (1996). Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: The role of mitochondria (vol 220, pg 232, 1995). *Experimental Cell Research*, 222(1), 251-253.
- Cruz-Monserrate, Z., Abd-Elgaliel, W. R., Grote, T., Deng, D. F., Ji, B. A., Arumugam, T., . . . Logsdon, C. D. (2012). Detection of pancreatic cancer tumours and precursor lesions by cathepsin E activity in mouse models. *Gut*, 61(9), 1315-1322. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300544
- d'Abusco, A. S., Cicione, C., Calamia, V., Negri, R., Giordano, C., Grigolo, B., . . . Scandurra, R. (2007). Glucosamine and its N-acetyl-phenylalanine derivative prevent TNF-alpha-induced transcriptional activation in human chondrocytes. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 25(6), 847-852.
- D'Alessandris, C., Andreozzi, F., Federici, M., Cardellini, M., Brunetti, A., Ranalli, M., . . . Sesti, G. (2004). Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J*, 18(9), 959-961. doi: 10.1096/fj.03-0725fje
- D'Angelo, M. E., Bird, P. I., Peters, C., Reinheckel, T., Trapani, J. A., & Sutton, V. R. (2010). Cathepsin H Is an Additional Convertase of Pro-granzyme B. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20514-20519. doi: 10.1074/jbc.M109.094573
- Dahl, S. W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V., & Turk, B. (2001). Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry*, 40(6), 1671-1678.
- Dalirfardouei, R., Karimi, G., & Jamialahmadi, K. (2016). Molecular mechanisms and biomedical applications of glucosamine as a potential multifunctional therapeutic agent. *Life Sci*, 152, 21-29. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.028
- Davies, P. H., & Messer, M. (1984). Intestinal cathepsin B and D activities of suckling rats. *Biol Neonate*, 45(4), 197-202. doi: 10.1159/000242004

- Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000). The immune system - First of two parts. *New England Journal of Medicine*, 343(1), 37-49. doi: Doi 10.1056/Nejm200007063430107
- Deng, Y., Kerdiles, Y., Chu, J., Yuan, S., Wang, Y., Chen, X., . . . Yu, J. (2015). Transcription factor Foxo1 is a negative regulator of natural killer cell maturation and function. *Immunity*, 42(3), 457-470. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.006
- Deng, Y. C., Kerdiles, Y., Chu, J. H., Yuan, S. Z., Wang, Y. W., Chen, X. L., . . . Yu, J. H. (2015). Transcription Factor Foxo1 Is a Negative Regulator of Natural Killer Cell Maturation and Function. *Immunity*, 42(3), 457-470. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.006
- Dolenc, I., Turk, B., Pungercic, G., Ritonja, A., & Turk, V. (1995). Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21626-21631.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11-22. doi: 10.1038/nrc1252
- Duan, W., Paka, L., & Pillarisetti, S. (2005). Distinct effects of glucose and glucosamine on vascular endothelial and smooth muscle cells: evidence for a protective role for glucosamine in atherosclerosis. *Cardiovasc Diabetol*, 4, 16. doi: 10.1186/1475-2840-4-16
- Dunn, B. M. (2002). Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem Rev*, 102(12), 4431-4458.
- Epling-Burnette, P. K., Bai, F., Wei, S., Chaurasia, P., Painter, J. S., Olashaw, N., . . . Loughran, T. P. (2004). ERK couples chronic survival of NK cells to constitutively activated Ras in lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL). *Oncogene*, 23(57), 9220-9229. doi: 10.1038/sj.onc.1208122
- Ewald, S. E., Lee, B. L., Lau, L., Wickliffe, K. E., Shi, G. P., Chapman, H. A., & Barton, G. M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*, 456(7222), 658-U688. doi: 10.1038/nature07405
- Faust, P. L., Kornfeld, S., & Chirgwin, J. M. (1985). Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(15), 4910-4914.
- Fehniger, T. A., Shah, M. H., Turner, M. J., VanDeusen, J. B., Whitman, S. P., Cooper, M. A., . . . Caligiuri, M. A. (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: Implications for the innate immune response. *Journal of Immunology*, 162(8), 4511-4520.
- Forchhammer, L., Thorn, M., Met, O., Gad, M., Weidner, M. S., & Claesson, M. H. (2003). Immunobiological effects of glucosamine in vitro. *Scandinavian Journal of Immunology*, 58(4), 404-411. doi: DOI 10.1046/j.1365-3083.2003.01313.x
- Fortenberry, S. C., & Chirgwin, J. M. (1995). The propeptide is nonessential for the expression of human cathepsin D. *Journal of Biological Chemistry*, 270(17), 9778-9782.
- Fusek, M., Mares, M., & Vetvicka, V. (2012). Cathepsin D. In A. J. Barrett, N. D. Rawlings & J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Vol. 3, pp. 54-63). New York: Academic Press.
- Giordano, C., Gallina, C., Consalvi, V., & Scandurra, R. (1991). Synthesis and Properties of D-Glucosamine N-Peptidyl Derivatives as Substrate-Analog Inhibitors of Papain and Cathepsin-B. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 26(8), 753-762. doi: Doi 10.1016/0223-5234(91)90001-4
- Grom, A. A., Villanueva, J., Lee, S., Goldmuntz, E. A., Passo, M. H., & Filipovich, A. (2003). Natural killer cell dysfunction in patients with systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *Journal of Pediatrics*, 142(3), 292-296. doi: 10.1067/mpd.2003.110
- Grossman, W. J., Revell, P. A., Lu, Z. H., Johnson, H., Bredemeyer, A. J., & Ley, T. J. (2003). The orphan granzymes of humans and mice. *Current Opinion in Immunology*, 15(5), 544-552. doi: 10.1016/S0952-7915(03)00099-2

