ZUNAJCELIČNE VLOGE APOPTOTSKIH KASPAZ IN CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI RAKU

Eva Vidak

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija

Mentor: prof. ddr. Boris Turk, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

Komisija za oceno doktorske disertacije:
prof. dr. Nataša Kopitar Jerala,, predsednica, MPŠ in Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija
prof. dr. Toni Petan, član, MPŠ in Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija
prof. dr. Ana Plemenitaš, članica, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Eva Vidak

ZUNAJCELIČNE VLOGE APOPTOTSKIH KASPAZ IN CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI RAKU

Doktorska disertacija

EXTRACELLULAR ROLES OF APOPTOTIC CASPASES AND CYSTEINE CATHEPSINS IN CANCER

Doctoral Dissertation

Mentor: prof. ddr. Boris Turk

Ljubljana, Slovenija, december 2025

Zahvala

Najprej se iskreno zahvaljujem mentorju, prof. ddr. Borisu Turku, da me je sprejel pod svoje okrilje kot mlado raziskovalko in me strokovno vodil skozi celoten doktorski študij. Zahvaljujem se mu za vse nasvete, ideje, usmeritve, ponujene priložnosti in vso pomoč tako pri pisanju člankov kot pri pripravi doktorske disertacije.

Posebna zahvala gre tudi dr. Mateju Vizovišku, ki me je kot delovni mentor usmerjal že v času magistrskega študija in me nato uvedel tudi v nadaljnje raziskovalno delo. Nasveti, ki mi jih je predal v tem času, so imeli neizmeren vpliv na moj napredek predvsem na raziskovalnem področju. Dodatno se mu posebej zahvaljujem tudi za izvedbo eksperimentalnega dela analize z masno spektrometrijo, ki je ključno vplivalo na nadaljnji potek raziskovalnega dela.

Najlepša hvala tudi članom komisije, in sicer prof. dr. Nataši Kopitar-Jerala, prof. dr. Toniju Petanu in prof. dr. Ani Plemenitaš, za natančen in strokoven pregled doktorske disertacije ter podano konstruktivno kritiko.

Zahvaljujem se tudi vsem nekdanjim sodelavcem na Odseku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo na Institutu "Jožef Stefan", saj so z nasveti in ustvarjanjem prijetnega delovnega okolja pripomogli k uspešnemu zaključku doktorskega študija. Posebna zahvala gre tudi administrativnemu in tehničnemu osebju, predvsem Ivici Štefe, saj sem zmeraj lahko računala na njeno pomoč in podporo. Prav tako se zahvaljujem tudi kolektivu Kliničnega inštituta za genetsko diagnostiko UKC Maribor za spodbudo pri zaključku priprave doktorske disertacije.

Iskreno zahvalo namenjam tudi prijateljem, in sicer Lejili Musić, Evi Valentini Veljković, Izi Herman in Juretu Črepinšku, ki mi stojijo ob strani že od vrtčevskih dni, ter bivšim sodelavcem dr. Moniki Biasizzo, dr. Nežki Kavčič in Urbanu Javoršku, ki so zmeraj verjeli vame, me spodbujali, podpirali in mi s premnogimi debatami pomagali rešiti vsako na videz še tako nerešljivo zagato. Čas, ki smo ga skupaj preživeli na odseku, ste začinili tako z znanstvenimi kot popolnoma poljudnimi nasveti in debatami ter mi pomagali odkriti hobije in interese, ki še zdaj zapolnjujejo moj vsakdan, za kar se vam prisrčno zahvaljujem.

Globoka zahvala gre tudi mojim staršem, Lilijani in Mateju, ki sta vsa leta verjela, da bom kljub mnogim ovinkom uspešno zaključila to poglavje svoje raziskovalne poti, in mi nudila prepotrebno podporo ter spodbudo v trenutkih obupa.

Za konec se zahvaljujem tudi Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije, ki je v okviru programa usposabljanja mladih raziskovalcev v raziskovalnih organizacijah financirala opravljeno raziskovalno delo.

Povzetek

Mnoga patološka stanja, med drugim tudi rakava obolenja, spremlja nenormalna proteolitična aktivnost, ki je pogosto povezana tudi s spremenjeno lokalizacijo proteaz. Posledično smo se v okviru doktorske disertacije osredotočili na atipično proteolizo v zunajceličnem mikrookolju tumorja, ki jo vršijo apoptotske kaspaze in cisteinski katepsini.

Kaspaze so glavne proteaze v procesu apoptoze, oblike celične smrti, ki je pogosto okvarjena pri različnih patoloških stanjih. Gre za neimunogeno obliko celične smrti, ki lahko le v določenih primerih napreduje v imunogeno sekundarno nekrozo in tako ustvari pogoje za prisotnost aktivnih apoptotskih kaspaz v zunajceličnem prostoru. S spremljanjem poteka apoptoze v celicah celične linije Jurkat E6.1 smo pokazali, da v zunajceličnem okolju sekundarno nekrotičnih celic lahko zaznamo encimsko aktivnost kaspaz-3 in -7. V naslednjem koraku smo s tretiranjem celic celične linije MDA-MB-231 ugotovili, da lahko obe kaspazi cepita ektodomene membransko-usidranih proteinov, torej proteolitično funkcijo, ki jo navadno pripisujemo cisteinskim katepsinom in metaloproteazam.

Raziskovali smo tudi zunajcelične vloge cisteinskih katepsinov, natančneje katepsinov K, L in S. Za katepsina L in S so že pokazali, da v zunajceličnem prostoru lahko delujeta kot šedazi, pri čemer so med njunimi substrati tudi membransko-usidrani proteini, ki so povezani z aktivacijo in regulacijo imunskega odziva. Posledično smo v okviru doktorske disertacije raziskovali, ali lahko kot šedazi vplivata tudi na aktivacijo imunskega odziva v mikrookolju tumorja. Šibka aktivacija sistema komplementa, ki pripomore k imunosupresivni naravi mikrookolja tumorja, namreč spremlja razvoj in napredovanje raka. Na modelu rakavih celic celične linije MDA-MB-231 smo pokazali, da zunajcelična proteoliza preko katepsinov L in S privede do zaznavno manjše depozicije komponent sistema komplementa, kar kaže na šibkejšo aktivacijo sistema komplementa.

V primeru katepsina K pa smo kot njegov zunajcelični substrat identificirali zunajcelično domeno metaloproteaze MMP-14, prisotno na membranah rakavih celic HT-144, modelne celične linije melanoma. Posledično smo nadalje raziskovali, ali cepitev zunajcelične domene MMP-14 vodi v nadaljnjo aktivacijo zunajceličnih metaloproteaz. Zaznali smo povišano želatinazno aktivnost v šedomih tretiranih celic celične linije HT-144, vendar nismo uspeli potrditi, da gre za aktivnost zunajceličnih metaloproteaz. Ugotovili smo tudi, da tretiranje celic s katepsinom K povzroči odlepljanje rakavih celic, pri čemer pa nismo uspeli razjasniti, ali je le-to posledica zgolj proteolitičnih cepitev s strani katepsina K ali pa proces dodatno pospešijo aktivirane zunajcelične metaloproteaze.

Raziskave, opravljene v okviru doktorske disertacije predstavljajo prve dokaze, da sta tudi apoptotski kaspazi-3 in -7 lahko del zunajcelične proteolitične mreže v mikrookolju tumorja in nadgrajujejo predhodne raziskave v zvezi z zunajcelično aktivnostjo cisteinskih katepsinov. Kažejo namreč, da sta cisteinska katepsina L in S vpletena v regulacijo imunskega odziva in da lahko katepsin K sprosti metaloproteazo MMP-14 z membrane celic ter s tem potencialno dodatno vpliva na proteolitično aktivnost v mikrooklju tumorja.

Abstract

Many pathologies, most notably cancer, are accompanied by aberrant proteolytic activity which can stem from altered localization of commonly intracellular proteases. Thereby, we focused our research on atypical proteolysis in the tumour microenvironment mediated by apoptotic caspases and cysteine cathepsins.

Caspases are the main proteases that drive apoptosis, a form of programmed cell death, which is commonly dysregulated in various pathologies. Apoptosis is predominately an immunologically silent form of cell death that can become immunogenic during progression to secondary necrosis, thus providing an opportunity for extracellular presence of active apoptotic caspases. By triggering apoptosis in Jurkat E6.1 cells we demonstrated that apoptotic caspases-3 and -7 can be found in the extracellular millieu of secondary necrotic cells. Furthermore, we showed that they can then cleave extracellular domains of membrane-bound proteins from MDA-MB-231 breast cancer cells, a function generally attributed to proteases from metalloprotease and cathepsin families.

We were also focused on the extracellular roles of cysteine cathepsins K, L and S. For cathepsins L and S, it has already been shown that they can act as sheddases, with at least one of the substrates pointing towards their involvement in the activation or regulation of immune response. Therefore, we aimed at elucidating whether cathepsin-mediated extracellular proteolysis could play a role in regulation of immune response. Low level of activation of the complement system is a known factor contributing to the immunosuppressive nature of the tumour microenvironment. By treating MDA-MB-231 breast cancer cells with cathepsins we have shown that they blunt the deposition of the components of the complement system, thereby blunting the immune response.

In the case of cathepsin K, using melanoma cell line HT-144, we have identified the extracellular domain of MMP-14 as one of its extracellular substrates. Consequently, we tried to ascertain whether this could lead to further activation of extracellular metalloproteases. We have detected increased gelatinolytic activity in the sheddomes of treated cells, but were unable to identify the exact enzymes responsible for the activation. Furthermore, we observed that cathepsin K treatment results in detachment of cancer cells, but we could not elucidate whether solely cathepsin K-mediated cleavages are responsible for the detachment or whether the process is accelerated by downstream activation of extracellular metalloproteases.

Our research provides the first evidence for the potential involvement of apoptotic caspases-3 and -7 in the extracellular proteolytic network and expands our knowledge about the extracellular roles of cysteine cathepsins by implicating cathepsins L and S in regulation of immune response and identifying MMP-14 as an extracellular substrate of cathepsin K.

Kazalo

Slike **xiii**

Tabele **xv**

Kratice **xvii**

1 Uvod **1**
1.1 Cisteinske proteaze ... 1
1.1.1 Apoptotske kaspaze ... 1
1.1.2 Cisteinski katepsini ... 3
1.2 Programirana celična smrt ... 5
1.2.1 Apoptoza ... 6
1.2.2 Sekundarna nekroza ... 8
1.3 Rak 10
1.3.1 Proteoliza pri raku ... 11
1.3.2 Aktivacija imunskega odziva pri raku ... 14

2 Namen dela **19**

3 Materiali in metode **21**
3.1 Materiali ... 21
3.1.1 Kemikalije in reagenti ... 21
3.1.2 Celične linije ... 23
3.1.3 Protitelesa ... 23
3.1.4 Rekombinantni proteini in biološki material ... 24
3.1.5 Pufri ... 24
3.1.6 Laboratorijska oprema ... 28
3.1.7 Programska operma ... 29
3.2 Metode ... 29
3.2.1 Delo s celičnimi linijami ... 29
3.2.2 Tretiranje celičnih linij ... 31
3.2.3 Masna spektrometrija ... 35
3.2.4 Detekcija encimske aktivnosti ... 36
3.2.5 Imunodetekcija proteinov ... 38
3.2.6 Pretočna citometrija ... 41
3.2.7 Cimografija ... 43
3.2.8 Svetlobna mikroskopija ... 44
3.2.9 Statistična analiza ... 46

4 Rezultati **47**
4.1 Zunajcelična vloga apoptotskih kaspaz ... 47

4.1.1 Identifikacija zunajceličnih substratov apoptotskih kaspaz z masno spektrometrijo ... 47
4.1.2 Apoptotski kaspazi-3 in -7 sta zaznavni v celičnem gojišču apoptotičnih celic ... 52
4.1.3 Kaspazna aktivnost je prisotna tudi v okolju s kislim pH ... 57
4.1.4 Zunajcelične cepitve s kaspazama-3 in -7 se razlikujejo od cepitev s cisteinskima katepsinoma L in S ... 61
4.2 Zunajcelične vloge cisteinskih katepsinov ... 63
4.2.1 Imunske in rakave celice sproščajo cisteinske katepsine v zunajcelični prostor ... 63
4.2.2 Cisteinska katepsina L in S vplivata na aktivacijo človeškega komplementa ... 65
4.2.3 Cisteinska katepsina L in S cepita NRP1 in antigen CD44 s površine rakavih celic ... 68
4.3 Katepsin K sprosti MMP-14 z membrane rakavih celic ... 70
4.3.1 Zunajcelična aktivnost katepsina K privede do zaznavne želatinazne aktivnosti v šedomih ... 70
4.3.2 Zunajcelična aktivnost katepsina K zmanjša adhezijo rakavih celic ... 72

5 Razprava **75**
5.1 Zunajcelična vloga apoptotskih kaspaz-3 in -7 ... 75
5.2 Vpliv zunajceličnih cisteinskih katepsinov na sistem komplementa ... 79
5.3 Vpliv zunajceličnega katepsina K na adhezijo rakavih celic ... 82

6 Zaključki **85**

Dodatek A Zunajcelična vloga apoptotskih kaspaz-3 in -7 **87**
A.1 Identificirani substrati apoptotske kaspaze-3 ... 87
A.2 Identificirani substrati apoptotske kaspaze-7 ... 90
A.3 Pokritost 10-ih identificiranih substratov z najvišjimi povprečji razmerij SCR z identifikacijskimi peptide ... 92
A.4 Rezultati bioinformatske napovedi cepitvenih mest za NRP1, CSPG4 in CD44 93
A.5 Vpliv dodatka koncentriranih pufrov HEPES in MES na pH koncentriranih celičnih gojišč ... 94

Literatura **95**

Bibliografija **115**

Biografija **117**

Slike

Slika 1: Iniciacijske in efektorske apoptotske kaspaze se aktivirajo po različnih mehanizmih aktivacije. 2
Slika 2: Izražanje in aktivacija cisteinskih katepsinov. 4
Slika 3: Morfološke spremembe celice, ki se zgodijo med potekom apoptoze. 6
Slika 4: Poenostavljen shematski prikaz ekstrinzične in intrinzične poti apoptoze. 7
Slika 5: Redundanten mehanizem sekundarne nekroze preko cepitve gasdermina E. 9
Slika 6: Zunajcelične vloge proteaz, ki spremljajo nastanek in napredovanje rakavih obolenj. 12
Slika 7: Shematski prikaz vseh treh poti aktivacije sistema komplementa. 15
Slika 8: Po tretiranju rakave celične linije MDA-MB-231 so v šedomih zaznavni proteini z značilno povišano prisotnostjo. 47
Slika 9: Približno polovico identificiranih potencialnih zunajceličnih substratov lahko cepita obe preiskovani kaspazi. 48
Slika 10: Največ identificiranih potencialnih substratov apoptotskih kaspaz-3 in -7 je usidranih v membrano preko transmembranske regije. 49
Slika 11: Večini identificiranih potencialnih zunajceličnih substratov apoptotskih kaspaz-3 in -7 ne moremo enolično določiti molekulske funkcije. 50
Slika 12: Rekombinantni kaspazi-3 in -7 cepita zunajcelično domeno nevropilina 1. Prikazani so rezultati treh neodvisnih poskusov. Rdeča puščica označuje fragment cepljene zunajcelične domene NRP1. 52
Slika 13: Apoptotične celice MDA-MB-231 imajo zaznavno kaspazno aktivnost tako v celičnih lizatih kot v celičnih gojiščih, kljub različnemu nivoju izražanja obeh apoptotskih kaspaz 53
Slika 14: Kaspazna aktivnost je zaznavna tako znotraj kot zunajcelično ob različnih časih izpostavljenosti celic celične linije Jurkat E6-1 sprožilcu apoptoze STS. 54
Slika 15: Spremljanje poteka apoptoze v celicah Jurkat E6-1 po dodatku sprožilca STS.. 55
Slika 16: Predhodno tretiranje celic Jurkat E6-1 z inhibitorjem zVAD-FMK ne prepreči apoptoze ampak zgolj upočasni njen potek. 55
Slika 17: Aktivni apoptotski kaspazi-3 in -7 sta prisotni v celičnih gojiščih sekundarno nekrotičnih celic. 56
Slika 18: Apoptotska kaspaza-7 ohrani del encimske aktivnosti tudi v okolju s kislim pH. 57
Slika 19: Zunajcelična kaspazna aktivnost v celičnih gojiščih apoptotičnih celic Jurkat E6-1 je zaznavna tudi v okolju s kislim pH. 58
Slika 20: Ob uporabi standardnih pogojev tretiranja celic MDA-MB-231 lahko še vedno zaznamo kaspazno aktivnost tudi v okolju s kislim pH. 59
Slika 21: Pokritost aminokislinskih zaporedij treh izbranih membransko-usidranih proteinov z zaznanimi identifikacijskimi peptidi. 60
Slika 22: Kaspazi-3 in -7 lahko cepita zunajcelične domene transmembranskih proteinov NRP1, CSPG4 in CD44 v različnih pogojih. 61