- Guay, D., Beaulieu, C., & Percival, M. D. (2010). Therapeutic Utility and Medicinal Chemistry of Cathepsin C Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(7), 708-716. doi: Doi 10.2174/156802610791113469
- Guicciardi, M. E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S. F., Svingen, P. A., Peters, C., . . . Gores, G. J. (2000). Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Clinical Investigation*, 106(9), 1127-1137. doi: Doi 10.1172/Jci9914
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., . . . Schutze, S. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and-3 activation. *Cell Death and Differentiation*, 11(5), 550-563. doi: 10.1038/sj.cdd.4401382
- Henrotin, Y., Chevalier, X., Herrero-Beaumont, G., McAlindon, T., Mobasheri, A., Pavelka, K., ... Participants at the Hohenheim Consensus Conference in August, t. (2013). Physiological effects of oral glucosamine on joint health: current status and consensus on future research priorities. *BMC Res Notes*, 6, 115. doi: 10.1186/1756-0500-6-115
- Henrotin, Y., Marty, M., & Mobasheri, A. (2014). What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? *Maturitas*, 78(3), 184-187. doi: 10.1016/j.maturitas.2014.04.015
- Henrotin, Y., Mobasheri, A., & Marty, M. (2012). Is there any scientific evidence for the use of glucosamine in the management of human osteoarthritis? *Arthritis Research & Therapy*, 14(1). doi: Artn 201
10.1186/Ar3657
- Hewitt, C., McCormick, D., Linden, G., Turk, D., Stern, I., Wallace, I., . . . Thakker, N. (2004). The role of cathepsin C in Papillon-Lefevre syndrome, prepubertal periodontitis, and aggressive periodontitis. *Human Mutation*, 23(3), 222-228. doi: 10.1002/humu.10314
- Hong, H., Park, Y. K., Choi, M. S., Ryu, N. H., Song, D. K., Suh, S. I., . . . Jang, B. C. (2009). Differential down-regulation of COX-2 and MMP-13 in human skin fibroblasts by glucosamine-hydrochloride. *J Dermatol Sci*, 56(1), 43-50. doi: 10.1016/j.jdermsci.2009.06.017
- House, I. G., House, C. M., Brennan, A. J., Gilan, O., Dawson, M. A., Whisstock, J. C., . . . Voskoboinik, I. (2017). Regulation of perforin activation and pre-synaptic toxicity through C-terminal glycosylation. *Embo Reports*, 18(10), 1775-1785. doi: 10.15252/embr.201744351
- Huai, J. S., Vogtle, F. N., Jockel, L., Li, Y. B., Kiefer, T., Ricci, J. E., & Borner, C. (2013). TNF alpha-induced lysosomal membrane permeability is downstream of MOMP and triggered by caspase-mediated NDUFS1 cleavage and ROS formation. *Journal of Cell Science*, 126(17), 4015-4025. doi: 10.1242/jcs.129999
- Hwang, J. S., Kwon, M. Y., Kim, K. H., Lee, Y., Lyoo, I. K., Kim, J. E., . . . Han, I. O. (2017). Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated iNOS Induction Is Increased by Glucosamine under Normal Glucose Conditions but Is Inhibited by Glucosamine under High Glucose Conditions in Macrophage Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(5), 1724-1736. doi: 10.1074/jbc.M116.737940
- Hwang, M. S., & Baek, W. K. (2010). Glucosamine induces autophagic cell death through the stimulation of ER stress in human glioma cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 399(1), 111-116. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.050
- Ichim, G., & Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 539-548. doi: 10.1038/nrc.2016.58
- Illy, C., Quraishi, O., Wang, J., Purisima, E., Vernet, T., & Mort, J. S. (1997). Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 1197-1202. doi: DOI 10.1074/jbc.272.2.1197

- Imagawa, K., de Andres, M. C., Hashimoto, K., Pitt, D., Itoi, E., Goldring, M. B., . . . Oreffo, R. O. (2011). The epigenetic effect of glucosamine and a nuclear factor-kappa B (NF- κ B) inhibitor on primary human chondrocytes--implications for osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, 405(3), 362-367. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.01.007
- Ishido, S., Choi, J. K., Lee, B. S., Wang, C. Y., DeMaria, M., Johnson, R. P., . . . Jung, J. U. (2000). Inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protein. *Immunity*, 13(3), 365-374. doi: Doi 10.1016/S1074-7613(00)00036-4
- Ishidoh, K., Munro, D., Sato, N., & Kominami, E. (1991). Molecular cloning of cDNA for rat cathepsin C. Cathepsin C, a cysteine proteinase with an extremely long propeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 266(25), 16312-16317.
- Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., & Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, 17(6), 349-362. doi: 10.1038/nri.2017.28
- Jamialahmadi, K., Soltani, F., Nabavi Fard, M., Behravan, J., & Mosaffa, F. (2014). Assessment of protective effects of glucosamine and N-acetyl glucosamine against DNA damage induced by hydrogen peroxide in human lymphocytes. *Drug Chem Toxicol*, 37(4), 427-432. doi: 10.3109/01480545.2013.878951
- Jang, B. C., Sung, S. H., Park, J. G., Park, J. W., Bae, J. H., Shin, D. H., . . . Suh, S. I. (2007). Glucosamine hydrochloride specifically inhibits COX-2 by preventing COX-2 N-glycosylation and by increasing COX-2 protein turnover in a proteasome-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27622-27632. doi: 10.1074/jbc.M610778200
- Jiang, K. (2000). Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells (vol 1, pg 419, 2000). *Nature Immunology*, 1(6), 541-541.
- Jung, C. W., Jo, J. R., Lee, S. H., Park, Y. K., Jung, N. K., Song, D. K., . . . Park, J. W. (2012). Anti-cancer properties of glucosamine-hydrochloride in YD-8 human oral cancer cells: Induction of the caspase-dependent apoptosis and down-regulation of HIF-1 α . *Toxicol In Vitro*, 26(1), 42-50. doi: 10.1016/j.tiv.2011.10.005
- Kam, C. M., Hudig, D., & Powers, J. C. (2000). Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2), 307-323. doi: Doi 10.1016/S0167-4838(99)00282-4
- Kanwar, N., & Wilkins, J. A. (2011). IQGAP1 involvement in MTOC and granule polarization in NK-cell cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, 41(9), 2763-2773. doi: 10.1002/eji.201040444
- Kawakubo, T., Okamoto, K., Iwata, J., Shin, M., Okamoto, Y., Yasukochi, A., . . . Yamamoto, K. (2007). Cathepsin E prevents tumor growth and metastasis by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface. *Cancer Research*, 67(22), 10869-10878. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2048
- Kawakubo, T., Yasukochi, A., Toyama, T., Takahashi, S., Okamoto, K., Tsukuba, T., . . . Yamamoto, K. (2014). Repression of cathepsin E expression increases the risk of mammary carcinogenesis and links to poor prognosis in breast cancer. *Carcinogenesis*, 35(3), 714-726. doi: 10.1093/carcin/bgt373
- Keliher, E. J., Reiner, T., Earley, S., Klubnick, J., Tassa, C., Lee, A. J., . . . Weissleder, R. (2013). Targeting Cathepsin E in Pancreatic Cancer by a Small Molecule Allows In Vivo Detection. *Neoplasia*, 15(7), 684-+. doi: 10.1593/neo.13276
- Khalkhali-Ellis, Z., & Hendrix, M. J. (2014). Two Faces of Cathepsin D: Physiological Guardian Angel and Pathological Demon. *Biol Med (Aligarh)*, 6(2). doi: 10.4172/0974-8369.1000206

- Khaznadar, Z., Henry, G., Setterblad, N., Agaue, S., Raffoux, E., Boissel, N., . . . Dulphy, N. (2014). Acute myeloid leukemia impairs natural killer cells through the formation of a deficient cytotoxic immunological synapse. *European Journal of Immunology*, 44(10), 3068-3080. doi: 10.1002/eji.201444500
- Konjar, S., Sutton, V. R., Hoves, S., Repnik, U., Yagita, H., Reinheckel, T., . . . Kopitar-Jerala, N. (2010). Human and mouse perforin are processed in part through cleavage by the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L. *Immunology*, 131(2), 257-267. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03299.x
- Kopitar-Jerala, N., Puizdar, V., Berbic, S., Zavasnik-Bergant, T., & Turk, V. (2001). A cathepsin D specific monoclonal antibody. *Immunology Letters*, 77(2), 125-126. doi: 10.1016/S0165-2478(01)00198-5
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., . . . Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/elf2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death and Differentiation*, 14(2), 230-239. doi: 10.1038/sj.cdd.4401984
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., . . . Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3-11. doi: 10.1038/cdd.2008.150
- Krzewski, K., & Coligan, J. E. (2012). Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Frontiers in Immunology*, 3. doi: 10.3389/fimmu.2012.00335
- Kwak, T. K., Kim, H., Jung, O., Lee, S. A., Kang, M., Kim, H. J., . . . Lee, J. W. (2010). Glucosamine Treatment-mediated O-GlcNAc Modification of Paxillin Depends on Adhesion State of Rat Insulinoma INS-1 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 36021-36031. doi: 10.1074/jbc.M110.129601
- Li, C. L., Ge, B. X., Nicotra, M., Stern, J. N. H., Kopcow, H. D., Chen, X., & Stromingert, J. L. (2008). JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 3017-3022. doi: 10.1073/pnas.0712310105
- Lirussi, F., Beccarello, A., Castiglione, G., & Guglietta, A. (2002). Impaired natural killer cell cytotoxic activity in chronic hepatitis C viral infection: A single-center, controlled study. *Current Therapeutic Research-Clinical and Experimental*, 63(11), 748-758. doi: 10.1016/S0011-393x(02)80095-9
- Liu, B. Q., Meng, X., Li, C., Gao, Y. Y., Li, N., Niu, X. F., . . . Wang, H. Q. (2011). Glucosamine induces cell death via proteasome inhibition in human ALVA41 prostate cancer cell. *Exp Mol Med*, 43(9), 487-493. doi: 10.3858/emm.2011.43.9.055
- Luevano, M., Madrigal, A., & Saudemont, A. (2012). Transcription factors involved in the regulation of natural killer cell development and function: an update. *Frontiers in Immunology*, 3. doi: 10.3389/fimmu.2012.00319
- Ma, L., Rudert, W. A., Harnaha, J., Wright, M., Machen, J., Lakomy, R., . . . Giannoukakis, N. (2002). Immunosuppressive effects of glucosamine. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39343-39349. doi: 10.1074/jbc.M204924200
- Mace, E. M., Dongre, P., Hsu, H. T., Sinha, P., James, A. M., Mann, S. S., . . . Orange, J. S. (2014). Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunology and Cell Biology*, 92(3), 245-255. doi: 10.1038/icb.2013.96
- MacNeil, A. J., & Pohajdak, B. (2007). Polarization of endosomal SNX27 in migrating and tumor-engaged Natural Killer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 361(1), 146-150. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.183