Slika 23: Apoptotski kaspazi-3 in -7 cepita zunajcelične domene NRP1, CSPG4 in CD44 na različnih mestih v primerjavi s cisteinskima katepsinoma L in S.. 62
Slika 24: Encimsko aktivnost cisteinskih katepsinov lahko zaznamo v sekretomih človeških makrofagov. 63
Slika 25: Imunodetekcija katepsinov B, L in S potrjuje njihovo prisotnost v sekretomih človeških makrofagov (A) in rakavih celic (B).. 64
Slika 26: V sekretomih diferenciranih celic U937 so cisteinski katepsini prisotni z okvirno koncentracijo 25 nM. 65
Slika 27: Zunajcelična proteoliza s katepsinoma L (A) in S (B) zmanjša depozicijo komponente C3c človeškega sistema komplementa.. 66
Slika 28: Cisteinska katepsina L in S zmanjšata depozicijo komponente C1q na površino rakavih celic MDA-MB-231. 66
Slika 29: Cisteinska katepsina L in S vplivata predvsem na klasično pot aktivacije sistema komplementa. 67
Slika 30: Cisteinska katepsina L in S cepita zunajcelično domeno membransko-usidranih proteinov NRP1 in CD44. 69
Slika 31: Cisteinska katepsina L in S skoraj povsem odstranita NRP1 s površine rakavih celic MDA-MB-231. 70
Slika 32: Človeški katepsin K cepi zunajcelično domeno MMP-14 v kislem in fiziološkem pH-okolju. 70
Slika 33: Zunajcelična aktivnost katepsina K privede do povišane želatinazne aktivnosti. 71
Slika 34: Tretiranje celic HT-144 z rekombinatnim človeškim katepsinom K privede do zmanjšane adhezije celic. 73
Slika 35: Predpostavljena zunajcelična vloga apoptotskih kaspaz-3 in -7 v mikrookolju tumorja. 76
Slika 36: Cisteinska katepsina L in S s proteolitično cepitvijo zunajceličnih domen membransko-usidranih proteinov vplivata na aktivacijo sistema komplementa v tumorskem mikrookolju. 81
Slika 37: Cisteinski katepsin K sprosti metaloproteazo matriksa MMP-14 z membrane rakavih celic. 83
Slika 38: Pokritost aminokislinskih zaporedij izbranih 10-ih identificiranih potencialnih zunajceličnih substratov kaspaz-3 in -7 z identifikacijskimi peptidi. 92
Slika 39: Bioinformatska napoved potencialnih cepitvenih mest se sklada z rezultati imunološke detekcije v primeru izbranih substratov. 93

Tabele

Tabela 1: Sestava poliakrilamidnega gela za NaDS PAGE. z 12,5 % zamreženostjo ločevalnega gela in 4 % zamreženostjo koncentracijskega gela. 40
Tabela 2: Uporabljeni eksperimentalni pogoji za spremljanje vpliva katepsina K na zaznavno želatinazno aktivnost. 43
Tabela 3: Sestava gela za NaDS PAGE z želatino. 44
Tabela 4: Uporabljeni eksperimentalni pogoji za spremljanje vpliva katepsina K na adhezijo rakavih celic....45
Tabela 5: Izbrani identificirani zunajcelični substrati apoptotskih kaspaz-3 in -7 51
Tabela 6: Razmerja spektralnega štetja za izbrane membransko-usidrane proteine 59
Tabela 7: Seznam vseh identificiranih zunajceličnih substratov apoptotske kaspaze-3 s celične linije MDA-MB-231....87
Tabela 8: Seznam vseh identificiranih zunajceličnih substratov apoptotske kaspaze-7 s celične linije MDA-MB-231....90
Tabela 9: Izmerjene vrednosti pH v koncentriranih celičnih gojiščih celic Jurkat E6-1....94

Kratice

Ab	...	protitelo; ang. antibody
ABC	...	amonijev bikarbonat; ang. ammonium bicarbonate
Ac-DEVD-AFC	...	acetil-L-Asp-L-Glu-L-Val-L-Asp-7-amino-4-trifluorometilkumarin; ang. N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-Trifluoromethylcoumarin
ADAM	...	membranski adamalizini; ang. a disintegrin and metalloproteinase
ADAMTS	...	topni adamalizini; ang. a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif
ang.	...	angleško
APAF-1	...	aktivirajoči dejavnik 1, ki aktivira apoptotske proteaze; ang. apoptotic protease activating factor-1
ATCC	...	ameriška zbirka tipskih kultur; ang. American Type Culture Collection
ATPaza	...	adenozintrifosfataza; ang. adenosine 5'-triphosphatase
BAK	...	antagonist 1 proteinov družine BCL-2; ang. BCL2 antagonist/killer 1
BAX	...	regulator apoptoze X, ki je povezan z BCL-2; ang. BCL-2 associated X, apoptosis regulator
BCL-2	...	protein B-celični limfom-2; ang. B-cell lymphoma 2
BH3	...	domena 3, ki je homologna domeni BCL-2; ang. BCL-2 homology domain 3
BID	...	agonist domene smrti, ki interagira z BH3; ang. BH3 interacting domain death agonist
BIM	...	mediator celične smrti, ki interagira z BCL-2; ang. BCL-2-interacting mediator of apoptosis
BIR	...	domena, ki vsebuje ponovitev iz inhibitorja apoptoze iz bakulovirusov; ang. baculovirus inhibitor of apoptosis repeat
C3aR	...	receptor za komponento sistema komplementa C3a; ang. C3a receptor
C5aR	...	receptor za komponento sistema komplementa C5a; ang. C5a receptor
cAMP	...	ciklični adenozin monofosfat; ang. cyclic adenosine monophosphate
CARD	...	domena, ki rekrutira kaspaze; ang. caspase recruitment domain
casp3	...	kaspaza-3; ang. caspase-3
casp7	...	kaspaza-7; ang. caspase-7
CD4+	...	oznaka za celice, ki na površini izražajo glikoprotein CD4; ang. cluster of differentiation 4
CD8+	...	oznaka za celice, ki na površini izražajo glikoprotein CD8; ang. cluster of differentiation 8
cFLIP	...	celični protein, ki inhibira FLICE; ang. cellular FLICE-inhibitory protein

CHAPS	... 3-[(3-holamidopropil)dimetilamoniio]-2-hidroksi-1-propanesulfonat; ang. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CTLA-4	... s citotoksičinimi limfociti T povezan protein 4; ang. cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
ctrl	... kontrola; ang. control
DAMPs	... molekulski vzorci značilni za nevarnost; ang. damage-associated molecular patterns
DED	... efektorska domena smrti; ang. dead effector domain
dH_2O	... destilirana voda; ang. distilled water
DISC	... smrt inducirajoči signalni kompleks; ang. death inducing signalling complex
DMEM	... po Dulbeccu spremenjen medij Eagle; ang. Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	... dimetilsulfoksid; ang. dimethyl sulfoxide
DNA	... deoksiribonukleinska kislina; ang. deoxyribonucleic acid
DNaza	... encim, ki razgrajuje DNA; ang. DNAse, deoxyribonuclease
domena CUB	... domena, ki so jo najprej odkrili pri komponentah komplementa C1r/C1s (C), rastnem faktorju uEGF (U) in proteinu BMP-1 (B)
DPBS	... fosfatni pufer po Dulbeccu; ang. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	... ditiotreitol; ang. dithiothreitol
E-64	... (1S,2S)-2-(((S)-1-((4-guanidinobutil)amino)-4-metil-1-oksopentan-2-il)karbamoil)ciklopropankarboksilna kislina
E-64d	... etilni ester E-64, ki prehaja celično membrano
ECACC	... evropska zbirka celičnih kultur; ang. European Collection of Cell Cultures
ECM	... zunajcelični matriks; ang. extracellular matrix
EDTA	... etilendiamintetraocetna kislina; ang. ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	... receptor za epidermalni rastni dejavnik; ang. epidermal growth factor receptor
EphA2	... efrinski receptor 2 tip A; ang. ephrin type-A receptor 2
FADD	... adapterski protein, ki vsebuje s Fas-om povezano domeno smrti; ang. Fas-associated death domain
FADD	... s Fas-om povezan protein preko domene smrti; ang. Fas associated via death domain
FBS	... fetusni serum goveda; ang. fetal bovine serum
FBS HI	... toplotno obdelan fetusni serum goveda; ang. heat inactivated fetal bovine serum
FDR	... delež napačnih uvrstitev; ang. false discovery rate
gMFI	... geometrijska sredina intenzitete fluorescence; ang. geometric mean fluorescence intensity
GSDME	... gasdermin E; ang. gasdermin E
GTPaza	... gvanozintrifosfataza; ang. guanosine-5'-triphosphatase
GVB++	... veronalni pufer z dodanimi želatino, $CaCl_2$ in $MgCl_2$ (ang. gelatin veronal buffered saline)
HBSS	... raztopina soli bogatih z bikarbonatnimi ioni, ki jo je razvil John H. Hanks; ang. Hank's Balanced Salt Solution
HCl	... klorovodikova kislina; ang. hydrochloric acid
hctsB	... človeški katepsin B; ang. human cathepsin B
hctsK	... človeški katepsin K; ang. human cathepsin K
hctsL	... človeški katepsin L; ang. human cathepsin L

hctsS	... človeški katepsin S; ang. human cathepsin S
HEPES	... 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-iletan-1-sulfonska kislina; ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPCL	... tekočinska kromatografija visoke ločljivosti; ang. high-performance liquid chromatography
IAA	... 2-jodoacetamid; ang. 2-iodoacetamide
ID	... identifikacijska oznaka; ang. identifier
IJS	... Institut "Jožef Stefan"
LC-MS/MS	... tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo; ang. liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LDL	... lipoptorein z majhno gostoto; ang. low-density lipoprotein
MAC	... kompleks, ki napade membrano; ang. membrane attack complex
MASP	... z manozo-povezana serinska proteaza; ang. mannose-associated serine protease
MBL	... lektin, ki veže manozo; ang. mannose-binding lectin
MES	... 2-(N-Morfolino)-etan sulfonska kislina; ang. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MHC II	... poglavitni histokompatibilnostni kompleks razreda II; ang. major histocompatibility complex class II
MMP	... metaloproteaza matriksa; ang. matrix metalloproteinase
MMTS	... metil metantiosulfonat; ang. methyl methanethiosulfonate
MOMP	... permeabilizacija zunanje membrane mitohondrija; ang. mitochondrial outer membrane permeabilization
MS	... masna spektrometrija; ang. mass spectrometry
MW	... molekulska masa; ang. molecular weight
NaDS	... natrijev dodecilsulfat; ang. sodium dodecylsulfate
NF-κB	... jedrni dejavnik κB; ang. nuclear factor κB
NOXA	... protein 1, ki ga aktivira PMA; ang. PMA-induced protein 1
NRP-1	... nevropilin-1; ang. neuropilin-1
ns	... nesignifikantno; ang. nonsignificant
NSF	... N-etilmaleimid občutljiv factor; ang. N-ethylmaleimide-sensitive factor
PAGE	... poliakrilamidna gelska elektroforeza; ang. polyacrylamide gel electrophoresis
PAMPi	... s patogeni povezani molekulski vzorci; ang. pathogen-associated molecular patterns
PD-L1	... ligand za receptor programirane celične smrti 1; ang. programmed death-ligand 1
PE	... ang. phycoerythrin
PI	... propidijev jodid; ang. propidium iodide
PIC	... koktajl inhibitorjev proteaz; ang. protease inhibitor cocktail
PIDD	... protein z domeno smrti, katerega izražanje regulira prepisovalni dejavnik p53; ang. p53-induced protein with a death domain
PMA	... forbol 12-miristat-13-acetat, ang. phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	... fenilmetilsulfonil fluorid; ang. phenylmethylsulfonyl fluoride
PS	... fosfatidilserin; ang.
PUMA	... modulator apoptoze, ki ga regulira p53; ang. p53-upregulated modulator of apoptosis
RING	... s cisteini bogata domena, ki jo kodira gen RING; angl. Really Interesting New Gene

RPMI	...	celično gojišče, ki so ga razvili na Roswell Park Memorial Institute; ang. medium developed by Moore et. Al. at Roswell Park Memorial Institute
SCR	...	razmerje spektralnega štetja; ang. spectral count ratio
STS	...	stavrosporin; ang. staurosporine
TBS	...	pufer s Trisom in NaCl; ang. Tris-buffered saline
TCA	...	trikloroocetna kislina; ang. trichloroacetic acid
TEMED	...	N,N,N′,N′-tetrametiletilen-1,2-diamin; ang. N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine
TGFβ	...	tumorski rastni faktor β; ang. transforming growth factor β
TNFR1	...	član 1A naddružine receptorjev za TNF ; ang. TNF receptor superfamily member 1A
TNFα	...	factor tumorske nekroze α; ang. tumour necrosis factor alpha
TRADD	...	protein z domeno smrti, ki je povezan s TNFR1; ang. TNFR1-associated death domain protein
TRAIL	...	s TNF-jem povezan ligand, ki inducira apoptozo; ang. TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAILR1	...	receptor 1 za TRAIL; ang. TRAIL receptor 1
try		tripsin; ang. trypsin
UniProtKB	...	univerzalna podatkovna baza proteinov; ang. The Universal Protein Resource Knowledgebase
VISTA	...	imunoglobulin z domeno V, ki zavira aktivacijo limfocitov T; ang. V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation
XIAP	...	z X-povezan inhibitor apoptoze; ang. X-linked inhibitor of apoptosis protein
zFR-AMC	...	N-benziloksikarbonil-L-Phe-L-Arg metilkumarin
zFVR-AMC	...	N-benziloksikarbonil-L-Phe-L-Val-L-Arg metilkumarin
zRR-AMC	...	N-benziloksikarbonil-L-Arg-L-Arg metilkumarin
zVAD-FMK	...	N-benziloksikarbonil-L-Val-L-Ala-L-Asp(O-Me) fluorometilketon

Poglavje 1

Uvod

1.1 Cisteinske proteaze

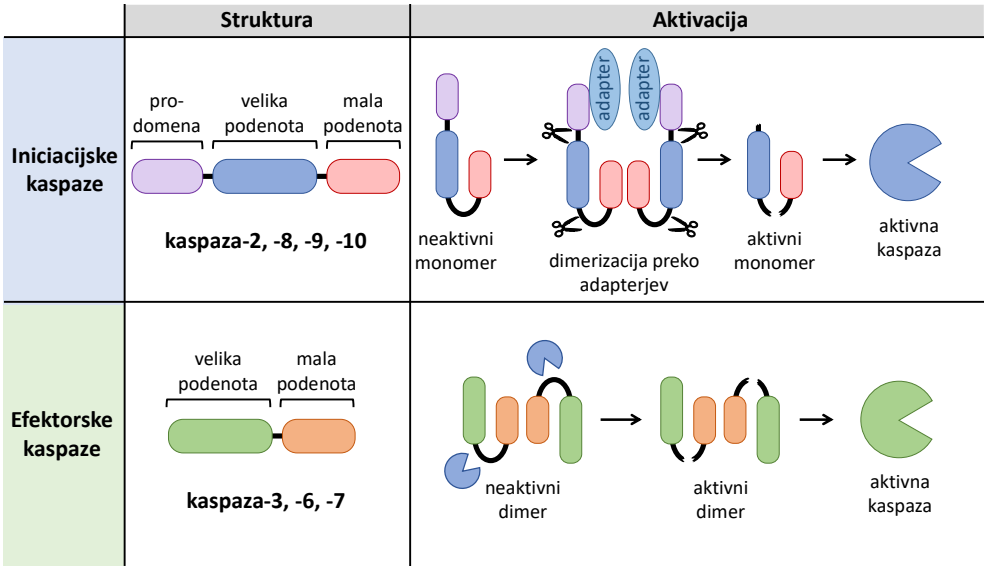
Cisteinske proteaze so proteolitični encimi, ki v aktivnem mestu vsebujejo aminokislinski ostanek cistein, ki s tiolno skupino svoje stranske verige ob cepitvi peptidne vezi v proteinu kot nukleofil napade karbonilni ogljik peptidne vezi [1, 2]. Gre za veliko skupino proteaz, ki jih glede na klasifikacijo organizmov lahko najdemo tako v bakterijah kot predstavnicah prokariontov kot tudi v evkariontskih organizmih, torej rastlinah, sesalcih in glivah, ter nenazadnje tudi pri različnih virusih [3]. V organizmu cisteinske proteaze nato vršijo tako fiziološke vloge, saj med drugim sodelujejo pri lizosomski proteolizi, programirani celični smrti, procesiranju antigenov, aktivaciji prohormonov in vzdrževanju homeostaze skeleta, kot tudi patološke vloge, saj napake pri njihovi regulaciji spremljajo mnoga bolezenska stanja, med drugim rakava obolenja, Alzheimerjevo bolezen, ishemične poškodbe možganov in srca, endotoksični šok ter pankreatitis [3, 4]. Po klasifikaciji MEROPS cisteinske proteaze delimo v 11 klanov, pri čemer najobsežnejša klana predstavljata klan CA, v katerega spadajo papainu-podobne cisteinske proteaze, in klan CD, v katerega spadajo cisteinske proteaze s strogo specifičnostjo za aminokislinski ostanek na mestu P1 glede na poimenovanje mest po Schechter–Berger [1, 5, 6]. Klani so nadalje razdeljeni še na družine in med papainu-podobnimi cisteinskimi proteazami so največje družine papainska (C1), kalpainska (C2) in streptopapainska družina [7], medtem ko klan CD najlažje razdelimo na družine glede na aminokislinski ostanek prisoten na mestu P1, in sicer družine C11, C25 in C50 preferirajo arginin ali lizin, družina C13 preferira asparagin in družina C14, ki jo sestavljajo kaspazi-1 sorodne proteaze in ki preferira aspartat [2]. Med cisteinskimi proteazami, ki so prisotne pri človeku, kot najpomembnejše štejemo lizosomske katepsine, ki so ključni predvsem za lizosomsko proteolizo, citosolne kalpaine, ki so vpleteni v regulacijo signaliziranja preko celične membrane, in kaspaze, ki imajo ključno vlogo pri regulaciji vnetja in celične smrti [1, 8-10].