- Man, G. S., & Mologhianu, G. (2014). Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *J Med Life*, 7(1), 37-41.
- March, M. E., & Long, E. O. (2011). beta2 integrin induces TCRzeta-Syk-phospholipase C-gamma phosphorylation and paxillin-dependent granule polarization in human NK cells. *Journal of Immunology*, 186(5), 2998-3005. doi: 10.4049/jimmunol.1002438
- Markasz, L., Stuber, G., Vanherberghen, B., Flaberg, E., Olah, E., Carbone, E., . . . Szekely, L. (2007). Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(2), 644-654. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0358
- McDonald, J. K., Zeitman, B. B., Reilly, T. J., & Ellis, S. (1969). New observations on the substrate specificity of cathepsin C (dipeptidyl aminopeptidase I). Including the degradation of beta-corticotropin and other peptide hormones. *Journal of Biological Chemistry*, 244(10), 2693-2709.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656
- Meade, J. L., de Wynter, E. A., Brett, P., Sharif, S. M., Woods, C. G., Markham, A. F., & Cook, G. P. (2006). A family with Papillon-Lefevre syndrome reveals a requirement for cathepsin C in granzyme B activation and NK cell cytolytic activity. *Blood*, 107(9), 3665-3668. doi: 10.1182/blood-2005-03-1140
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819-826. doi: 10.1038/nature06246
- Mellman, I. (2013). Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response. *Cancer Immunology Research*, 1(3), 145-149. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0102
- Mendis, E., Kim, M. M., Rajapakse, N., & Kim, S. K. (2008). Sulfated glucosamine inhibits oxidation of biomolecules in cells via a mechanism involving intracellular free radical scavenging. *Eur J Pharmacol*, 579(1-3), 74-85. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.10.027
- Mihelic, M., Teuscher, C., Turk, V., & Turk, D. (2006). Mouse stefins A1 and A2 (Stfa1 and Stfa2) differentiate between papain-like endo- and exopeptidases. *FEBS Lett*, 580(17), 4195-4199. doi: 10.1016/j.febslet.2006.06.076
- Muto, N., Yamamoto, M., Tani, S., & Yonezawa, S. (1988). Characteristic distribution of cathepsin E which immunologically cross-reacts with the 86-kDa acid proteinase from rat gastric mucosa. *J Biochem*, 103(4), 629-632.
- Nabbi, A., & Riabowol, K. (2015). Rapid Isolation of Nuclei from Cells In Vitro. *Cold Spring Harb Protoc*, 2015(8), 769-772. doi: 10.1101/pdb.prot083733
- Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*, 36, 489-517. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010
- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., . . . Rudensky, A. Y. (1998). Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*, 280(5362), 450-453.
- Nakanishi, H., Amano, T., Sastradipura, D. F., Yoshimine, Y., Tsukuba, T., Tanabe, K., . . . Yamamoto, K. (1997). Increased expression of cathepsins E and D in neurons of the aged rat brain and their colocalization with lipofuscin and carboxy-terminal fragments of Alzheimer amyloid precursor protein. *J Neurochem*, 68(2), 739-749.
- Nakanishi, H., Tominaga, K., Amano, T., Hirotsu, I., Inoue, T., & Yamamoto, K. (1994). Age-related changes in activities and localizations of cathepsins D, E, B, and L in the rat brain tissues. *Exp Neurol*, 126(1), 119-128. doi: 10.1006/exnr.1994.1048
- Nanut, M. P., Sabotic, J., Jewett, A., & Kos, J. (2014). Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. *Frontiers in Immunology*, 5. doi: Artn 616 10.3389/Fimmu.2014.00616

- Niwa, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., Umezawa, K., & Simizu, S. (2012). Determination of cathepsin V activity and intracellular trafficking by N-glycosylation. *FEBS Lett*, 586(20), 3601-3607. doi: 10.1016/j.febslet.2012.08.001
- Noursadeghi, M., Tsang, J., Haustein, T., Miller, R. F., Chain, B. M., & Katz, D. R. (2008). Quantitative imaging assay for NF-kappaB nuclear translocation in primary human macrophages. *J Immunol Methods*, 329(1-2), 194-200. doi: 10.1016/j.jim.2007.10.015
- Ogrinc, T., Dolenc, I., Ritonja, A., & Turk, V. (1993). Purification of the Complex of Cathepsin L and the Mhc Class II-Associated Invariant Chain Fragment from Human Kidney. *FEBS Lett*, 336(3), 555-559. doi: Doi 10.1016/0014-5793(93)80875-U
- Ojcius, D. M., Zheng, L. M., Spicas, E. C., Zychlinsky, A., & Young, J. D. E. (1991). Subcellular-Localization of Perforin and Serine Esterase in Lymphokine-Activated Killer-Cells and Cytotoxic T-Cells by Immunogold Labeling. *Journal of Immunology*, 146(12), 4427-4432.
- Orange, J. S. (2008). Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 713-725. doi: 10.1038/nri2381
- Pan, C. W., Jin, X., Zhao, Y., Pan, Y. Q., Yang, J., Karnes, R. J., . . . Huang, H. J. (2017). AKT-phosphorylated FOXO1 suppresses ERK activation and chemoresistance by disrupting IQGAP1-MAPK interaction. *Embo Journal*, 36(8), 995-1010. doi: 10.15252/emj.201695534
- Parihar, A., Eubank, T. D., & Doseff, A. I. (2010). Monocytes and Macrophages Regulate Immunity through Dynamic Networks of Survival and Cell Death. *Journal of Innate Immunity*, 2(3), 204-215. doi: 10.1159/000296507
- Paris, A., Strukelj, B., Pungercar, J., Renko, M., Dolenc, I., & Turk, V. (1995). Molecular cloning and sequence analysis of human preprocathepsin C. *FEBS Lett*, 369(2-3), 326-330.
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270), 1777-1789. doi: Doi 10.1016/S0140-6736(00)04904-7
- Paul, S., & Lal, G. (2017). The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 8. doi: Artn 1124 10.3389/fimmu.2017.01124
- Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and Cell Biology*, 89(2), 216-224. doi: 10.1038/icb.2010.78
- Perisic Nanut, M., Sabotic, J., Jewett, A., & Kos, J. (2014). Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. *Frontiers in Immunology*, 5, 616. doi: 10.3389/fimmu.2014.00616
- Persiani, S., Roda, E., Rovati, L. C., Locatelli, M., Giacobelli, G., & Roda, A. (2005). Glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics after increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(12), 1041-1049. doi: 10.1016/j.joca.2005.07.009
- Persiani, S., Rotini, R., Trisolino, G., Rovati, L. C., Locatelli, M., Paganini, D., . . . Roda, A. (2007). Synovial and plasma glucosamine concentrations in osteoarthritic patients following oral crystalline glucosamine sulphate at therapeutic dose. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(7), 764-772. doi: 10.1016/j.joca.2007.01.019
- Pham, C. T. N., & Ley, T. J. (1999). Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8627-8632. doi: DOI 10.1073/pnas.96.15.8627
- Pilaro, A. M., Taub, D. D., McCormick, K. L., Williams, H. M., Sayers, T. J., Fogler, W. E., & Wiltout, R. H. (1994). Tnf-Alpha Is a Principal Cytokine Involved in the Recruitment of Nk Cells to Liver Parenchyma. *Journal of Immunology*, 153(1), 333-342.