1.1.1 Apoptotske kaspaze

Kaspaze pri človeku predstavljajo skupino 13-ih cisteinskih proteaz, ki v aktivnem mestu vsebujejo evolucijsko ohranjeno katalitično diado sestavljeno iz cisteina in histidina in na mestu P1 preferirajo aspartatni aminokislinski ostanek, torej cepijo peptidno vez na C-koncu aspartatnih ostankov [11, 12]. Po klasifikaciji spadajo v družino C14 klana CD in nadalje jih lahko glede na njihovo vlogo delimo na apoptotske, vnetne in neapoptotske [13]. Pri človeku vnetne kaspaze predstavljajo kaspaze-1, -4 in -5, kaspaza-14, ki deluje predvsem kot mediator pri diferenciaciji keratinocitov [14], predstavlja nevnetno kaspazo, medtem ko preostalih sedem kaspaz uvrščamo med apoptotske kaspaze, in sicer kaspaze-2, -8, -9 in -10 predstavljajo iniciacijske kaspaze, kaspaze-3, -6 in -7 pa efektorske kaspaze [13, 15]. Vendar v vseh primerih ne gre za absolutne delitve, saj kaspaze vršijo precej različnih vlog,

ki se med seboj prekrivajo in poleg osnovne vloge pri izvršitvi apoptoze, v primeru apoptotskih kaspaz, oziroma piroptoze v primeru vnetnih kaspaz, sodelujejo med drugim tudi pri procesih diferenciacije, regulacije celičnega cikla in migracije celic [16].

Glavno vlogo pri klasifikaciji kaspaz so imele raziskave z izbitjem genov za posamezne kaspaze, pri čemer se je izbitje genov za apoptotske kaspaze-3, -8 in -9 izkazalo za nezdružljivo z življenjem [17-21]. Prav tako so v teh primerih opazili kopičenje celic, ki bi v normalnih razmerah morale sprožiti celično smrt, kar je pripomoglo k identifikaciji kaspaz kot glavnih izvršiteljic apoptoze, pri sesalcih ključne oblike programirane celične smrti med normalnim razvojem [22]. Nadaljnja delitev apoptotskih kaspaz na iniciacijske in efektorske pa temelji na njihovi strukturi in načinu aktivacije (slika 1). Tako iniciacijske kot efektorske kaspaze se izražajo v obliki neaktivnih cimogenov sestavljenih iz prodomene in katalitične domene, ki je sestavljena iz male in velike podenote, nadaljnja aktivacija cimogenov pa poteče po različnih mehanizmih [15]. Za aktivacijo iniciacijskih kaspaz morajo le-te tvoriti dimere, ki nastanejo na makromolekulskih kompleksih, in sicer se mora v primeru kaspaz-8 in -10 sestaviti kompleks DISC [23, 24], v primeru kaspaze-9 apoptosom [25], medtem ko aktivacija kaspaze-2 poteče na kompleksu PIDDosom [26]. Posledično struktura iniciacijskih kaspaz vsebuje večjo prodomeno, katere sestavni del je domena smrti, in sicer CARD v primeru kaspaz-2 in -9 [27, 28] ter DED v primeru kaspaz-8 in -10 [23, 29], preko katere poteče vezava z adapterskimi proteini znotraj ustreznega makromolekulskega kompleksa. Ob dimerizaciji lokalno naraste koncentracija neaktivnih monomerov iniciacijskih kaspaz, ki se posledično drug drugemu tako približajo, da lahko poteče avtokatalitična cepitev povezovalne regije med veliko in malo podenoto [30]. Tako nastanejo aktivni monomeri iniciacijskih kaspaz, ki lahko nato aktivirajo efektorske kaspaze. Le-te se namreč sprva v celici nahajajo v obliki neaktivnih dimerov in šele cepitev povezovalne regije med veliko in malo podenoto, ki jo katalizirajo iniciacijske kaspaze, privede do preureditve zank znotraj strukture in vzpostavitve konformacije aktivnega mesta [31].



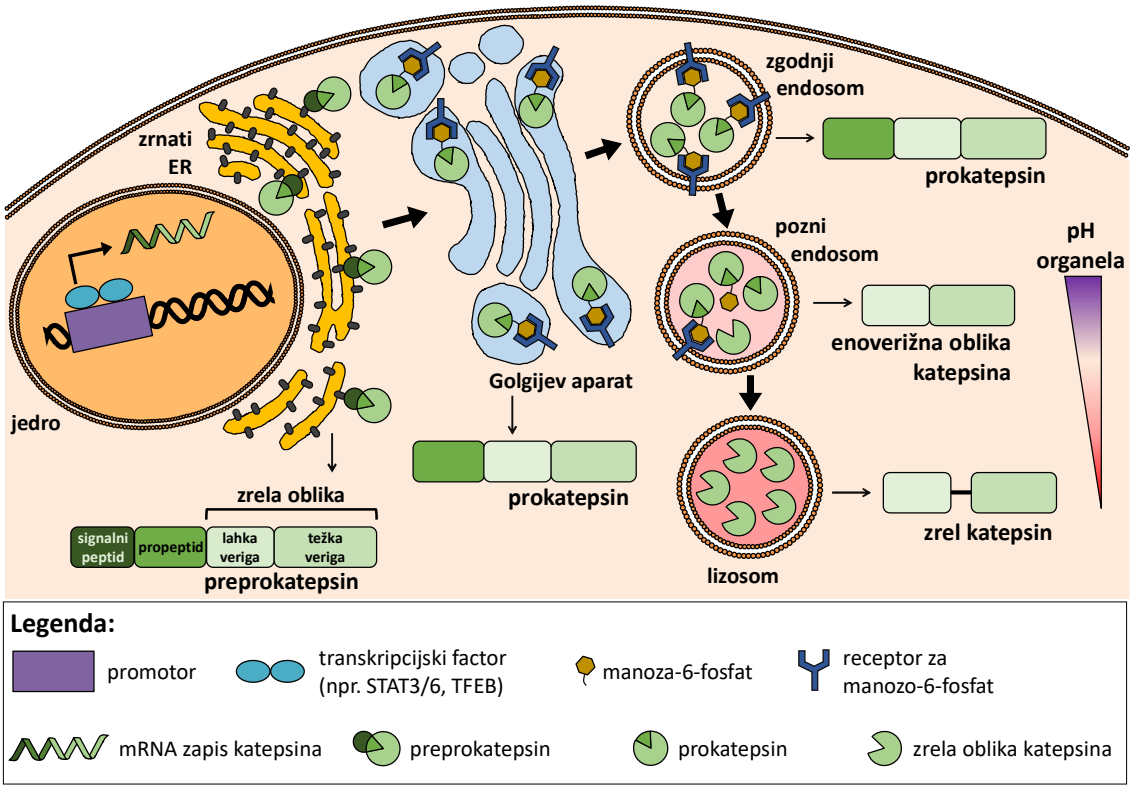
Slika 1: Iniciacijske in efektorske apoptotske kaspaze se aktivirajo po različnih mehanizmih aktivacije. Aktivacija iniciacijskih kaspaz poteče po njihovi vezavi v makromolekulske komplekse in posledični dimerizaciji, ki privede do njihovega zbližanja ter avtokatalitične aktivacije. Aktivne iniciacijske kaspaze nato cepijo povezovalno regijo med malo in veliko podenoto efektorskih kaspaz ter tako poskrbijo za njihovo aktivacijo.

Apoptotske kaspaze v fizioloških delujejo kot ključni encimi za izvedbo apoptoze zato napake v njihovi regulaciji spremljajo številna patološka stanja, med drugim rakava obolenja in vnetne bolezni [10]. Nezadostna aktivacija kaspaz namreč vodi v povečano preživetje celic, kar v primeru rakavih obolenj spodbuja tumorigenezo [32], medtem ko prekomerno aktivacijo kaspaz spremlja povečano umiranje celic, kar opazimo predvsem v primeru vnetnih in nevrodegenerativnih bolezni [10, 33]. Posledično gre za dobro regulirane proteaze, tako z endogenimi inhibitorji, predvsem iz družine IAP [34], kot preko posttranslacijskih modifikacij, kot na primer fosforilacija in S-nitrozilacija. Dodatno je regulirana tudi njihova lokalizacija, saj se apoptotske prokaspaze načeloma nahajajo v različnih celičnih razdelkih kot njihovi substrati, torej lahko le-te proteolitično cepijo šele po translokaciji, ki sledi sprožitvi apoptoze [35, 36]. Inhibitorji iz družine IAP večinoma, z izjemo XIAP, ki z domeno BIR2 inhibira kaspazo-9, z domeno BIR3 pa kaspazi-3 in -7 [37], ne inhibirajo kaspaz direktno, ampak skrbijo za njihovo ubikvitinacijo in posledično nadaljnjo proteasomsko razgradnjo, saj poleg domene BIR, ki služi za interakcijo s kaspazami, vsebujejo tudi domeno RING, ki deluje kot ubikvitin ligaza E3 [38]. Dodatno za regulacijo skrbijo tudi proteini, ki z domenami, ki so strukturno podobne prodomenam iniciacijskih apoptotskih kaspaz, interagirajo z adapterskimi proteini v makromolekulskih kompleksih in posledično z iniciacijskimi kaspazami tekmujejo za vezavo ter tako posredno preprečijo aktivacijo iniciacijskih kaspaz [39]. Pri človeku je takšen protein cFLIP, ki se izraža v obliki treh isoform in kot kaspazi-8 in -10 vsebuje domeno DED preko katere lahko interagira z adapterskim proteinom FADD in lahko v kompleksu DISC nadomesti neaktivne monomere kaspaz-8 in -10 ter tako vpliva na njuno aktivacijo [40, 41]. Regulacija aktivnosti kaspaz pa poteka tudi preko pH-okolja same celice. Čeprav so kaspaze v osnovi aktivne le znotraj ozkega območja pH okoli fiziološkega pH [42], pa so pokazali, da nakisanje citosola celice spodbuja aktivacijo in nadaljnjo encimsko aktivnost predvsem kaspaz-2 in -9 ter tako vpliva na potek apoptoze [43-45]. V splošnem gre torej za znotrajcelične proteaze, ki glede na proteomske raziskave lahko cepijo več kot 1500 proteinskih substratov in tako ključno vplivajo na celično signaliziranje predvsem v kontekstu programirane celične smrti [46].

1.1.2 Cisteinski katepsini

Cisteinski katepsini so cisteinske proteaze iz klana CA, natančneje iz družine C1, saj gre za papainu-podobne proteaze z značilnim papainu-podobnim zvitjem sestavljenem iz leve in desne domene, ki tvorita aktivno mesto sestavljeno iz katalitične diade cisteina in histidina [47, 48]. Pri človeku so do sedaj odkrili 11 cisteinskih katepsinov, in sicer endopeptidaze katepsine F, K, L, S, O, V, karboksipeptidazo katepsin X, aminopeptidazi katepsina C in H ter nekoliko poseben katepsin B, ki sicer večinoma deluje karboksipeptidaza, vendar lahko v okolju z nevtralnim pH deluje tudi kot endopeptidaza, ter katepsin W, katerega peptidazna aktivnost še ni znana [49, 50]. V osnovi gre za znotrajcelične proteaze, ki se navadno nahajajo v endosomih in lizosomih, kjer skrbijo predvsem za razgradnjo proteinov. Poleg razgradnje proteinov pa cisteinski katepsini sodelujejo med drugim tudi pri procesiranju in predstavljanju antigenov z molekulami razreda MHC II, preoblikovanju kostnega tkiva, diferenciaciji keratinocitov in aktivaciji prohormonov [51-53]. Glede na raznolike fiziološke funkcije je temu prilagojeno tudi izražanje cisteinskih katepsinov, saj se večinoma izražajo ubikvitarno z izjemo katepsina K, ki se izraža pretežno v osteoklastih [54], katepsina S, ki je prisoten predvsem v antigen predstavitvenih celicah [55-57], katepsina V, ki se nahaja predvsem v timusu in testisih [58], ter katepsina W, ki ga izražajo predvsem naravne celice ubijalke in citotoksične T-celice [59].

Vsi cisteinski katepsini se izražajo v obliki neaktivnih cimogenov, ki se nato aktivirajo v endolizosomalnem sistemu, nakar je njihova aktivnost nadalje regulirana z endogenimi inhibitorji, med drugim stefini, cistatini, kininogeni, tiropini in serpini, pH-okoljem in njihovo kompartmentalizacijo znoraj lizosomov [60, 61]. Zapisi za cisteinske katepsine torej vsebujejo signalno zaporedje, ki skrbi za usmerjanje, propeptid, ki prekriva aktivno mesto, in katalitične domene, ki je sestavljena iz lahke in težke verige ter se po transkripciji najprej prevedejo na ribosomih zrnatega endoplazemskega retikuluma, nakar jih signalno zaporedje usmeri v lumen. V naslednjem koraku se signalno zaporedje odstrani in poteče glikozilacija preostalega prokatepsina z manozo-6-fosfatom ter vezava glikoziliranega prokatepsina na receptor za manozo-6-fosfat znotraj Golgijevega aparata. Glikozilirani prokatepsini se nato vezani na receptorje usmerijo direktno v endolizosomalni sistem, kjer ob znižanju pH, ki spremlja zorenje zgodnjih endosomov do poznih endosomov in lizosomov, poteče njihova avotkatalitična aktivacija ali katalitična aktivacija z drugimi proteazami preko odcepa N-končnega propeptida (slika 2) [62, 63].



Slika 2: Izražanje in aktivacija cisteinskih katepsinov. Neaktivni preprokatepsini se v celicah sekvenčno aktivirajo ob nakisanju endosomov, ki spremlja njihovo zorjenje do lizosomov.

Aktivni cisteinski katepsini se nato, z izjemo katepsina C, ki tvori tetramer z molekulsko maso okoli 200 kDa, v lizosomih večinoma nahajajo v monomerni obliki in vršijo proteolizo v reducirajočem in šibko kislem pH-okolju [64]. V nevtralnem okolju je namreč večina katepsinov, z izjemo katepsina S, podvržena ireverzibilni inaktivaciji, ki je najbolj značilna predvsem za katepsin L [65-68]. Kljub temu pa so tako aktivno kot pro-obliko cisteinskih katepsinov našli tudi izven endolizosomalnega sistema, in sicer v citoplazmi, jedru in tudi zunajceličnem prostoru [69, 70]. Predvsem njihova zunajcelična lokalizacija je značilna za patološka stanja, najpogosteje za bolezni, ki jih spremlja vnetje [62]. V zunajceličnem okolju lahko katepsini namreč kljub večinoma nevtralnem pH-okolju zadržijo svojo aktivnost

predvsem preko vezave na različne polisaharide, ki nato tudi nadalje regulirajo njihovo aktivnost [71, 72]. Lahko pa se izločajo tudi v pro-obliki in nato aktivirajo šele v zunajceličnem okolju, nakar njihova zunajcelična koncentracija zadošča za proteolitično razgradnjo zunajceličnega matriksa [73-75]. Za njihovo izločanje so zaslužne predvsem imunske celice, saj lahko v sekretomih makrofagov zaznamo tudi do 100 nM koncentracijo cisteinskih katepsinov [76, 77], dodatno pa jih izločajo tudi keratinocite, osteoklasti, celice gladkega mišičnega tkiva in celice ščitnice [78]. Izločeni cisteinski katepsini lahko nato interagirajo tudi s komponentami celične membrane, kar jih prav tako lahko zaščiti pred ireverzibilno inaktivacijo v nevtralnem pH-okolju [62]. Dodatno pa lahko na zunajcelično prisotnost cisteinskih katepsinov vpliva samo mikrookolje celice, saj predvsem določena patološka stanja kot na primer artritis in rakava obolenja, spremlja nakisanje mikrookolja [79-82], kar spodbuja nadaljnje izločanje cisteinskih katepsinov [73].

V splošnem so cisteinski katepsini zaradi svojih raznolikih fizioloških vlog vpleteni v mnoga patološka stanja, saj njihova pretirana aktivnost ali spremenjena lokalizacija spremlja predvsem z vnetjem-povezane bolezni, med drugim rakava in kardiovaskularna obolenja, debelost, artritis in druge bolezni sklepov [53, 76, 78, 83]. Hkrati pa tudi njihovo pomanjkanje, predvsem kot rezultat genetskih mutacij, vodi v nastanek redkih dednih bolezni [84].

1.2 Programirana celična smrt

Programirana celična smrt je odziv organizma na fiziološke ali patološke signale smrti in jo regulirajo različne molekule zapisane v človeškem genomu [85]. Glavna funkcija programirane celične smrti je odstranitev odvečnih, okuženih ali neoplastičnih celic, kar pomeni, da je programirana celična smrt vpletena tako v vzdrževanje homeostaze organizma kot tudi v obrambo pred patogeni in patološkimi spremembami, ki spremljajo predvsem rakava obolenja [86]. Mehanistično gledano so sprva kot programirano celično smrt šteli le apoptozo, ampak kasnejše raziskave so pokazale, da tudi druge oblike celične smrti potekajo regulirano, zato med mehanizme programirane celične smrti prištevamo med drugim tudi piroptozo, NETozo, feroptozo, nekroptozo, avtofagno celično smrt, okseiptozo, celično smrt, ki jo povzročijo naravne celice ubijalke in citotoksične T-celice ter v določenih primerih tudi sekundarno nekrozo [85-87].

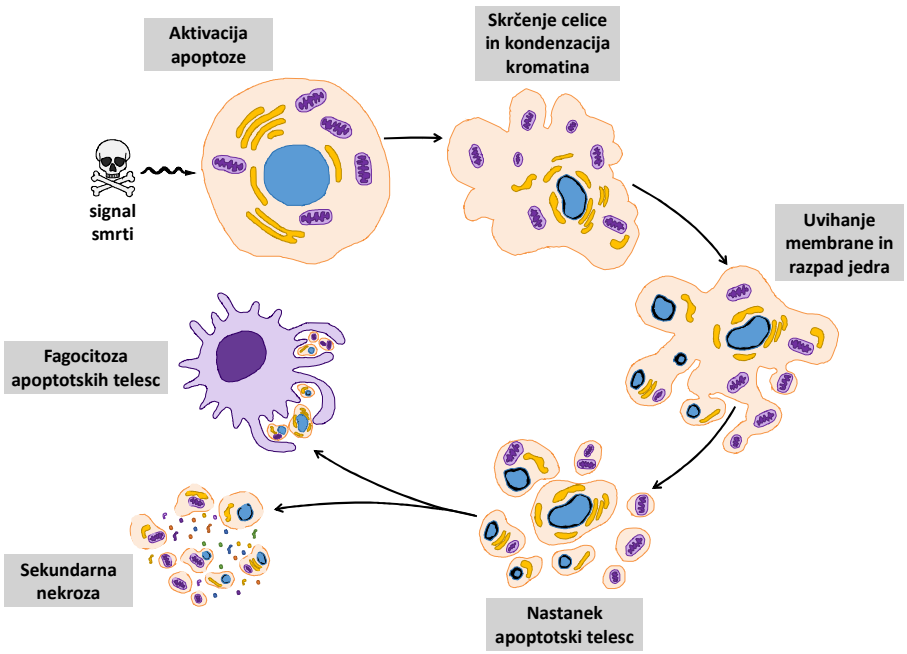
V splošnem lahko mehanizme programirane celične smrti razdelimo v dve večji skupini, in sicer imunogene oblike celične smrti, za katere je značilen nastanek por ali drugih vrzeli v plazemski membrani in posledična liza celic, ter imunološko tiho obliko celične smrti, ki je ne spremljata liza celic ter sprostitev znotrajceličnih komponent v zunajcelični prostor [85-87]. Edina oblika celične smrti za katero je značilno, da je načeloma ne spremlja liza celic je apoptoza, saj v primeru apoptoze nastala apoptotska telesca odstranijo fagociti in do lize celice pride le v primeru napredovanja apoptoze vse do sekundarne nekroze. Za preostale litične oblike celične smrti pa je značilno porušenje integritete celice zaradi nastanka lukenj v plazemski membrani, zaradi česar pride do vdora vode v calico, izgube membranskega potenciala, nabrekanja in končnga razpočenja celice [86]. Ob tem se v zunajcelični prostor sprostijo znotrajcelične komponente, ki so v primeru okuženih celic definirane kot s patogeni povezani molekulski vzorci (PAMPs), v primeru patološko spremenjenih ali poškodovanih celic pa kot molekulski vzorci značilni za nevarnost (DAMPs), in jih prepoznajo receptorji na plazemski membrani okoliških celic zaradi česar se sproži imunski odziv in pride do sproščanja pro-vnetnih citokinov [88].

Kljub morfološkim razlikam, ki spremljajo litične celične smrti v primerjavi z apoptozo, pa delitev ni absolutna, saj se molekulski mehanizmi različnih programiranih celičnih smrti

precej prekrivajo, zato lahko v odvisnosti od znotrajceličnih pogojev isti signali smrti privedejo do različnih oblik programirane celične smrti.

1.2.1 Apoptoza

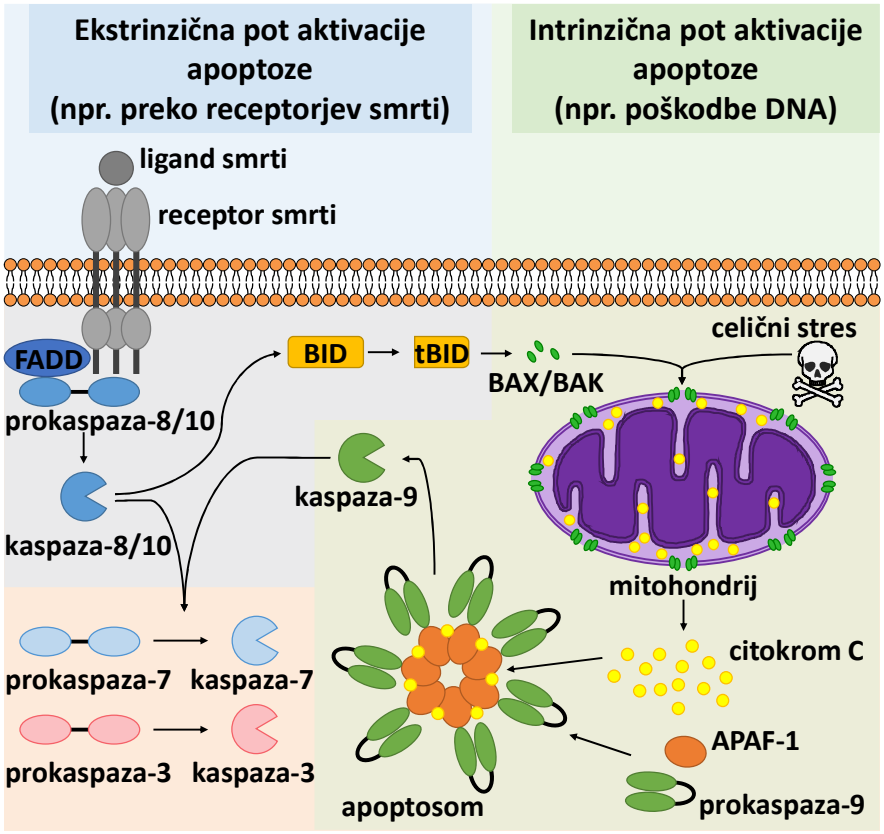
Apoptoza je imunološko tiha oblika celične smrti pri kateri imajo ključno vlogo iniciacijske in efektorske apoptotske kaspaze. Kaskadno aktivacija najprej iniciacijskih in nato efektorskih kaspaz sprožijo signali smrti, ki lahko delujejo ekstrinzično, torej preko receptorjev smrti, ali intrinzično, kar sproža mitohondrijsko ali s proteini iz družine BCL-2-regulirano apoptozo [89]. Morfološko nato tako ekstrinzična kot intrinzična pot apoptoze privedeta do nastanka apoptotskih telesc, ki jih nato odstranijo okoliški fagociti [85]. Sosledje dogodkov, ki privedejo do nastanka apoptotskih telesc, vsebuje skrčenje celice, fragmentacijo DNA [90], kondenzacijo kromatina in uvihanje membrane, ki jo propagirajo aktinsko-miozinska vlakna [91]. V zadnjem koraku so apoptotska telesca večinoma podvržena fagocitozi, le v redkih situacijah pa poteče njihova nadaljnja liza, kar vodi v proces sekundarne nekroze (slika 3). Fiziološko gledano gre torej za obliko programirane celične smrti, ki je ključna za normalen razvoj in homeostazo tkiva, saj skrbi za odstranitev odvečnih ali celo nevarnih celic, ki ogrožajo zdravje organizma [85, 86].



Slika 3: Morfološke spremembe celice, ki se zgodijo med potekom apoptoze. Za apoptozo je značilno skrčenje celice in nadaljnje uvihanje membrane, ki privede do nastanka apoptotskih telesc, ki jih nato odstranijo fagociti ali pa redkeje poteče njihova liza v obliki sekundarne nekroze.

Mehanistično gledano torej ločimo intrinzično in ekstrinzično pot apoptoze (slika 4), pri čemer se intrinzična pot sproži kot odgovor celice na znotrajcelični ali zunajcelični stres, ekstrinzična pa kot odgovor na vezavo ligandov smrti na receptorje smrti [86, 92]. Intrinzična pot se torej lahko sproži, ko celica zazna na primer poškodbe DNA [93, 94], okužbe z virusi ali bakterijami [95], pomanjkanje rastnih faktorjev [96], glukokortikoide [97], povečano koncentracijo reaktivnih kisikovih spojin [98] ali hipoksijo [99]. Dodatno pa do sprožitve intrinzične poti lahko privedejo procesi, ki spremljajo reorganizacijo tkiva, kot na primer izguba celičnih stikov, in steroidni hormoni ter citotoksična zdravila [86]. V

naslednjem koraku se med intrinzično potjo apoptoze poruši ravnotežje med pro-apoptotskimi proteini, ki vsebujejo le domeno BH3, in preživetvenimi proteini iz družine BCL-2, in sicer v smer pro-apoptotskih proteinov z domeno BH3, ki nato interagirajo s proteini iz družine BCL-2 ter jih tako inaktivirajo [100, 101]. Proteini iz družine BCL-2 namreč regulirajo potek apoptoze, tako da ločijo pro-apoptotska proteina BAX in BAK od zunanje mitohondrijske membrane in tako preprečijo njuno oligomerizacijo ter nastanek por v mitohondrijski membrani, ali pa preprečijo prehodno vezavo aktivatorjev BAX in BAK, ki jih predstavljajo pro-apoptotski proteini BID, BIM, PUMA in NOXA, ki vsebujejo le domeno BH3 [102]. Porušitev ravnovesja med proteini iz družine BCL-2 in proteini, ki vsebujejo le domeno BH3 torej privede do aktivacije pro-apoptotskih proteinov BAX in BAK, ki tvorita toroidne lipidne pore v zunanji mitohondrijski membrani ter privedeta do permeabilizacije zunanje membrane mitohondrija, kar je ena izmed glavnih značilnosti intrinzične poti apoptoze [103, 104]. Po permeabilizaciji se v citosol sprostijo mitohondrijski proteini, med drugim tudi citokrom C, ki so ključni za nadaljnji potek apoptoze. Citokrom C se namreč veže na dejavnik APAF-1, ki je sestavni del apoptosoma, ki služi kot platforma za aktivacijo iniciacijske kaspaze-9 [105]. Multimerni proteinski kompleks apoptosom je torej sestavljen iz citosolnega citokroma C, APAF-1 in prokaspaze-9, ki se veže na APAF-1 preko svoje domene CARD in to omogoči tvorbo homodimerov prokaspaze-9 ali heterodimerov prokaspaze-9 in APAF-1 ter nadaljnjo avtokatalitično aktivacijo prokaspaze-9 [106]. Aktivna kaspaza-9 nato proteolitično aktivira prokaspazi-3 in -7, ki sta glavni efektorski kaspazi tako intrinzične kot ekstrinzične poti apoptoze, ki z nadaljnjimi cepitvami privedeta do uničenja celice [86, 107].



Slika 4: Poenostavljen shematski prikaz ekstrinzične in intrinzične poti apoptoze. Obe poti apoptoze konvergirata na stopnji aktivacije efektorskih kaspaz-3 in -7 ter na nivoju permeabilizacije zunanje mitohondrijske membrane s strani proteinov BAK in BAX.

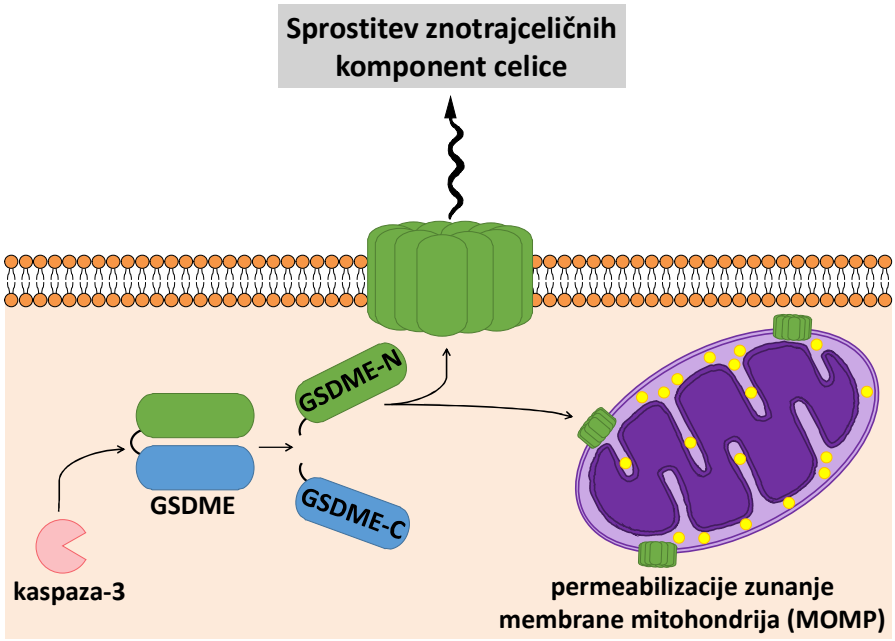
Tako intrinzična kot ekstrinzična pot apoptoze torej vodita do uničenja celice in nastanku apoptotskih telesc, vendar se med seboj razlikujeta po signalih smrti, ki ju sprožijo. Do sprožitve ekstrinzične poti namreč pride po vezavi ligandov smrti na ustrezne receptorje smrti, pri čemer kot ligandi najpogosteje delujejo ligand Fas, TNFα in TRAIL, medtem ko kot ustrezni receptorji smrti delujejo Fas, TNFR1 in TRAILR1 [102]. Za receptorje smrti je značilno, da vsebujejo znotrajcelične domene smrti, ki lahko vežejo adapterska proteina FADD ali TRADD in tako omogočijo sestavljanje multimernega proteinskega kompleksa DISC, ki služi kot platforma za aktivacijo prokaspaze-8 ali prokaspaze-10 [108, 109]. Le-ta se z domeno DED veže na adapterski protein, kar omogoči njeno nadaljnjo homodimerizacijo in avtokatalitično aktivacijo [108, 110]. Aktivna kaspaza-8 nato aktivira obe efektorski kaspazi-3 in -7, poleg tega pa lahko cepi tudi pro-apoptotski protein BID do njegove skrajšane oblike tBID, ki se translocira na zunanjo mitohondrijsko membrano, kjer deluje kot aktivator BAK in BAX in sproži njuno oligomerizacijo, ki privede do permeabilizacije zunanje mitohondrijske membrane [111]. S cepitvijo BID do tBID in nadaljnjim sproženjem permeabilizacije zunanje mitohondrijske membrane ekstrinzična pot apoptoze mehanistično konvergira z intrinzično.

Po aktivaciji iniciacijskih kaspaz torej tako po intrinzični kot po ekstrinzični poti le-te aktivirajo glavni efektorski kaspazi-3 in -7. Poleg njiju na podlagi homologije med efektorske kaspaze prištevamo tudi kaspazo-6, vendar podatki o njeni substratni specifičnosti nakazujejo, da je le-ta bolj vpletena v sam proces iniciacije kot izvedbe [46, 112, 113]. Katalitična aktivnost kaspaz-3 in -7 nato privede do smrti celice in značilnih morfoloških lastnosti apoptoze, kot so fragmentacija DNA [114], izpostavitev PS [115, 116] in nastanek apoptotskih telesc [117, 118]. Proteolitična vloga je natančno opisana predvsem za kaspazo-3, za katero so pokazali, da sproža fragmentacijo DNA s proteolitično inaktivacijo podenote alfa dejavnika fragmentacije DNA, kar sprosti njegovo podenoto beta, ki deluje kot znotrajcelična DNaza [119]. Dodatno, katalitična aktivnost kaspaze-3 spodbuja izpostavitev PS, saj tako fosfolipid skremblaze, ki izpostavijo PS, kot fosfolipid flipaze, ki ga internalizirajo, predstavljajo substrate kaspaze-3 [91, 120]. Kljub vlogi, ki jo kaspazi-3 in -7 igrata v izvršitvi apoptoze, pa njuna inhibicija s pankaspaznim inihibtorjem zVAD-FMK tako in vitro kot in vivo ne blokira povsem predvsem intrinzične poti apoptoze ampak zgolj privede do spremembe mehanizma po katerem celica umre s procesom programirane celične smrti [102, 121]. Pod določenimi pogoji, pa lahko pride do aktivacije efektorskih kaspaz tudi brez smrti celice, kar se najpogosteje zgodi kadar pride do permeabilizacije zunajcelične membrane samo dela mitohondrijev in le-to privede do subletalne aktivacije efektorskih kaspaz, ki ne vodi v takojšnjo smrt celice ampak zgolj poveča genomsko nestabilnost v celici [122]. Pri tem moramo upoštevati tudi možnost, da zaznana kaspazna aktivnost v resnici izhaja iz majhnega števila mrtnih celic, ki so prisotne tudi v primeru subletalnih pogojev.

1.2.2 Sekundarna nekroza

Sekundarno nekrozo pogosto ne štejemo kot samostojno programirano celično smrt, saj v predstavlja le končno stopnjo apopotitčne celične smrti v primerih, ko apoptotska telesca niso pravočasno odstranjena s fagocitozo [123]. Glede na to, da je sekundarna nekroza po morfoloških značilnostih podobna piroptozi, se namesto termina sekundarna nekroza proces pogosto opiše kot prehod celice iz apoptotičnega v piroptotični mehanizem programirane celične smrti [85]. V osnovi gre pri sekundarni nekrozi za progresivno porušenje integritete plazemske membrane apoptotičnih celic [124], kar v in vivo pogojih najpogosteje opazimo pri rakavih pacientih, ki se zdravijo z določenimi kemoterapevtiki ali z določenimi oblikami radiološkega zdravljena, pri boleznih lizosomov in pri okužbah s patogeni, ki sprožajo apoptozo celic [125-128]. V teh primerih namreč apoptotične celice niso pravočasno

odstranjene s strani fagocitov, ki v normalnih pogojih prepoznajo izpostavljen PS na membrane apoptotskih telesc in jih nato fagocitirajo [86]. Kadar pa pride v organizmu do masovne apoptoze, ki presega kapaciteto fagocitoze, ali pa je sam mehanizem fagocitoze okvarjen, le-to privede do prehoda apoptotičnih celic iz imunološko tihe apoptoze v imunogeno sekundarno nekrozo [129]. Sekundarno nekrozo lahko torej razumemo kot spontano napredovanje apoptoze, vendar raziskave kažejo, da ima lahko tudi mehanistično ozadje v katerega je vpletena efektorska apoptotska kaspaza-3. Sam process apoptoze lahko tako razdelimo na dve fazi, in sicer pred-nekrotično, ki ima morfološke značilnosti apoptoze, in nekrotično, ki je po morfoloških značilnostih podobna piroptozi [130]. Kaspaza-3 lahko namreč cepi gasdermin E za Asp270 in tako sprosti njegovo funkcionalno N-končno domeno, ki lahko tvori pore tako v plazemski kot tudi v zunanji mitohondrijski membrani (slika 5) [128, 131-133]. Vendar pa ne gre za univerzalno prisoten mehanizem, saj so tako pri nekaterih rakavih celičnih linijah kot pri makrofagih z izbitim genom za gasdermin E pokazali, da celice kljub temu napredujejo v sekundarno nekrozo, torej gre najverjetneje za redundanten mehanizem [134, 135]. Tako v primerih napredovanja v sekundarno nekrozo preko cepitve gasdermina E kot v primerih spontanega napredovanja pa to nekrotično fazo apoptoze karakterizirajo enake morfološke in biokemijske značilnosti, in sicer poteče nabrekanje plazemske membrane in njeno razpočenje ter posledična sprostitev znotrajceličnih komponent v zunajcelično okolje [124]. Napredovanje apoptoze v sekundarno nekrozo spremeni le-to v imunogeno obliko programirane celične smrti, kar lahko v določenih primerih, na primer v kontekstu imunogene smrti tumorskih celic, organizmu celo koristi [136]. Večinoma pa napredovanje v sekundarno nekrozo predstavlja škodljiv proces s pro-vnetnimi in imunogenimi posledicami [137], zaradi česar sekundarna nekroza pogosto spremlja patološka stanja, ki so povezana z akutnim ali kroničnim vnetjem, med drugim avtoimune bolezni [138], kronično obstruktivno pljučno bolezen [139], aterosklerozo [140], cistično fibrozo [141], astmo [142] in bronhiektazíjo [143].