- Pislar, A., & Kos, J. (2014). Cysteine cathepsins in neurological disorders. *Mol Neurobiol*, 49(2), 1017-1030. doi: 10.1007/s12035-013-8576-6
- Podobnik, M., Kuhelj, R., Turk, V., & Turk, D. (1997). Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 angstrom resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen. *Journal of Molecular Biology*, 271(5), 774-788. doi: DOI 10.1006/jmbi.1997.1218
- Puizdar, V., Zajc, T., Zerovnik, E., Renko, M., Pieper, U., Eswar, N., . . . Turk, V. (2012). Biochemical characterization and structural modeling of human cathepsin E variant 2 in comparison to the wild-type protein. *Biol Chem*, 393(3), 177-186. doi: 10.1515/hsz-2011-0219
- Qian, S., Zhang, Q., Wang, Y., Lee, B., Betageri, G. V., Chow, M. S., . . . Zuo, Z. (2013). Bioavailability enhancement of glucosamine hydrochloride by chitosan. *Int J Pharm*, 455(1-2), 365-373. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.06.055
- Rawlings, N. D., Alan, J., Thomas, P. D., Huang, X. D., Bateman, A., & Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D624-D632. doi: 10.1093/nar/gkx1134
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 38, D227-D233. doi: 10.1093/nar/gkp971
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2011). Asparagine Peptide Lyases A SEVENTH CATALYTIC TYPE OF PROTEOLYTIC ENZYMES. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38321-38328. doi: 10.1074/jbc.M111.260026
- Reginster, J. Y., Bruyere, O., & Neuprez, A. (2007). Current role of glucosamine in the treatment of osteoarthritis. *Rheumatology*, 46(5), 731-735. doi: 10.1093/rheumatology/kem026
- Reine, T. M., Jenssen, T. G., & Kolset, S. O. (2016). Glucosamine exposure reduces proteoglycan synthesis in primary human endothelial cells in vitro. *Food & Nutrition Research*, 60. doi: Artn 32615
- 10.3402/Fnr.V60.32615
- Reiser, J., Adair, B., & Reinheckel, T. (2010). Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest*, 120(10), 3421-3431. doi: 10.1172/JCI42918
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1824(1), 22-33. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.08.016
- Robertson, M. J., & Ritz, J. (1990). Biology and Clinical Relevance of Human Natural-Killer-Cells. *Blood*, 76(12), 2421-2438.
- Rochel, N., & Cowan, J. A. (1996). Negative cooperativity exhibited by the lytic amino-terminal domain of human perforin: Implications for perforin-mediated cell lysis. *Chemistry & Biology*, 3(1), 31-36. doi: Doi 10.1016/S1074-5521(96)90081-2
- Roda, J. M., Parihar, R., Magro, C., Nuovo, G. J., Tridandapani, S., & Carson, W. E. (2006). Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Research*, 66(1), 517-526. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2429
- Ross, M. E., & Caligiuri, M. A. (1997). Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood*, 89(3), 910-918.
- Runhaar, J., Rozendaal, R. M., van Middelkoop, M., Bijlsma, H. J. W., Doherty, M., Dziedzic, K. S., . . . Zeinstra, S. B. (2017). Subgroup analyses of the effectiveness of oral glucosamine for knee and hip osteoarthritis: a systematic review and individual patient