Slika 5: Redundanten mehanizem sekundarne nekroze preko cepitve gasdermina E. Kaspaza-3 lahko sprosti funkcionalno domeno gasdermina E in tako omogoči njeno oligomerizacijo ter tvorbo por skozi katere se lahko znotrajcelične komponente sprostijo v zunajcelično okolje.

1.3 Rak

Rak kot bolezensko stanje opisuje več kot 250 različnih tipov rakavih obolenj in v svetovnem merilu predstavlja drugi najpogostejši vzrok smrti [144]. Letno namreč diagnosticirajo več kot 19 milijonov primerov rakavih obolenj in zabeležijo povprečno kar 10 milijonov smrti kot posledica teh obolenj [145]. Posledično le to predstavlja precejšnje breme tako za posameznika kot za družbo.

S stališča mehanizma razvoja in nastanka rakavih obolenj so se razvile štiri osnovne teorije, in sicer teorija nastanka zaradi somatskih mutacij, zaradi preoblikovanja tkiva, teorija nesrečnega naključja in teorija funkcionalnega stanja celice, ki povezuje elemente preostalih treh teorij v ravnovesje med stanjem razvoja in odpravljanja bolezni [146]. Osnovna in prva teorija torej predpostavlja, da je za nastanek rakavega obolenja ključno kopičenje somatskih mutacij v proliferajočih celicah [147], vendar se določena opažanja, med drugim spontana ali s hormoni-pogojena regresija tumorja [148, 149], in vivo opažen normalen razvoj laboratorijskih živali kljub injiciranju malignih teratomskih celic na nivoju blastociste [150] in pomanjkanje mutagenega učinka pri mnogih kancerogenih snoveh [151], ne skladajo s predpostavljeno teorijo. Kljub pomanjkljivostim teorije nastanka raka zaradi somatskih mutacij, se je na osnovi podobnih predpostavk razvila tudi teorija nesrečnega naključja, saj le-ta predpostavlja, da so za nastanek raka mutacije, ki nastanejo med podvajanjem DNA v matičnih celicah [152]. Ta teorija sicer delno upošteva zunanje dejavnike, ki vplivajo na nastanek raka, saj loči podedovane in okoljsko-povzročene mutacije, ampak še zmeraj predvideva, da gre za mutageni vpliv kancerogenov, zato še zmeraj ne naslovi opisanih pomanjkljivosti [146]. Posledično se je razvila bolj splošna teorija, ki pravi, da gre pri nastanku rakavih obolenj za delovanje karcenogenih snovi na nivoju celotnega tkiva, kar poruši biofizikalne in biomehanske povezave znotraj tkiva ter tako privede do porušenja zgradbe tkiva in nadalje do nastanka metaplazij, displazij in karcinomov [146]. Glede na raznolikost rakavih obolenj pa najverjetneje igrajo vlogo tako mutagene spremembe kot spremembe na ravni tkiva in to neodvisno od klasifikacije celic kot na primer matičnih ali progenitorskih [153]. Zaradi tega zadnja predstavljena teorija poveže elemente predhodnih teorij v teorijo funkcionalnega stanja celice, ki predpostavlja, da intrinzični faktorji, kot sta na primer staranje in poškodbe tkiva, ter ekstrinzični faktorji, kot na primer tobak, alkohol in sevanje, med obnovo in popravljanjem tkiva lahko privedejo do mutacij, ki jih organizem tolerira in ne vodijo v nastanek neoplazij, do takšnih zaradi katerih nastanejo neoplastične lezije, ki ne napredujejo nujno v nastanek karcinoma, in takšnih, ki povzročijo maligno transformacijo celic in vodijo v nastanek ekspanzivnih novotvorb [146, 153].

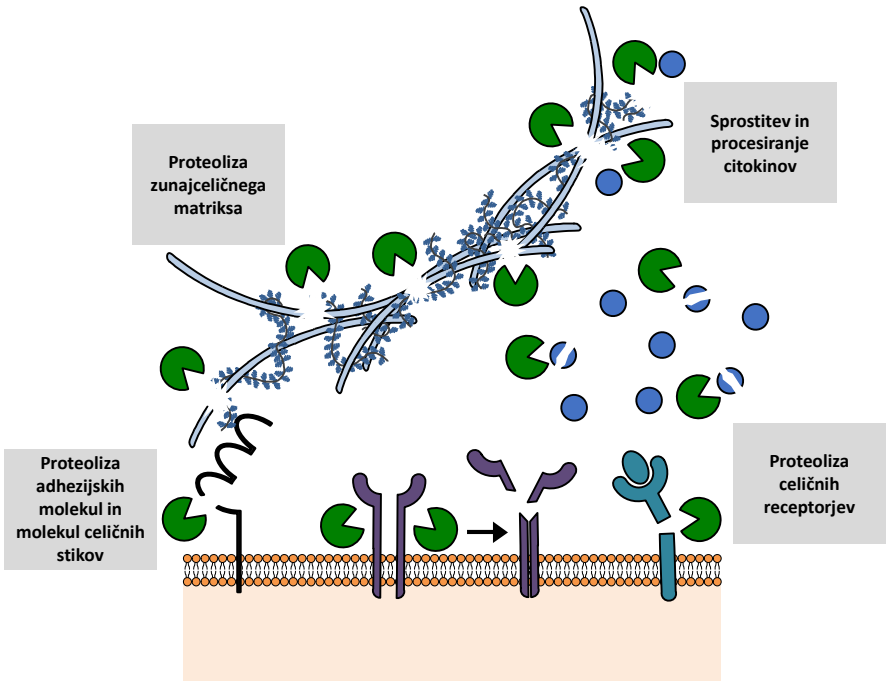
Ravno zaradi te kompleksnosti genotipa in fenotipa, ki spremlja rakava obolenja, se je razvila konceptualizacija v obliki značilnosti rakavih obolenj, ki poveže vse v skupek karakterističnih načel [154]. Trenutna karakteristična načela, ki opisujejo glavne značilnosti rakavih celic, so sposobnost vzdrževanja proliferativnega signaliziranja, izogibanja dejavnikom, ki zavirajo rast, kljubovanja celični smrti, aktivacije replikativne nesmrtnosti, induciranja nove ter invazije obstoječe vaskulature, aktivacije mehanizmov invazije in metastaziranja, reprogramiranja celičnega metabolizma in izmikanja uničenju s strani imunskega sistema [154]. V mehanizme, ki spremljajo vsako izmed karakterističnih načel, so vpletene tudi proteaze iz različnih skupin, zaradi česar lahko proteolitično cepitev razumemo kot eno ključnih ireverzibilnih posttranslacijskih modifikacij, ki spremlja nastanek in razvoj rakavih obolenj [155].

1.3.1 Proteoliza pri raku

Okvarjeno uravnavanje proteolize kot posledica povečanega izražanja proteaz ali porušenega ravnovesja med prisotnimi proteazami in njihovimi endogenimi inhibitorji ter nadaljnje napačno proženje celičnega signaliziranja, ki ga nadzorujejo proteaze, pogosto spremljata nastanek in razvoj raznih bolezni [156]. V primeru rakavih obolenj so v tumorskem mikrookolju prisotne proteaze iz vseh petih skupin proteaz, torej aspartatne, cisteinske, serinske in treoninske proteaze ter metaloproteaze [5] in okvare v regulaciji njihove proteolitične aktivnosti so do sedaj povezali z več procesi, ki spremljajo različne stopnje razvoja raka, in sicer med drugim s preoblikovanjem zunajceličnega matriksa [157], epitelno-mezenhimsko tranzicijo [158], izogibanjem imunskemu sistemu gostiteljskega organizma [159], in odpornostjo rakavih celic na signale, ki sprožajo apoptozo [160]. Proteolitična aktivnost pa vpliva tudi na rast in invazivnost tumorja ter na razvoj in širjenje metastaz [157, 161, 162]. V večini primerov gre proteolitično aktivnost v zunajceličnem prostoru in le v redkih primerih za strogo znotrajcelično proteolizo. Le-to lahko opazimo predvsem v primeru kaspaz in avtofaginov, ki spadajo med cisteinske proteaze, deubikvitinaz, ki vplivajo na signaliziranje preko NF-κB in so lahko iz skupine cisteinskih proteaz ali metaloproteaz, ter proteasomov, ki so najpomembnejši predstavniki skupine treoninskih proteaz z dokazano vlogo v razvoju in napredovanju rakavih obolenj [155, 163]. Pri proteazah, ki so odgovorne predvsem za znotrajcelično proteolizo pri raku, večina dosedanjih raziskav kaže, da je v rakavih celicah okvarjena regulacija njihovega izražanja. V primeru kaspaz gre večinoma za utišanje njihovega izražanja preko mutacij ali metilacije DNA, kar so do sedaj zaznali pri več različnih oblikah raka pri človeku [163]. Podobno je tudi z deubikvitzinazami, saj so njihovo zmanjšano izražanje ali celo popolno odsotnost izražanja zaznali pri različnih tipih rakavih obolenj [164], in v primeru proteasomov za katere so pokazali, da inhibicija njihove aktivnosti privede do povečane ravni apoptoze v rakavih celicah zaradi kopičenja pro-apoptotskih proteinov in prekinitve signaliziranja preko NF-κB [155]. Drugače je z avtofagini, saj so pri več rakavih obolenjih zaznali njihovo povečano izražanje [165]. Tako na primer študije kažejo, da se v iniciacijskih celicah raka na jajčnikih povečano izraža avtofagin-2, kar vodi v večjo odpornost teh celic na zdravila, večji migracijski potencial, pomanjkanje kontaktne inhibicije rasti in prisotnost karakteristik, ki so značilne za rakave matične celice [163]. Dodatno so v primeru raka na jajčnikih s slabšo prognozo in hitrejšo ponovitvijo bolezni zaznali tudi zmanjšano metilacijo gena za avtofagin-2 [166], medtem ko so v primeru HER2-pozitivnega raka dojk in kronične mieloidne levkemije zaznali povišano izražanje avtofagina-1 [167, 168]. Pogosteje pa je z razvojem in napredovanjem rakavih obolenj povezana zunajcelična proteoliza, ki je pogosto sklopljena tudi s spremenjeno lokalizacijo proteaz, kar je prav tako ena od značilnosti, ki spremlja različna rakava obolenja [169].

1.3.1.1 Zunajcelična proteoliza

V tumorskem mikrookolju poteka komunikacija med rakavimi in okoljskimi celicami, ki jo pogosto modulira ravno zunajcelična proteoliza, saj zunajcelične proteaze aktivirajo signalne molekule ali sodelujejo v prenosu signalov, ki lahko izvirajo iz samega zunajceličnega matriksa, topnih dejavnikov prisotnih v mikrookolju ali celičnih stikov [170]. Prvotno je za glavno vlogo zunajceličnih proteaz, ki je povezana z razvojem in napredovanjem rakavih obolenj, veljala proteoliza zunajceličnega matriksa, vendar le-ta ni edina, saj na napredovanje tumorja in nastanek metastaz vplivajo tudi cepitve, procesiranje ali odcep ektodomen adhezijskih molekul, rastnih faktorjev, celičnih receptorjev in citokinov (slika 6) [170, 171].



Slika 6: Zunajcelične vloge proteaz, ki spremljajo nastanek in napredovanje rakavih obolenj. Proteoliza v zunajceličnem prostoru spada med poglavitne značilnosti rakavih obolenj in vpliva tako na celično signaliziranje kot na adhezijo, motilnost in migracijo celic.

Proteaze, ki vršijo zunajcelično proteolizo, so lahko povezane s celično membrano ali pa jih celice izločajo v zunajcelični prostor [171] in najpogosteje spadajo v skupini metaloproteaz in serinskih proteaz [155, 170]. Poleg le-teh pa je zunajcelična lokalizacija v primeru rakavih obolenj značilna tudi za določene cisteinske proteaze, predvsem za cisteinske katepsine [76], ki v kislem mikrooklju tumorja lahko cepijo komponente zunajceličnega matriksa, kot na primer različne tipe kolagena, elastin, laminine, glikozaminoglikane in proteoglikane [172], vršijo odcep ektodomen adhezijskih molekul in celičnih receptorjev [77, 173] in procesirajo z vnetjem-povezane citokine in kemokine [174]. V osnovi pa so za zunajcelično proteolizo v mikrookolju tumorja odgovorne predvsem metaloproteaze, torej MMP-ji, ADAM-i in ADAMTS-ji, in serinske proteaze, najpogosteje plazmin in serinske proteaze, ki jih izločajo nevtrofilci [170, 171]. Samo izločanje omenjenih proteaz v mikrookolje tumorja stimulirajo predvsem različni citokini in rastni faktorji, ki jih izločajo predvsem tumorske celice lahko pa tudi druge celice prisotne v tumorskem mikrookolju [171]. Med citokini prednjačita TNFα in TGFβ, ki sta vpletena predvsem v izražanje in izločanje uPA in MMP-9 [175-178], medtem ko so za različne rastne faktorje pokazali, da poleg induciranja izražanja uPA vplivajo tudi na izražanje MMP-1 [179, 180]. Poleg tumorskih celic pa za prisotnost proteaz v mikrookolju tumorja skrbijo tudi celice strome, predvsem vnetne celice, ki prodrejo tumor, med drugim s tumorjem-povezani makrofagi, dendritične celice, mastocite in imunske celice [171]. Izločanje proteaz iz teh celic je prav tako regulirano z različnimi citokini, med katerimi prednjačita vnetna interlevkina IL-6 in IL-4, ki poleg vplivanja na izražanje in izločanje MMP-jev vplivata tudi na izražanje in izločanje cisteinskih katepsinov B, L in S [181-185], katerih koncentracija v sekretomih s tumorjem-povezanih makrofagov presega koncentracijo MMP-jev. Poleg tumorskih celic in celic strome pa pomemben del tumorskega mikrookolja predstavljajo tudi endotelijske celice, ki prav tako z izločanjem različnih citokinov inducirajo tako izražanje in izločanje MMP-jev kot tudi cisteinskih katepsinov [186, 187].

Prisotnost različnih proteaz v zunajceličnem okolju je torej rezultat parakrinega signaliziranja med rakavimi celicami in celicami strome ter različnih okoljskih dražljajev v mikrookolju tumorja, med drugim kisel pH zunajceličnega okolja in prisotnost hipoksičnih pogojev [171]

Skupno delovanje vseh proteaz prisotnih v zunajceličnem okolju privede do preoblikovanja tumorskega mikrookolja in lahko tako promovira kakor tudi zavira napredovanje tumorja. Zunajcelične proteaze lahko namreč direktno razgrajujejo zunajcelični matriks, kar je pomembno predvsem za invazivnost rakavih celic in za to razgradnjo primarno skrbi MMP-14, metaloproteaza matriksa membranskega tipa, ki poleg razgradnje komponent zunajceličnega matriksa lahko aktivira tudi druge MMP-je, predvsem MMP-2 in MMP-9, ki lahko nato razgrajujejo tudi komponente bazalne membrane, ki jih sama MMP-14 ne more [188-190]. Poleg razgradnje komponent zunjaceličnega matriksa lahko MMP-ji cepijo tudi adhezijske molekule in molekule medceličnih stikov, predvsem kadherin E, ki ga poleg MMP-jev [191] in ADAM-ov [192, 193] lahko cepijo tudi cisteinski katepsini [194] in proteolitične cepitve kadherina E nato, poleg porušenja medceličnih stikov, vplivajo tudi na različne signalne poti v tumorskem mikrookolju in v nekaterih primerih tudi spodbujajo epitelijsko-mezenhimski prehod [195, 196]. Dodatno lahko proteolitične cepitve komponent zunajceličnega matriksa privedejo tudi do nastanka matrikinov, bioaktivnih fragmentov komponent zunajceličnega matriksa, ki lahko nato delujejo kot ligandi in vplivajo na celično signaliziranje v mikrookolju tumorja[197]. Delovanje matrikinov lahko nato tako spodbuja kot zavira napredovanje tumorja. Tako zunajcelični katepsini kot MMP-ji lahko namreč s cepitvijo različnih tipov kolagena generirajo anti-angiogenske dejavnike, med drugim endostatin in tumostatin, ki delujejo kot inhibitorji angiogeneze in tako zavirajo rast tumorja in nastanek metastaz [198-201]. Po drugi strani pa lahko MMP-ji s cepitvami elastina in lamininov generirajo matrikine, ki delujejo pro-vnetno in spodbujajo rast tumorja ter razvoj metastaz [170].

Poleg opisanih posledic zunajcelične proteolize pa le-ta vpliva na tumorsko mikrookolje tudi preko cepitev celičnih receptorjev, procesiranja citokinov, kemokinov in rastnih dejavnikov ter odcepa ektodomen membransko-usidranih proteinov. Zunajcelične in transmembranske proteaze lahko namreč proteolitično aktivirajo celične receptorje [202] in sprostijo rastne dejavnike, ki so lahko vezani na komponente zunajceličnega matriksa ali direktno povezani s celično membrano [170, 171], kar nadalje vpliva predvsem na angiogenezo, rast tumorja in nastanek metastaz. S proteolitično aktivacijo predvsem rastnih faktorjev ali z njihovo sprostitvijo iz latentnih kompleksov v katere so vezani, proteaze v mikrookolju tumorja vplivajo tudi na proliferacijo in preživetje rakavih celic, pri čemer prednjači sproščanje inzulinu-podobnih rastnih dejavnikov [171, 203] in tumorskih rastnih faktorjev [204, 205], ki nato spodbujajo proliferacijo ali pa zavirajo apoptozo. S stališča nadzora apoptoze v tumorskem mikrookolju, je ključno predvsem proteolitično procesiranja liganda Fas, saj le-to generira različne topne oblike tega liganda [206], ki lahko inducirajo apoptozo rakavih celic in tako zavirajo njihovo rast ter nastanek metastaz [171] ali pa delujejo zaščitno in preprečijo smrt rakavih celic predvsem v primeru s kemoterapijo-sprožene citotoksičnosti [207]. Zunajcelična proteoliza kemokinov in citokinov pa najbolj vpliva na reguliranje imunskega odziva, ki spremlja rakava obolenja, pri čemer lahko cepitve privedejo tako do aktivacije kemokinov in posledično povišane kemotakse ali do inaktivacije in zaviranja kemotakse, kar regulira vdor vnetnih celic, ki lahko nato zavirajo ali spodbujajo rast tumorja [208]. Dodatno pa proteaze, ki so prisotne v tumorskem mikrookolju, lahko vršijo tudi odcep ektodomen membransko-usidranih proteinov. Odcep ektodomen opisuje proteolitično procesiranje membransko-usidranih proteinov, pri katerem se cepitvena mesta, ki jih prepoznajo zunajcelične ali transmembranske proteaze, nahajajo v neposredni bližini transmembranske regije ali lipidnega sidra, in sicer najpogosteje med 10 in 35 aminokislinskih ostankov vstran od

membrane [209]. Zmožnost odcepa ektodomen so do sedaj pokazali za vse tipe proteaz, ki so prisotne v tumorskem mikrookolju, vendar najpogosteje izvedbo to obliko proteolitičnega procesiranja membransko-usidranih proteinov izvajajo transmembranske metaloproteaze [170]. Med pomembnejše membransko-usidrane tarče spada glikozaminoglikan CD44, ki ga lahko cepijo tako različni MMP-ji kot cisteinski katepsini [77, 210], in predvsem za odcep njegove ektodomene s strani MMP-jev so do sedaj pokazali, da spodbuja migracijo rakavih celic [170]. Poleg odcepa ektodomene antigena CD44 lahko migracijo rakavih celic spodbuja tudi odcep ektodomene transmembranskega glikoproteina ICAM1, ki ga vršijo ADAM17, MMP-14 in MMP-9 [211-214]. Tarča proteolitičnega odcepa ektodomen pa so tudi različni sindekani, ki spadajo med heparan sulfatne proteoglikane, in jih poleg metaloproteaz cepita tudi serinski proteazi plazmin in trombin [170]. Dodatno pa lahko proteaze v tumorskem mikrookolju odcepijo tudi ektodomene celičnih receptorjev, med drugim EphA2 in EGFR, kar vpliva na celično signaliziranje v rakavih celicah [215, 216].

1.3.2 Aktivacija imunskega odziva pri raku

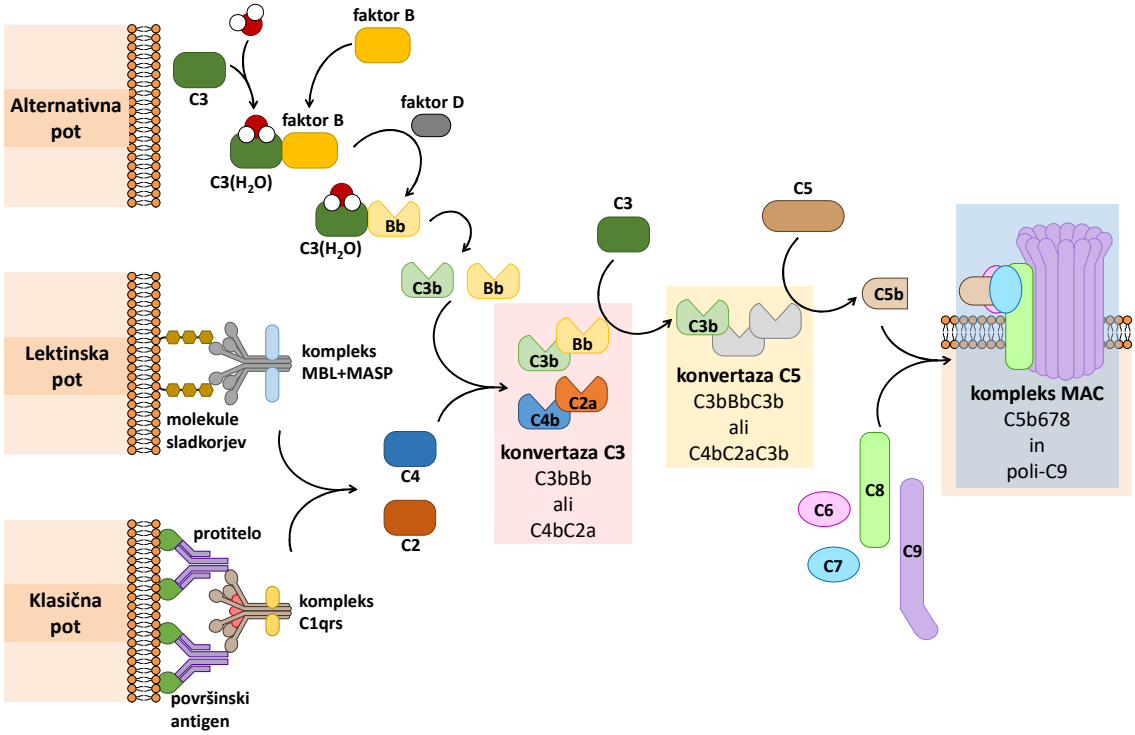
Osnovna vloga imunskega sistema je aktivacija imunskega odziva kot odgovor na porušeno homeostazo telesa predvsem zaradi travme, vdora patogenov ali deregulacije telesnih celic [217]. Aktivacija imunskega odziva posledično spremlja širok nabor kliničnih stanj, med drugim nalezljive bolezni, tumorigenezo, avtoimune bolezni, alergijska stanja in proces tolerance ali zavrnitve, ki spremljata transplantacijo organov [218], in pri tem sodelujeta tako prirojeni kot pridobljeni imunski odziv. Prirojen imunski odziv predstavlja nespecifičen odziv in ga v osnovi sestavljajo sistem fagocitov, sistem komplementa, naravne celice ubijalke in dendritične celice [218]. Njegova aktivacija je s stališča nalezljivih vzrokov za motnje homeostaze značilna predvsem za začetni odgovor na vdor patogenov, medtem ko v primeru nenalezljivih vzrokov pride do aktivacije prirojenega imunskega odziva tudi v primeru popravljanja poškodb tkiva in pri odstranjevanju mrtvih, poškodovanih ter senescentnih celic [217]. Nasprotno pa pridobljeni imunski odziv predstavlja specifičen imunski odziv in kot takšen se razvije počasneje od prirojenega ter vključuje primarni odziv, ki se razvije ob prvotnem stiku s tujim antigenom, in sekundarni odziv, ki se sproži ob ponovnem stiku z enakim tujim antigenom in ker je ta odziv močnejši ter hitrejši od primarnega lahko odstrani vdirajoči patogen še preden se razvije bolezen [217, 218]. Glavne komponente pridobljenega imunskega sistema so protitelesa, limfociti B, citotoksični limfociti T oziroma CD8+ limfociti T in celice pomagalke oziroma CD4+ limfociti T [218].

V primeru rakavih obolenj pride do aktivacije tako prirojenega kot pridobljenega imunskega odziva, pri čemer lahko začetni odziv citotoksičnih imunskih celic privede do odstranitve rakavo spremenjenih celic [219, 220]. V primeru neuspešne odstranitve in nastanka klinično zaznavnih tumorjev, pa akutno vnetje preide v kronično in se sprožijo mehanizmi, ki posnemajo mehanizme imunske tolerance in omogočijo rakavim celicam, da se izognejo uničenju s strani imunskega sistema, kar je tudi ena od karakterističnih značilnosti rakavih celic [220, 221]. Na razvoj rakavih obolenj torej vpliva ravnotežje med učinkovitim imunskim odzivom za katerega so odgovorne predvsem citotoksične imunske celice, torej predvsem naravne celice ubijalke in CD8+ limfociti T [222], in imunsko toleranco, ki jo spremlja vdor imunosupresivnih imunskih celic, torej nezrelih dendritičnih celic, pro-tumorigenih makrofagov tipa M2, regulatornih limfocitov T in B ter pro-metastatskih nevtrofilcev, v mikrookolje tumorja [220]. Ko se rakave celice izognejo začetnemu tumoricidnemu odzivu, se to ravnotežje premakne v smer imunske tolerance, pri čemer imajo glavno efektorsko vlogo predvsem s tumorjem-povezani makrofagi in regulatorni limfociti T, ki izločajo imunosupresivne molekule kot na primer IL-10, TGFβ in prostaglandine ter inhibirajo izločanje pro-vnetnega IL-12 iz dendritičnih celic [223-226]. Poleg tega s tumorjem-povezani makrofagi regulirajo imunski odziv v tumorskem

mikrookolju tudi s povišanim izražanjem inhibitornih molekul kontrolnih točk, kot na primer PD-L1, CTLA-4 in VISTA, in izločanjem kemokinov, ki spodbujajo kemotakso imunosupresivnih imunskih celic v mikrookolje tumorja [227-229]. Te strategije pripomorejo k temu, da se rakave celice izognejo tumoricidnemu imunskemu odzivu in posledično pride do nastanka klinično-zaznavnega tumorja. Vendar pa pri imunskem odzivu v mikrookolju tumorja ne sodelujejo le imunske celice, saj so v tumorskem mikrookolju prisotne tudi komponente sistema komplementa, ki jih v tumorsko mikrookolje lahko izločajo same rakave celice in vdirajoče imunske celice ali pa v okolje vstopijo preko žilnega sistema tumorja [230].

1.3.2.1 Aktivacija sistema komplementa

Imunologija tumorja je tradicionalno obravnavala aktivacijo sistema komplementa le kot dodaten mehanizem, ki izboljša citolitični efekt imunoterapije raka, ki temelji na uporabi terapevtskih protiteles, vendar novejša odkritja kažejo, da je neuravnotežena aktivacija sistema komplementa v mikrookolju tumorja povezana z vnetjem in zaviranjem učinkovitega protitumorskega imunskega odziva [231].



Slika 7: Shematski prikaz vseh treh poti aktivacije sistema komplementa. Vse tri poti aktivacij komplementa konvergirajo na stopnjah nastanka obeh konvertaz in na končni litični stopnji, za katero je značilen nastanek kompleksa MAC, ki omogoči lizo označene celice.

Aktivacija sistema komplementa poteka po treh različnih poteh, ki konvergirajo na stopnji nastanka konvertaz C3 in C5 in imajo skupno končno točko kaskadne aktivacije, torej tvorbo kompleksa MAC [230], medtem ko se razlikujejo v začetni iniciacijski stopnji aktivacije (slika 7). Te tri poti aktivacije so klasična, ki jo sproži prisotnosti kompleksov med antigeni in protitelesi, lektinska, ki se aktivira ob prisotnosti PAMP-ov, ki jih prepoznajo lektini, in alternativna, ki je konstitutivno šibko aktivirana kot rezultat

spontane hidrolize komponente C3 [232, 233]. Klasična pot se sproži, ko se komponenta C1q v kompleksu s serinskima proteazama C1r in C1s veže na Fc regijo protiteles, ki so vezana na predstavljene antigene na površini tarčnih celic [233]. V naslednjem koraku poteče avtokatalitična aktivacija serinskih proteaz C1r in C1s v kompleksu C1qrs, ki nato cepita komponenti C4 in C2 ter generirata fragmenta C4b in C2a, ki se na površini tarčnih celic sestavita v konvertazo C3 [233]. Zelo podobno se aktivira lektinska pot, le da je le-ta neodvisna od prisotnosti protiteles in se aktivira ob vezavi receptorjev PRR na molekulske vzorce, ki so značilni za tujke. Primer receptorja PRR je MBL, ki prepozna molekule sladkorjev, ki so prisotne na površini mnogih patogenov [234]. Podobno kot v primeru iniciacijske komponenta C1q iz klasične poti, poteče tudi vezava MBL v kompleksu z eno izmed treh serinskih proteaz MASP, ki se ob vezavi aktivira in nato prav tako cepi komponenti C4 in C2 do fragmentov C4b in C2a, ki se sestavita v konvertazo C3 [235, 236]. Aktivacija alternativne poti pa se mehanistično razlikuje, saj je posledica šibke spontane hidrolize komponente C3 do C3(H_2O), ki je analog fragmenta C3b [233]. Komponenta C3 je izdatno prisotna v krvni plazmi in njena šibka spontana hidroliza je ključna predvsem v primeru vdora patogenih organizmov, saj omogoča takojšnjo aktivacijo na površini teh organizmov, saj na njihovi membrani, za razliko od celic gostitelja, niso prisotni regulatorji komplementa [232]. Ob hidrolizi komponente C3 pride do struturnih sprememb tioestrske domene, kar privede do izpostavitve vezavnega mesta za faktor B in le-ta nato tvori kompleks s C3(H_2O) [232]. Po tvorbi kompleksa vezan faktor B cepi serinska proteaza faktor D do fragmenta Bb, ki je v kompleksu s C3(H_2O) zmožen cepitve komponentne C3 in deluje kot počasnejša konvertaza C3 [237]. Posledično pride v naslednjem koraku do amplifikacije same aktivacije, saj ob cepitvi komponente C3 nastane fragment C3b, ki prav tako vsebuje vezavno mesto za faktor B in po njegovi vezavi ter aktivaciji preko faktorja D se sestavi kompleks C3bBb, ki predstavlja glavno konvertazo C3 alternativne poti [238]. Na stopnji konvertaze C3 torej konvergirajo vse tri poti aktivacije in v naslednjem koraku v vseh primerih konvertaza C3 deluje kot serinska proteaza, ki s cepitvijo komponente C3 generira fragment C3b, ki se veže v kompleks obeh oblik konvertaze C3 ter tvori konvertazo C5, naslednjo serinsko proteazo, ki je del kaskadne aktivacije sistema komplementa in jo v primeru klasične in lektinske poti predstavlja kompleks C4bC2aC3b, medtem ko konvertazo C5 alternativne poti predstavlja kompleks C3bBbC3b [233]. Konvertaza C5, ki se sestavi na membrani tarčnih celic, cepi komponento C5 in generira fragment C5b, kar sproži spremembo konformacije, ki povzroči izpostavitev tioestrske domene in omogoči njegovo interakcijo s komponento C6 [239]. Vezava komponente C6 konformacijsko spremeni C5b, kar oslabi vez med konvertazo C5 in kompleksom C5bC6 ter tako omogoči dostop in vezavo komponente C7 in nastanek kompleksa C5b-C7 [240]. Vezava komponente C7 povzroči dokončno disociacijo kompleksa C5b-C7 s konvertaze C5. Hkrati se ob vezavi komponente C7 izpostavi tudi hidrofobna regija te komponente preko katere se kompleks C5b-C7 nato usidra v lipidni dvosloj tarčne celične membrane [240]. V naslednjem koraku se v kompleks C5b-C7 veže komponenta C8, ki prav tako vsebuje hidrofobno regijo in ob vezavi omogoči, da nastali kompleks C5b-C8 prodre še globlje v lipidni dvosloj in tvori nestabilne pore [233]. Za tvorbo stabilnih por v membrani pa mora poteči še zadnji korak, in sicer vezava komponente C9 na komponento C8 znotraj kompleksa C5b-C8 ob čemer se komponenta C9 konformacijsko spremeni tako, da se izpostavi njena hidrofobna domena, kar omogoči njeno sidranje v lipidni dvosloj in nadaljnjo polimerizacijo z največ šestnajstimi molekulami komponente C9 [241]. Tako nastane kompleks C5b-C9, ki predstavlja končni kompleks aktivacije komplementa imenovan kompleks MAC. Ta kompleks v membrani celic ustvari stabilne pore, ki omogočijo tarčno lizo celic, ki jo spremlja deregulacija koncentracijskega gradienta kalcijevih ionov [232]. Poleg opisanih stopenj aktivacije sistema komplementa pa ob generiranju fragmentov C4b, C3b in C5b nastanejo tudi manjši fragmenti C4a, C3a in C5a,

ki predstavljajo pro-vnetne molekule s skupnim imenom anafilatoksini in delujejo kot kemokini za preostale imunske celice, s čimer spodbujajo razvoj vnetja na mestu aktivacije sistema komplementa [232, 233]. Aktivacijo sistema komplementa pa spremlja tudi proces opsonizacije, torej kovalentne vezave opsoninov na membrano tarčnih celic [232]. Kot opsonini delujejo predvsem fragmenta C4b in C3b ter produkti proteolitične razgradnje C3b, ki jih generira faktor I, torej fragmenti iC3b, C3c in C3dg. Njihovo prisotnost na membrani tarčnih celic preko komplementnih receptorjev zaznajo fagociti, ki lahko nato fagocitozo poskrbijo za odstranitev opsoniziranih celic [233].