- data meta-analysis from the OA trial bank. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(11), 1862-1869. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211149
- Sacks, D. B. (2006). The role of scaffold proteins in MEK/ERK signalling. *Biochemical Society Transactions*, 34, 833-836. doi: 10.1042/Bst0340833
- Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., . . . von Figura, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23), 13453-13458.
- Sakai, H., Saku, T., Kato, Y., & Yamamoto, K. (1991). Immunohistochemical and immunocytochemical localization of cathepsin E compared with cathepsin D. *Adv Exp Med Biol*, 306, 361-364.
- Sakai, S., Sugawara, T., Kishi, T., Yanagimoto, K., & Hirata, T. (2010). Effect of glucosamine and related compounds on the degranulation of mast cells and ear swelling induced by dinitrofluorobenzene in mice. *Life Sci*, 86(9-10), 337-343. doi: 10.1016/j.lfs.2010.01.001
- Saku, T., Sakai, H., Shibata, Y., Kato, Y., & Yamamoto, K. (1991). An immunocytochemical study on distinct intracellular localization of cathepsin E and cathepsin D in human gastric cells and various rat cells. *J Biochem*, 110(6), 956-964.
- Samarel, A. M., Ferguson, A. G., Decker, R. S., & Lesch, M. (1989). Effects of cysteine protease inhibitors on rabbit cathepsin D maturation. *Am J Physiol*, 257(6 Pt 1), C1069-1079. doi: 10.1152/ajpcell.1989.257.6.C1069
- Sastradipura, D. F., Nakanishi, H., Tsukuba, T., Nishishita, K., Sakai, H., Kato, Y., . . . Yamamoto, K. (1998). Identification of cellular compartments involved in processing of cathepsin E in primary cultures of rat microglia. *J Neurochem*, 70(5), 2045-2056.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Shamri, R., Xenakis, J. J., & Spencer, L. A. (2011). Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 57-83. doi: 10.1007/s00441-010-1049-6
- Shawver, L. M., Guo, J., Lai, J. P., Li, H., Kilpatrick, L., Douglas, S. D., & Orange, J. S. (2008). Inhibitory effect of substance P via NK-1R tachykinin receptor on NK cell function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2), S13-S13. doi: DOI 10.1016/j.jaci.2007.12.053
- Shintani, T., Yamazaki, F., Katoh, T., Umekawa, M., Matahira, Y., Hori, S., . . . Ashida, H. (2010). Glucosamine induces autophagy via an mTOR-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 391(4), 1775-1779. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.154
- Simon, R. R., Marks, V., Leeds, A. R., & Anderson, J. W. (2011). A comprehensive review of oral glucosamine use and effects on glucose metabolism in normal and diabetic individuals. *Diabetes Metab Res Rev*, 27(1), 14-27. doi: 10.1002/dmrr.1150
- Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7320-7326. doi: DOI 10.1074/jbc.M008363200
- Smyth, M. J., McGuire, M. J., & Thia, K. Y. T. (1995). Expression of Recombinant Human Granzyme-B - a Processing and Activation Role for Dipeptidyl Peptidase-I. *Journal of Immunology*, 154(12), 6299-6305.
- Solcia, E., Paulli, M., Silini, E., Fiocca, R., Finzi, G., Kindl, S., . . . et al. (1993). Cathepsin E in antigen-presenting Langerhans and interdigitating reticulum cells. Its possible role in antigen processing. *Eur J Histochem*, 37(1), 19-26.
- Someya, A., Ikegami, T., Sakamoto, K., & Nagaoka, I. (2016). Glucosamine Downregulates the IL-1 β -Induced Expression of Proinflammatory Cytokine Genes in Human Synovial MH7A Cells by O-GlcNAc Modification-Dependent and -Independent Mechanisms. *PLoS One*, 11(10), e0165158. doi: 10.1371/journal.pone.0165158

- Song, K. H., Kang, J. H., Woo, J. K., Nam, J. S., Min, H. Y., Lee, H. Y., . . . Oh, S. H. (2014). The novel IGF-IR/Akt-dependent anticancer activities of glucosamine. *BMC Cancer*, *14*, 31. doi: 10.1186/1471-2407-14-31
- Stoeckle, C., Gouttefangeas, C., Hammer, M., Weber, E., Melms, A., & Tolosa, E. (2009). Cathepsin W expressed exclusively in CD8+ T cells and NK cells, is secreted during target cell killing but is not essential for cytotoxicity in human CTLs. *Exp Hematol*, *37*(2), 266-275. doi: 10.1016/j.exphem.2008.10.011
- Stoka, V., Turk, B., & Turk, V. (2005). Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB Life*, *57*(4-5), 347-353. doi: 10.1080/15216540500154920
- Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2016). Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*, *32*, 22-37. doi: 10.1016/j.arr.2016.04.010
- Suban, D., Zajc, T., Renko, M., Turk, B., Turk, V., & Dolenc, I. (2012). Cathepsin C and plasma glutamate carboxypeptidase secreted from Fischer rat thyroid cells liberate thyroxine from the N-terminus of thyroglobulin. *Biochimie*, *94*(3), 719-726. doi: 10.1016/j.biochi.2011.10.018
- Suh, H. N., Lee, Y. J., Kim, M. O., Ryu, J. M., & Han, H. J. (2014). Glucosamine-Induced Sp1 O-GlcNAcylation Ameliorates Hypoxia-Induced SGLT Dysfunction in Primary Cultured Renal Proximal Tubule Cells. *J Cell Physiol*, *229*(10), 1557-1568. doi: 10.1002/jcp.24599
- Sutton, V. R., Waterhouse, N. J., Browne, K. A., Sedelies, K., Ciccone, A., Anthony, D., . . . Trapani, J. A. (2007). Residual active granzyme B in cathepsin C-null lymphocytes is sufficient for perforin-dependent target cell apoptosis. *Journal of Cell Biology*, *176*(4), 425-433. doi: 10.1083/jcb.200609077
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., . . . Lieberman, J. (2011). Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature Immunology*, *12*(8), 770-U146. doi: 10.1038/ni.2050
- Topham, N. J., & Hewitt, E. W. (2009). Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*, *128*(1), 7-15. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03123.x
- Trapani, J. A., & Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology*, *2*(10), 735-747. doi: 10.1038/nri911
- Trotta, R., Fettucciari, K., Azzoni, L., Abebe, B., Puorro, K. A., Eisenlohr, L. C., & Perussia, B. (2000). Differential role of p38 and c-Jun N-terminal kinase 1 mitogen-activated protein kinases in NK cell cytotoxicity. *Journal of Immunology*, *165*(4), 1782-1789. doi: DOI 10.4049/jimmunol.165.4.1782
- Tsukuba, T., Ikeda, S., Okamoto, K., Yasuda, Y., Sakai, E., Kadowaki, T., . . . Yamamoto, K. (2006). Characterization of rat cathepsin E and mutants with changed active-site residues and lacking propeptides and N-glycosylation, expressed in human embryonic kidney 293T cells. *FEBS J*, *273*(1), 219-229. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05062.x
- Tsukuba, T., Okamoto, K., Okamoto, Y., Yanagawa, M., Kohmura, K., Yasuda, Y., . . . Nakayama, K. I. (2003). Association of cathepsin E deficiency with development of atopic dermatitis. *J Biochem*, *134*(6), 893-902.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*, *5*(9), 785-799. doi: 10.1038/nrd2092
- Turk, B., Dolenc, I., Turk, V., & Bieth, J. G. (1993). Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry*, *32*(1), 375-380.
- Turk, B., Stoka, V., Rozman-Pungercar, J., Cirman, T., Droga-Mazovec, G., Oresic, K., & Turk, V. (2002). Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biol Chem*, *383*(7-8), 1035-1044. doi: 10.1515/BC.2002.112
- Turk, B., & Turk, V. (2009). Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *Journal of Biological Chemistry*, *284*(33), 21783-21787. doi: 10.1074/jbc.R109.023820

- Turk, D., Janjic, V., Stern, I., Podobnik, M., Lamba, D., Dahl, S. W., . . . Turk, B. (2001). Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases. *EMBO J*, 20(23), 6570-6582. doi: 10.1093/emboj/20.23.6570
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., & Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*, 1824(1), 68-88. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002
- Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M., & Thorens, B. (2002). GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett*, 524(1-3), 199-203.
- Unanue, E. R., Turk, V., & Neefjes, J. (2016). Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*, 34, 265-297. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055420
- Uno, K., Azuma, T., Nakajima, M., Yasuda, K., Hayakumo, T., Mukai, H., . . . Kawai, K. (2000). Clinical significance of cathepsin E in pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 15(11), 1333-1338.
- Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V., & Turk, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des*, 13(4), 387-403.
- Vasiljeva, O., & Turk, B. (2008). Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie*, 90(2), 380-386. doi: 10.1016/j.biochi.2007.10.004
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503-510. doi: 10.1038/ni1582
- Voskoboinik, I., Dunstone, M. A., Baran, K., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2010). Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunological Reviews*, 235, 35-54.
- Voskoboinik, I., Thia, M. C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M. J., & Trapani, J. A. (2005). Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 8426-8434. doi: 10.1074/jbc.M413303200
- Wainstein, E., & Seger, R. (2016). The dynamic subcellular localization of ERK: mechanisms of translocation and role in various organelles. *Curr Opin Cell Biol*, 39, 15-20. doi: 10.1016/j.ceb.2016.01.007
- Wang, K. S., Ritz, J., & Frank, D. A. (1999). IL-2 induces STAT4 activation in primary NK cells and NK cell lines, but not in T cells. *Journal of Immunology*, 162(1), 299-304.
- Wang, L., Du, F., & Wang, X. (2008). TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, 133(4), 693-703. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.036
- Wang, Z., Ge, L., Wang, M., & Carr, B. I. (2006). Phosphorylation regulates Myc expression via prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Cell Physiol*, 208(1), 133-140. doi: 10.1002/jcp.20649
- Wen, Z. H., Tang, C. C., Chang, Y. C., Huang, S. Y., Hsieh, S. P., Lee, C. H., . . . Jean, Y. H. (2010). Glucosamine sulfate reduces experimental osteoarthritis and nociception in rats: association with changes of mitogen-activated protein kinase in chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(9), 1192-1202. doi: 10.1016/j.joca.2010.05.012
- Wlodawer, A., Gustchina, A., & James, M. N. G. (2012). Catalytic Pathways of Aspartic Peptidases In A. j. Barrett, N. D. Rawlings & J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Vol. 3, pp. 19-26). New York: Academic Press.
- Wolters, P. J., Pham, C. T. N., Muilenburg, D. J., Ley, T. J., & Caughey, G. H. (2001). Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18551-18556. doi: DOI 10.1074/jbc.M100223200

- Wortzel, I., & Seger, R. (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer*, 2(3), 195-209. doi: 10.1177/1947601911407328
- Wu, Y. L., Kou, Y. R., Ou, H. L., Chien, H. Y., Chuang, K. H., Liu, H. H., . . . Lu, M. L. (2010). Glucosamine regulation of LPS-mediated inflammation in human bronchial epithelial cells. *Eur J Pharmacol*, 635(1-3), 219-226. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.02.044
- Yagita, M., Nakajima, M., & Saksela, E. (1989). Suppression of human natural killer cell activity by amino sugars. *Cell Immunol*, 122(1), 83-95.
- Yanagawa, M., Tsukuba, T., Nishioku, T., Okamoto, Y., Okamoto, K., Takii, R., . . . Yamamoto, K. (2007). Cathepsin E deficiency induces a novel form of lysosomal storage disorder showing the accumulation of lysosomal membrane sialoglycoproteins and the elevation of lysosomal pH in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 282(3), 1851-1862. doi: 10.1074/jbc.M604143200
- Yasuda, Y., Ikeda, S., Sakai, H., Tsukuba, T., Okamoto, K., Nishishita, K., . . . Yamamoto, K. (1999). Role of N-glycosylation in cathepsin E. A comparative study of cathepsin E with distinct N-linked oligosaccharides and its nonglycosylated mutant. *Eur J Biochem*, 266(2), 383-391.
- Yoshimine, Y., Tsukuba, T., Isobe, R., Sumi, M., Akamine, A., Maeda, K., & Yamamoto, K. (1995). Specific immunocytochemical localization of cathepsin E at the ruffled border membrane of active osteoclasts. *Cell and Tissue Research*, 281(1), 85-91.
- Yu, M. X., Shi, W. F., Zhang, J., Niu, L., Chen, Q. Z., Yan, D., . . . Li, Z. O. (2009). Influence of reverse signaling via membrane TNF-alpha on cytotoxicity of NK92 cells. *European Journal of Cell Biology*, 88(3), 181-191. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.09.001
- Yu, T. K., Caudell, E. G., Smid, C., & Grimm, E. A. (2000). IL-2 activation of NK cells: Involvement of MKK1/2/ERK but not p38 kinase pathway. *Journal of Immunology*, 164(12), 6244-6251. doi: DOI 10.4049/jimmunol.164.12.6244
- Yu, Z., Ju, Y., & Liu, H. (2017). Antitumor cancer effect of glucosamine by suppressing the phosphorylation of FOXO. *Mol Med Rep*, 16(3), 3395-3400. doi: 10.3892/mmr.2017.6976
- Zachara, N. E., & Hart, G. W. (2006). Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(5-6), 599-617. doi: 10.1016/j.bbalip.2006.04.007
- Zahedipour, F., Dalirfardouei, R., Karimi, G., & Jamialahmadi, K. (2017). Molecular mechanisms of anticancer effects of Glucosamine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1051-1058. doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.122
- Zaidi, N., Hermann, C., Herrmann, T., & Kalbacher, H. (2008). Emerging functional roles of cathepsin E. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(2), 327-330. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.034
- Zaidi, N., & Kalbacher, H. (2012). Cathepsin E. In A. J. Barrett, N. D. Rawlings & J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Vol. 3, pp. 42-48). New York: Academic Press.
- Zakiryanova, G. K., Kustova, E., Urazalieva, N. T., Amirbekov, A., Baimuchametov, E. T., Nakisbekov, N. N., & Shurin, M. R. (2017). Alterations of oncogenes expression in NK cells in patients with cancer. *Immunity Inflammation and Disease*, 5(4), 493-502. doi: 10.1002/iid3.179
- Zeleznik, T. Z., Puizdar, V., & Dolenc, I. (2015). Expression, purification and auto-activation of cathepsin E from insect cells. *Protein Pept Lett*, 22(6), 525-531.