V kontekstu rakavih obolenj raziskave kažejo, da aktivacija sistema komplementa v mikrookolju tumorja predvsem spodbuja tumorigenezo in napredovanje raka [242]. Tako imunske kot rakave celice znotraj malignih tumorjev namreč povišano izražajo in izločajo številne komponente sistema komplementa [242, 243], dodatno pa je v rakavem tkivu zaznavna tudi povišana depozicija več fragmentov, ki nastanejo med aktivacijo sistema komplementa [244-246]. Aktivacija sistema komplementa in prisotnost višjih koncentracij posameznih komponent sistema, nato vpliva na razne procese, ki spremljajo napredovanje raka, pri čemer imata ključno vlogo predvsem fragmenta C3a in C5a [242]. Vezava obeh fragmentov na njuna receptorja C3aR in C5aR namreč sproži signalizacijske poti, ki nadalje vplivajo na proliferacijo, epitelijsko-mezenhimsko tranzicijo in metastaziranje rakavih celic [242]. Dodatno pa rakave celice poleg povišanega izražanja in izločanja samih komponent sistema komplementa, povišano izražajo tudi membransko-vezane regulatorne proteine aktivacije sistema komplementa, med drugim antigene CD46, CD55 in CD59 [247]. Povišana prisotnost regulatornih proteinov na membrani rakavih celic naj bi le-te ščitila predvsem pred od komplementa odvisno citotoksičnostjo in regulirala imunski odziv limfocitov T v mikrookolju tumorja [242]. Poleg pro-tumorigenih vlog pa aktivacija sistema komplementa sodeluje tudi pri uničenju tumorjev predvsem v kontekstu imunoterapije z monoklonskimi terpevtskimi protitelesi, kot je na primer rituximab, ki se uporablja za zdravljenje B-celičnih limfomov [231].

Poglavje 2

Namen dela

Proteolitične cepitve spremljajo razvoj mnogih predvsem z vnetjem povezanih patoloških stanj pri človeku, pri čemer so še posebej škodljive cepitve s strani proteaz, ki se jim v patološko spremenjenemu tkivu spremeni nivo izražanja, njihova lokalizacija ali oboje. Skupina takšnih proteaz so tudi cisteinski katepsini, za katere so že pokazali, da predvsem njihova zunajcelična lokalizacija korelira s slabšo prognozo rakavih obolenj, vendar vsi mehanizmi delovanja še niso povsem raziskani. Poleg cisteinskih katepsinov pa so od cisteinskih proteaz z razvojem in napredovanjem rakavih obolenj povezane tudi kaspaze, saj gre za glavne efektorske encime pri procesih apoptoze in vnetja, ki sta disregulirana v primeru rakavih obolenj. Pri tem je večina raziskav usmerjenih v znotrajcelično aktivnost kaspaz, precej manj raziskav pa se osredotoča na potencialno spremenjeno njihovo lokalizacijo v patološko spremenjenemu tkivu. Posledično smo se v okviru doktorskega dela osredotočili na zunajcelične vloge apoptotskih kaspaz in cisteinskih katepsinov. Namen dela je bil:

1. ugotoviti, ali lahko apoptotski kaspazi-3 in -7 v zunajceličnem prostoru cepita zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov in ali lahko po sprožitvi apoptoze zaznamo prisotnost apoptotskih kaspaz ter njihovo aktivnost v zunajceličnem prostoru;
3. preučiti ali proteolitične cepitve zunajceličnih domen membransko-usidranih proteinov s cisteinskima katepsinoma L in S vplivajo na aktivacijo sistema komplementa kot dela prirojenega imunskega odziva;
4. raziskati, kako proteolitična aktivnost katepsina K v zunajceličnem prostoru vpliva na adhezijo rakavih celic in ali lahko povzroča aktivacijo nadaljnjih zunajceličnih proteolitičnih procesov.

Delovne hipoteze, ki smo si jih zastavili, so bile:

- med potekom apoptoze pride do sprostitve aktivnih kaspaz-3 in -7 v zunajcelični prostor, kjer lahko nato cepita zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov tako v nevtralnem pH-okolju kot v rahlo kislem pH-okolju, ki je pogosto prisotno v tumorskem mikrookolju;
- katepsina L in S cepita zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov, kar spremeni površino rakavih celic tako, da privede do zmanjšane depozicijo komponent sistema komplementa in posledično manjše aktivacije sistema;
- zunajcelična aktivnost katepsina K povzroča zmanjšano adhezijo rakavih celic preko cepitev zunajceličnih domen membransko-usidranih proteinov in aktivacije membranskih metaloproteaz.

Poglavje 3

Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije in reagenti

3.1.1.1 Osnovne kemikalije

- 40 % akrilamid/bisakrilamid (Serva, #10688.03)
- ABC (amonijev bikarbonat NH_4HCO_3; Sigma Aldrich, #09830)
- aceton (VWR, #20066.296)
- ACN (acetonitril; J.T.Baker, #9821)
- BSA (goveji serumski albumin; Glentham LIFE SCIENCES, #GE1877)
- $CaCl_2$ (kalcijev klorid dihidrat; Sigma Aldrich, #C-3881)
- CHAPS (3-[(3-holamidopropil)dimetilamoniio]-2-hidroksi-1-propanesulfonat; Roche, #10810118001)
- D(+)-saharoza (Fluka, #84100)
- dietil eter (Merck, #1.00921.1000)
- DTT (ditiotreitol; Sigma Aldrich, #D9779)
- EDTA (etilendiamintetraocetna kislina; Carl Roth, #8040.2)
- etanol (Merck, #1.00983.1000)
- glicerol (Carlo Erba, #453752)
- glicin (Carl Roth, #3790.4)
- HCl (klorovodikova kislina; Merck, #1.00317.1000)
- HEPES (4-(2-hidroksietil)piperazin-1-iletan-1-sulfonska kislina; Fisher Scientific, #BP310-1)
- IAA (2-jodoacetamid; Amersham Biosciences, #RPN6302)
- komercialni gel za poliakrilamidno gelsko elektroforezo z 12-odstotno zamreženostjo poliakrilamida (Lonza, #58509)
- MES (2-(N-Morfolino)-etan sulfonska kislina; Serva, #29834)
- metanol (Carlo Erba, #414814)
- $MgCl_2 \times 6H_2O$ (magnezijev klorid heksahidrat; Serva, #39771.01)
- $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ (natrijev hidrogenfosfat dihidrat; Merck, #71643)
- NaCl (natrijev klorid; Fisher Scientific, #S/3160/60)
- NaDS, 10 (w/v) % raztopina (natrijev dodecilsufat; Bio Rad, #161-0416)
- NaH_2PO_4 (natrijev dihidrogenfosfat; Merck, #71496)
- NP-40 (Nonidet® P-40; Roche, #11754599001)
- ocetna kislina (J.T.Baker, #6052)
- označevalec velikosti proteinov PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, #26619)

- prenašalni pufer za polsuhi prenos western TBT-T (5x) (Bio-Rad, #10026938)
- propan-2-ol (Carlo Erba, #415154)
- pufer GVB++ (Complement Technology, #B102)
- raztopina 0,1 (v/v) % mravljične kisline v ACN (J.T.Baker, #9824)
- reagent Bradford (Bio-Rad, #5000006)
- reagent ECL za kemiluminiscenco (Cytiva, #RPN2106)
- TCA (trikloroocetna kislina; Sigma Aldrich, #91230)
- Tris (Tris(hidroksimetil)aminometan; Sigma Aldrich, #T6066)
- Triton-X-100 (oktilfenoletoksilat; Acros Organics, #327371000)
- Tween-20 (polisorbat 20; Sigma Aldrich, #93773)
- veronalni pufer (5x) (Lonza, #12-624E)
- vezavni pufer za Annexin V (Thermo Scientific, #BMS500BB)
- voda za LC-MS/MS (Honeywell, #39253)
- vodna raztopina 0,1 (v/v) % mravljične kisline (J.T.Baker, #9826)
- $ZnCl_2$ (cinkov klorid; Fluka, #96469)
- želatina iz svinjske kože (Sigma Aldrich, #G1890)

3.1.1.2 Kemikalije za delo s celičnimi linijami

- 0,4 % (v/v) barvilo tripansko modrilo za določanje živosti celic (ang. Trypan Blue; Sigma Aldrich, #T8154 ali Invitrogen, #T10282)
- brezbarvno celično gojišče DMEM (Corning, #17-205-CVR)
- celično gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom (Sigma Aldrich, #D6429)
- celično gojišče Opti-MEM z zmanjšano vsebnostjo seruma (Gibco, #31985-062)
- celično gojišče RPMI-1640 (Sigma Aldrich, #R5158)
- dopolnilo za celična gojišča Nutridoma-SP, ki lahko nadomesti serum (Roche, #11011375001)
- DPBS brez magnetijevega in kalcijevega klorida (Corning,
- DPBS z magnezijevim in kalcijevim kloridom (Sigma Aldrich, #D8662)
- E-64d (L-trans-epoksisukcinil-leucilamido-3-metil-butan etil ester; Peptide Institute, 4321-v)
- encimska raztopina za odlepljanje celic z dodano EDTA (ang. TrypLE Select™; Gibco, #12563-029)
- FBS (fetusni serum goveda; Sigma Aldrich, #F7524)
- FBS HI (toplotno obdelan fetusni serum goveda; Sigma Aldrich, #F9665)
- mešanica penicilina in streptomicina (Sigma Aldrich, #P4333)
- PMA (forbol 12-miristat-13-acetat; Sigma Aldrich, #P1585)
- raztopina L-glutamina (Sigma Aldrich, #G7513)
- raztopina za neencimsko odlepljanje celic, ki temelji na raztopini soli bogatih z biokarbonatnimi ioni, ki jo je razvil John H. Hanks (ang. Enzyme Free Cell Dissociation Solution Hank's Based; EMD Milipore, #S-004-B)
- stavrosporin (MedChemExpress, #HY-15141)

3.1.1.3 Fluorescenčna barvila in fluorogeni substrati

- Ac-DEVD-AFC (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AFC; Bachem, #4027914)
- PI (propidijev jodid; Sigma Aldrich, #P4170)
- zFR-AMC (z-Phe-Arg-AMC; Bachem, #4003379)
- zFVR-AMC (z-Phe-Val-Arg-AMC; Bachem, #4003131)
- zRR-AMC (z-Arg-Arg-AMC; Bachem, #4004789)

3.1.1.4 Inhibitorji proteaz

- batimastat (MedChemExpress, #HY-13564)
- E-64 (L-trans-epoksisukcinil-leucilamid(4-gvanidin)butan; Peptide Institute, #4096)
- E-64d (L-trans-epoksisukcinil-leucilamido-3-metil-butan etil ester; Peptide Institute, #4321-v)
- ilomastat/GM6001 (MedChemExpress, #HY-15768)
- MMTS (metil metantiosulfonat; Sigma-Aldrich, #208795)
- PIC (koktajl inhibitorjev proteaz; Sigma Aldrich, #P8340)
- PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid; Sigma Aldrich, #78830)
- zVAD-FMK (z-Val-Ala-Asp-FMK; Bachem, #4026865)

3.1.2 Celične linije

- HT-144 (človeška fibroblastna rakava celična linija malignega melanoma; ATCC, #HTB-63)
- Jurkat E6-1 (človeška limfoblastna rakava celična linija aktunega T-celičnega limfoma, ki izraža površinski antigen CD3); ECACC, #88042803)
- MDA-MB-231 (človeška epitelna rakava celična linija raka dojk; ATCC, #HTB-26)
- U937 (človeška monocitna rakava celična linija histiocitnega limfoma; neznan vir)

3.1.3 Protitelesa

3.1.3.1 Primarna protitelesa

- kozje poliklonsko prottelo proti katepsinu L (R&D Systems, #AF1515)
- kunčje monoklonsko protitelo proti človeškemu CSPG4 (Cell Signaling, #43916)
- kunčje poliklonsko protitelo proti cepljeni obliki človeške kaspaze-3 (Cell Signaling, #9661)
- kunčje poliklonsko protitelo proti cepljeni obliki človeške kaspaze-7 (Cell Signaling, #9491)
- kunčje poliklonsko protitelo proti človeški komponenti C1q označeno s fluorescenčnim barvilom FITC (Dako, #F0254)
- kunčje poliklonsko protitelo proti človeški komponenti C3c označeno s fluorescenčnim barvilom FITC (Dako, #F0201)
- kunčje poliklonsko protitelo proti človeški MMP14 (LifeSpan BioSciences, #LS-C100444)
- kunčje poliklonsko protitelo proti katepsinu S (Cell Signaling, #25084)
- kunčje poliklonsko protitelo proti β-aktinu (Sigma Aldrich, #A2066)
- mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu antigenu CD44 (Cell Signaling, #3570)
- mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu katepsinu B, klon 3E1 (IJS, odsek B1)
- ovčje poliklonsko protitelo proti človeškemu NRP-1 (R&D Systems, #AF3870)

3.1.3.2 Sekundarna protitelesa

- kozja antikunčja IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Jackson ImmunoResearch, #111-035-045)

- kozja antimišja IgG, IgM, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Jackson ImmunoResearch, #115-035-068)
- kunčja antiovčja IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Jackson ImmunoResearch, #313-035-045)
- oslovska antiovčja IgG, konjugirana s fluorescenčnim barvilom AlexaFluor488 (Invitrogen, #A-11015)

3.1.4 Rekombinantni proteini in biološki material

- Annexin V-PE (Affymetrix, #BM306PE)
- komponenta C1q človeškega komplementa izolirana iz normalnega človeškega seruma (Sigma Aldrich, #C1740)
- normalni človeški serum (NHS) (Complement Technology, #NHS)
- normalni človeški serum (NHS) (IJS, odsek B1)
- normalni človeški serum brez komponente C1q (C1q-Dpl) (Complement Technology, #A300)
- rekombinantna apoptotska kaspaza-3 (IJS, odsek B1)
- rekombinantna apoptotska kaspaza-7 (IJS, odsek B1)
- rekombinantna vnetna kaspaza-1 (IJS, odsek B1)
- rekombinantni cisteinski katepsin B (IJS, odsek B1)
- rekombinantni cisteinski katepsin K (IJS, odsek B1)
- rekombinantni cisteinski katepsin L (IJS, odsek B1)
- rekombinantni cisteinski katepsin S (IJS, odsek B1)
- tripsin prilagojen za sekveniranje (ang. Sequencing Grade Modified Trypsin; Promega, #V5111)

3.1.5 Pufri

Barvalna raztopina za poliakrilamidne gele:
0,5 % (w/v) barvila Commassie Brilliant Blue
30 % (v/v) etanol
10 % (v/v) ocetna kislina

Blokirna raztopina posnetega mleka v prahu:
5 % (w/v) mleko v prahu
pufer TBS-T

Elektroforezni pufer za NaDS PAGE:
25 mM Tris
192 mM glicin
0,1 % (v/v) NaDS

Koncentracijski pufer za pripravo poliakrilamidnih gelov (4x):
0,5 M Tris
pH 6,8 (umerimo s HCl)

Ločevalni pufer za pripravo poliakrilamidnih gelov (8x):
3 M Tris
pH 8,8 (umerimo s HCl)

Nanašalni pufer za NaDS PAGE (6x):
187,5 mM Tris
60 % (v/v) glicerol
3 % (w/v) NaDS
1 % (w/v) barvilo bromfenol modro
300 M DTT

Nanašalni pufer za NaDS PAGE brez DTT (6x):
187,5 mM Tris
60 % (v/v) glicerol
3 % (w/v) NaDS
1 % (w/v) barvilo bromfenol modro

Prenašalni pufer za mokri prenos western:
25 mM Tris
192 mM glicin
10 % (v/v) metanol ali 20 % (v/v) metanol

Prenašalni pufer za polsuhi prenos western:
komercialni prenašalni pufer TBT-T (5x)
10 % (v/v) etanol

Pufer PBS++:
pufer DPBS brez magnezija in kalcija
1 % (w/v) BSA

Pufer TBS:
20 mM Tris
500 mM NaCl

Pufer TBS-Tween (TBS-T):
pufer TBS
0,05 % (w/v) Tween 20

Pufer za detekcijo šedazne aktivnosti apoptotskih kaspaz:
izbran osnovni pufer (DPBS, 1×pufer HEPES ali 1×pufer MES)
1 mM DTT
0,5 mM PMSF
1 mM EDTA
25 µM E-64

Pufer za detekcijo šedazne aktivnosti cisteinskih katepsinov:
pufer DPBS pH 7,4 ali 6,0
1 mM DTT
0,5 mM PMSF
1 mM EDTA

Pufer za lizo apoptotičnih celic s kislim pH:
25 mM MES
5 mM MgCl2
1 mM EDTA
0,1 % (v/v) Triton-X-100,
0,5 % (v/v) NP-40
0,1 % (v/v) CHAPS
1 % (v/v) PIC
pH 6,0

Razbarvalni pufer za poliakrilamidne gele:
30 % (v/v) etanol
10 % (v/v) ocetna kislina

Renaturacijski pufer:
50 mM Tris
2,5 % (v/v) Triton-X-100
5 mM $CaCl_2$
1 µM $ZnCl_2$
pH 7,4

Standardni pufer za lizo celic:
50 mM Tris
100 mM NaCl
1 mM EDTA
1 % (v/v) NP-40
0,1 % (v/v) SDS
0,1 % (v/v) deoksiholat
1 % (v/v) PIC
pH 7,4

Standardni pufer za lizo apoptotičnih celic:
25 mM HEPES
5 mM MgCl2
1 mM EDTA
0,1 % (v/v) Triton-X-100,
0,5 % (v/v) NP-40
0,1 % (v/v) CHAPS
1 % (v/v) PIC
pH 7,5

3.1.5.1 Pufri za masno spektrometrijo

Pufer za ekstrakcijo peptidov:
50 % (v/v) ACN
5 % (v/v) mravljična kislina

Pufer za tripsinizacijo:
1 µg tripsina prilagojenega za sekveniranje
2 µl pufra za raztapljanje in redčenje tripsina (ang. Trypsin Resuspension Dilution Buffer)
25 mM ABC