Bibliografija

Objave v povezavi z delom

- Bidovec, K., Božič, J., Dolenc, I., Turk, B., Turk, V., & Stoka, V. (2017). Tumor Necrosis Factor- α Induced Apoptosis in U937 Cells Promotes Cathepsin D-Independent Stefin B Degradation. *J Cell Biochem*, 118(12), 4813-4820. doi: 10.1002/jcb.26152
- Božič, J., Stoka, V., & Dolenc, I. (2018). Glucosamine prevents polarization of cytotoxic granules in NK-92 cells by disturbing FOXO1/ERK/paxillin phosphorylation. *PLoS One*, 13(7), e0200757. doi: 10.1371/journal.pone.0200757

Prispevki na konferencah

Prispevki na konferencah

- Božič, J., Turk, V., Stoka, V., Dolenc, I. Glucosamine prevents stimulation of cell mediated cytotoxicity of natural killer cell line NK-92. V: TURK, Boris (ur.). Book of abstracts, XVth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, 17. 9. - 21. 9. 2016. Ljubljana: Jožef Stefan Institute. 2016, str. 65. [COBISS.SI-ID 29799463]
- Božič, J., Turk, V., Stoka, V., Dolenc, I. Glucosamine prevents cell mediated cytotoxicity of natural killer cell line NK-92. V: LASSACHER, Michaela (ur.), WERNSPERGER, Claudine (ur.), BRANDSTETTER, Hans (ur.). 34th Winter School on Proteinases and their Inhibitors, Tiers am Rosengarten. [S. l.: S. n.]. 2017, str. 48. [COBISS.SI-ID 30336551]
- Božič, J., Turk, V., Stoka, V., Dolenc, I. Glucosamine prevents cell mediated cytotoxicity of natural killer cell line NK-92. V: TURK, Boris (ur.), KAVČIČ, Nežka (ur.). Mitochondria, apoptosis and cancer : book of abstracts, Bled, Slovenia, 16. 09.-18. 09. 2017. Ljubljana: Jožef Stefan Institute. 2017, str. 84. [COBISS.SI-ID 30783271]
- Božič, J., Turk, V., Stoka, V., Dolenc, I. Glucosamine prevents cell mediated cytotoxicity of natural killer cell line NK-92. V: PAVLIN, Majda (ur.), et al. Zbornik = Proceedings, 9. študentska konferenca Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana in 11. dan mladih raziskovalcev (Konferenca KMBO) = 9th Jožef Stefan International Postgraduate School Students' Conference and 11th Young researchers' Day, [19.-20. 4. 2017, Ljubljana, Slovenija]. Ljubljana: Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana: = Jožef Stefan International Postgraduate School: Inštitut Jožef Stefan: = Jožef Stefan Institute. 2017, str. 47. http://ipssc.mps.si/proceedings/Proceedings_IPSSC+CMBE_2017.pdfnivečdostopen(15.3.2018). [COBISS.SI-ID 30459175]
- Božič, J., Turk, V., Stoka, V., Dolenc, I. Glucosamine prevents cell mediated cytotoxicity of natural killer cell line NK-92. V: LASSACHER, Michaela (ur.), WERNSPERGER, Claudine (ur.), BRANDSTETTER, Hans (ur.). 35th Winter School on Proteinases and their Inhibitors, Tiers am Rosengarten. [S. l.: S. n.]. 2018, str. 38.

Biografija

Janja Božič je leta 2010 dokončala prvo stopnjo bolonjskega študija Biotehnologije na Biotehniški fakulteti in pridobila naziv diplomirane biotehnologinje. Nato je nadaljevala študij Biotehnologije na drugi bolonjski stopnji in leta 2013 pridobila naziv magistra biotehnologije.

Oktobra 2014 se je vpisala na podiplomski študij Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana, smer Nanoznanosti in nanotehnologije (NANO3) pri mentorju prof. dr. Vitu Turku. Zaradi upokojitve prof. dr. Vita Turka je tekom študija mentorstvo prevzela prof. dr. Veronika Stoka.

Novembra 2014 se je avtorica zaposlila na Institutu »Jožef Stefan«, na Oddelku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo preko programa mladi raziskovalci.

Avtorica je decembra 2017 opravila tečaj za usposobljenost za delo s poskusnimi živalmi (izvajalec). Med doktorskim izobraževanjem se je aktivno udeležila petih mednarodnih konferenc.