Razbarvalna raztopina:
50 (v/v) % ACN
25 mM ABC

Raztopina za alkilacijo:
55 mM IAA
25 mM ABC

Raztopina za elucijo:
60 % (v/v) ACN
0,1 % (v/v) mravljična kislina

Raztopina za redukcijo:
10 mM DTT
25 mM ABC

3.1.5.2 Pufri za encimsko kinetiko

Koncentriran pufer HEPES (10x):
500 mM HEPES
10 % (w/v) saharoza
pH 7,4

Koncentriran pufer MES (10x):
500 mM MES
10 % (w/v) saharoza
pH 6,0

Pufer za detekcijo aktivnosti apoptotskih kaspaz s kislim pH:
50 mM MES
1 % (w/v) saharoza
0.1 % (v/v) CHAPS,
10 mM DTT
10 µM E-64
pH 6,0

Standardni pufer za detekcijo aktivnosti apoptotskih kaspaz:
50 mM HEPES
1 % (w/v) saharoza
0.1 % (v/v) CHAPS
10 mM DTT
10 µM E-64
pH 7,4

Pufer za merjenje aktivnosti cisteinskih katepsinov:
12 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
88 mM NaH_2PO_4
1 mM EDTA
5 mM DTT
pH 6,0 (samo preverimo)

3.1.6 Laboratorijska oprema

- 1,5 ml in 2 ml mikrocentrifugirke (Sarstedt)
- 1,5 ml LoBind mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- 10 cm in 15 cm petrijevke (Greiner)
- 15 ml centrifugirke (Falcon; Greiner)
- 50 ml centrifugirke (Greiner)
- avtomatske pipete z volumni 0,1–2,5 µl, 0,5–10 µl, 2–20 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl in 500–5000 µl (Eppendorf)
- bralnik mikrotitrskih plošč TECAN Infinite M1000 Pro (Tecan)
- centrifuge 5415R, 5804R, 5417C in 5810R (Eppendorf)
- črne mikrotitrske plošče s 96 vdolbinicami (Greiner)
- digestorij (Wesemann)
- epruvete za pretočni citometer (Falcon)
- fazno kontrastni svetlobni mikroskop CK (Olympus)
- filtracijski sistem za vakuumsko filtriranje tekočin Filtermax z velikostjo por 0,22 µM (TPP)
- hladilniki in zamrzovalniki
- hlajena namizna centrifuga Centric 250 R (Domel)
- hlajena namizna centrifuga Micro Star 17R (VWR)
- injekcijske brizge (Sarstedt; BD)
- injekcijske igle (BD)
- inkubator s kontrolirano atmosfero – 37 °C in 5 % CO2 (Binder)
- kadička za NaDS PAGE Mini PROTEAN Tetra Cell 52BR (BioRad)
- kadička za prenos western TE22 (Hoefer)
- kadička za zamrzovanje Nalgene® Cryo 1°C (Thermo Scientific)
- centrifugalni filtri Amicon Ultra 15 ml, 4 ml ali 0,5 ml, ki prepuščajo molecule manjše od 3 kDa (EMD Milipore)
- ledomat AF 103 (Scotsman)
- magnetno mešalo D-6011 (NeoLAB)
- masni spektrometer Orbitrap LTQ Velos (Thermo Scientific)
- mikro elektroda za merjenje pH InLab Micro pH (Mettler Toledo)
- mikrobiološka komora M18 (Iskra PIO)
- motoriziran invertni mikroskop IX81 (Olympus)
- naprava za avtomatsko štetje celic Countess 3 FL (Invitrogen)
- naprava za NaDS PAGE in prenos western EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech)
- naprava za polsuhi prenos western Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad)
- naprava za slikanje gelov in membran G:Box Chemi XR (Syngene)
- naprava za tekočinsko kromatografijo Proxeon-nano-LC (Thermo Scientific)
- nastavki za avtomatske pipete z volumni 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl (Eppendorf)
- Neubauerjeva števna komora (Improved Neubauer, Blaubrand)
- nitrocelulozna membrana NC45 (Serva)
- pH meter MP220 (Mettler Toledo)
- pipetor (Brand; Integra)
- gojitveni posodi T-75 in T-25 (TPP)
- posode za tekoči dušik Arpege 40/70 (Air Liquide)
- pretočni citometer BD Accuri™ C6 Plus (BD)
- pretočni citometer FACSCalibur (BD)
- prozorne mikrotitrske plošče s 96 vdolbinicami (Greiner)

- prozorne mikrotitrske plošče za celične kulture s 6-imi ali 12-imi vdolbinicami (TPP)
- skrinja s temperaturo -80 °C (Sanyo; Snijders Labs)
- steklovina (čaše (Simax), erlenmajerice (Schott), merilni valji, pipete, Pasteurjeve pipete (Brand) ...)
- sterilni filtri za brizgo z velikostjo por 0,2 µM ali 0,45 µM (Sartorius; Corning)
- stresalnik Vibromix 314 EVT (Tehtnica)
- tehtnici PB5001-S in AB104-S (Mettler Toledo)
- termomešalnik Thermomixer compact (Eppendorf)
- vakumska črpalka ME2 (Vacuubrand)
- vibracijski mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica)
- vir napetosti western Lightning VoltTM Power Supply (Thermo Scientific)

3.1.7 Programska operma

- programska oprema cellSens (Olympus)
- programska oprema FlowJO (BD)
- programska oprema GraphPad Prism (GraphPad Software)
- programska oprema ImageJ [248]
- programska oprema MaxQuant z iskalnikom Andromeda (Max Planck Institute of Biochemistry) [249, 250]
- programska oprema PeptideVisualizer (IJS, odsek B1)
- programska oprema Xcalibur (Thermo Fisher Scientific)

3.2 Metode

3.2.1 Delo s celičnimi linijami

3.2.1.1 Sestava gojišč in gojenje celic

Za gojenje adherentnih rakavih celičnih linij MDA-MB-231 in HT-144 smo uporabili kompletno gojišče sestavljeno iz gojišča DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom, ki smo mu dodali 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) raztopino glutamina in 1 % mešanico penicilina in streptomicina. Suspenzijski rakavi celični liniji Jurkat E6-1 in U937 smo gojili v kompletnem gojišču sestavljenem iz gojišča RPMI-1640 z dodanimi 10 % (v/v) FBS HI, 1 % (v/v) raztopino glutamina in 1 % mešanico penicilina in streptomicina.

Vse celične linije smo gojili pri 37 °C v inkubatorju, ki lahko vzdržuje nadzorovano atmosfero s 5 % CO_2 in nasičeno z vodno paro. Suspenzijske celične linije smo gojili največ 45 dni, adherentne celične linije pa največ do 30. pasaže. Delo s celičnimi linijami smo opravljali aseptično, v mikrobiološki komori, in z upoštevanjem vseh načel dobre laboratorijske prakse. Za delo s celičnimi linijami smo uporabljali izključno za to namenjen, sterilen laboratorijski material.

3.2.1.2 Precepljanje celic

Adherentne celične linije smo precepili, ko so prerasle 80-90 % površine petrijevke. Najprej smo s celic odstranili izrabljeno gojišče in celice dvakrat sprali z ogretim pufrom DPBS z dodanim magnezijem in kalcijem. Na spran monosloj celic smo nato dodali encimsko raztopino za odlepljanje celic TrypLE Select in jih za približno 5 min inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO_2. Po inkubaciji smo delovanje encimske raztopine TrypLE

Select ustavili z dodatkom kompletnega gojišča. Tako pripravljeno suspenzijo odlepljenih celic smo razdelili na petrijevke za nadaljnje gojenje ali po potrebi prešteli z Neubauerjevo števno komoro ali z napravo za avtomatsko štetje celic Countess 3 FL in želeno število nacepili na plošče v skladu s potrebami nadaljnjih poskusov.

Suspenzijske celice smo ustrezno redčili približno vsak tretji dan oziroma, ko so dosegle celično gostoto 1×10^6 celic/ml. Z Neubauerjevo števno komoro ali z napravo za avtomatsko štetje celic Countess 3 FL smo najprej določili gostoto živih celic. Za ta namen smo del celične suspenzije zmešali z barvilom tripansko modrilo v razmerju 1:1 in pripravljeno mešanico uporabili za štetje celic. Po štetju smo mešanico zavrgli. Preostanek celične suspenzije smo prenesli v centrifugirko in ga 5 min centrifugirali pri sobni temperaturi pri 200×g. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, ki je vseboval izrabljeno gojišče in mrtve celice, in resuspendirali pelet celic v ogretem svežem kompletnem gojišču v skladu z nadaljnjimi potrebami. Resuspendirane celice smo prenesli v gojitveno posodo za nadaljnje gojenje ali nacepili v gojitvene posode ali na plošče za izvedbo nadaljnjih poskusov.

3.2.1.3 Odmrzovanje in zamrzovanje celic

V primeru adherentnih celic smo le-te odmrznili tako, da smo krioviale s celicami prenesli iz posode s tekočim dušikom ali iz zamrzovalnika s temperaturo –80 °C na led in jim nato v mikrobiološki komori dodali segreto kompletno gojišče. Odmrznjene celice smo nato prenesli na petrijevko s segretim kompletnim gojiščem in jih preko noči gojili v inkubatorju. Naslednji dan smo s celic odstranili gojišče, ki je še zmeraj vsebovalo nizko koncentracijo DMSO, in ga nadomestili s svežim kompletnim gojiščem.

Krioviale s suspenzijskimi celicami smo odmrznili v topli vodni kopeli segreti na 37 °C in nato smo vsebino viale prenesli v centrifugirko z 10 ml ogretega kompletnega gojišča. Centrifugirko smo 5 min centrifugirali pri sobni temperaturi pri 200×g. Po centrifugiranju smo gojišče odstranili z vakuumsko črpalko, celični pelet pa resuspendirali v svežem kompletnem gojišču. Pripravljeno celično suspenzijo smo prenesli v ustrezno gojitveno posodo.

Za zamrzovanje celic smo v primeru adherentnih celic uporabili povsem konfluentne 15 cm petrijevke, v primeru suspenzijskih celic pa gojitvene posode T-75 s suspenzijo celic s celično gostoto 1×10^6 celic/ml. Adherentne celice smo najprej sprali s pufrom DPBS z magnezijem in kalcijem, jih encimsko odlepili od podlage ter pripravljeno suspenzijo odlepljenih celic prenesli v centrifugirko ter centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi pri 400×g. V primeru suspenzijskih celic smo suspenzijo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi pri 200×g. Pred centrifugiranjem smo določili tudi število živih celic. Po centrifugiranju smo z vakuumsko črpalko odstranili gojišče in celični pelet resuspendirali v ustreznem gojišču za zamrzovanje celic do končne celične gostote $2\text{-}5\times10^6$ celic/ml. Za zamrzovanje smo uporabili kompletno gojišče, ki smo ga uporabljali za gojenje celic, z dodanim 5 % (v/v) DMSO. Pripravljeno suspenzijo celic v gojišču za zamrzovanje smo prenesli v krioviale in le-te shranili v kadičko za zamrzovanje z izopropanolom, ki omogoča počasno ohlajanje s hitrostjo 1 °C/min, ter kadičko shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –80 °C. Krioviale z zamrznjenimi celicami smo za krajši čas shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –80 °C, za daljše shranjevanje pa smo krioviale prenesli v posodo s tekočim dušikom.

3.2.2 Tretiranje celičnih linij

3.2.2.1 Sprožitev apoptoze

Za spremljanje poteka apoptoze smo uporabili suspenzijsko rakavo celično linijo Jurkat E6-1 ali adherentno celično linijo MDA-MB-231.

V primeru celic Jurkat E6-1 smo celice prenesli iz gojitvene posode v centrifugirko in določili celično gostoto živih celic. Nato smo celično suspenzijo centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi pri 200×g, odstranili supernatant in pelet celic resuspendirali v čistem ogretem mediju RPMI-1640 brez dodanega seruma, glutamina in mešanice penicilina in streptomicina. Celice smo nato nacepili na plošče ali v gojitvene posode tako, da je bila njihova celična gostota živih celic 1×10^6 celic/ml ter sprožili apoptozo v izbranih časovnih intervalih z dodatkom STS.

Celice MDA-MB-231 smo gojili dokler niso prerasle približno 80-90 % površine sterline petrijevke, nakar smo jih tripsinizirali in določili število živih celic po postopku iz poglavja 3.2.1.2. Na ploščo z 12-imi jamicami smo prenesli takšno količino celične suspenzije, da je je vsaka jamica vsebovala $0{,}35\times10^5$ celic ter jih do konfluentnosti gojili v mkompletnem gojišču DMEM. Ko so celice prerasle površino jamic, smo odstranili gojišče in monosloj celic dvakrat sprali z ogretim pufrom DPBS z dodanim magnezijem in kalcijem. Celicam smo dodali 1 mL čistega brezbarvneg gojišča DMEM brez dodanega seruma, glutamina in mešanice penicilina in streptomicina ter sprožili apoptozo v izbranih časovnih intervalih z dodatkom STS.

Apoptozo smo v izbranih časovnih intervalih sprožili tako, da smo celicam dodali STS do končne koncentracije 0,5 µM. Za določene poskuse smo celicam pred dodatkom STS dodali tudi pankaspazni inhibitor zVAD-FMK do končne koncentracije 25 µM. V vseh primerih smo STS dodali direktno v gojišče brez predhodne menjave s svežim gojiščem.

3.2.2.2 Priprava celičnega gojišča in totalnih lizatov apoptotičnih celic

Celice obeh celičnih linij, v katerih smo ob različnih časovnih točkah sprožili apoptozo z dodatkom STS, smo po 12 h ali po 24 h prenesli v mikrocentrifugirke in s 5 min centrifugiranjem pri sobni temperaturi pri 300×g ločili celice od celičnega gojišča. Med centrifugiranjem smo na plošče, ki smo jih uporabili za gojenje celic, nanesli standardni pufer za lizo apoptotičnih celic ali pufer za lizo apoptotičnih celic z nizkim pH. Po centrifugiranju smo supernatant prenesli v nove mikrocentrifugirke, celični pelet pa resuspendirali v lizirnem pufru, ki smo ga prenesli iz ustreznih jamic na gojitveni plošči. V primeru adherentnih celic MDA-MB-231 smo celice v jamicah pred prenosom dodatno mehansko odlepili od podlage v prisotnosti lizirnega pufra. Supernatant smo nato ponovno centrifugirali za 15 min pri 4 °C in 13.000×g in po končanem centrifugiranju smo ponovno prenesli supernatant, ki je predstavljal celično gojišče apoptotičnih celic, v nove mikrocentrifugirke. Celični pelet resuspendiran v lizirnem pufru smo kratko vorteksirali in nato za 45 min stresali na ledu, s čimer smo dosegli lizo celic. Suspenzijo liziranih celic smo centrifugirali za 15 min pri 4 °C in 13.000×g in po centrifugiranju smo supernatant, ki je predstavljal totalni lizat apoptotičnih celic, prenesli v nove mikrocentrifugirke. Pripravljene totalne lizate in celična gojišča apoptotičnih celic smo takoj uporabili za nadaljnje poskuse ali shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –80 °C.

3.2.2.3 Priprava koncentriranega celičnega gojišča apoptotičnih celic

Koncentrirano celično gojišče apoptotičnih celic smo pripravili tako, da smo celice nacepili v dve gojitveni posodi T-75 vsakič v 50 ml čistega medija RPMI-1640 brez dodanega seruma s celično gostoto živih celic 1×10^6 celic/ml. Celice smo tako gojili 24 h in polovici celic smo

20 h pred koncem gojenja dodali STS do končne 25 µM koncentracije, medtem ko je druga polovica celic predstavljala netretirano kontrolo. Po 24 h smo celično suspenzijo prenesli v centrifugirke ter centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi pri 300×g. Dobljen supernatant smo filtrirali skozi filter za brizgo z velikostjo por 0,2 µM, pelet celic pa smo zavrgli. Filtriran supernatant smo nato koncentrirali do 10-kratne koncentracije z uporabo centrifugalnega filtra Amicon Ultra 15 ml, ki prepušča molekule manjše od 3 kDa. Filtriran supernatant smo prenesli v centrifugalni filter Amicon Ultra 15 ml in ga centrifugirali približno 2 h pri 4 °C in 2.500×g. Dobljen koncentrat smo prenesli v mikrocentrifugirke in takoj uporabili za nadaljnje poskuse ali pa shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –80 °C, medtem ko smo filtrat zavrgli.

3.2.2.4 Tretiranje z rekombinantnimi encimi

Rekombinantne človeške katepsine in kaspaze, ki smo jih uporabili za tretiranje celic, smo pridobili iz katepsinske in kaspazne banke odseka B1 na IJS, saj jih na odseku rutinsko pripravljamo po ustaljenih protokolih [251-254].

Z rekombinantnimi encimi smo tretirali celice celičnih linij HT-144 in MDA-MB-231. Celice smo najprej gojili dokler niso dosegle 80-90 %, nakar smo jih dvakrat sprali s pufrom DPBS z magnezijem in kalcijem ter neencimsko odlepili z uporabo neencimske raztopine soli za odlepljanje celic na osnovi HBSS. Po približno 5-10 min inkubacije pri sobni temperaturi z nežnim stresanjem, smo celice odlepili s ponavljajočim pipetiranjem. Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirke in jih centrifugirali pri sobni temperaturi za 5 min pri 400×g. Po centrifugiranju smo supernatante zavrgli pelete pa sprali s pufrom DPBS z magnezijem in kalcijem ter jih ponovno centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi pri 400×g. V naslednjem koraku smo celične pelete resuspendirali v izbranem pufru z vnaprej določenimi pogoji tako, da je bila njihova celična gostota med 0,3-1×10^6 celic/ml.

Za tretiranje smo, odvisno od ciljev poskusa in uporabljenih encimov, uporabili različne pufre, in sicer pufer HEPES, pufer MES ter pufra DPBS z nizkim (pH 6,0) in fiziološkim pH (pH 7,4). Pufer DPBS z magnezijem in kalcijem z nižjim pH smo pripravili tako, da smo komercialnemu pufru DPBS z magnezijem in kalcijem znižali pH do 6,0 z dodatkom koncentrirane HCl. Nato smo pufer DPBS z magnezijem in kalcijem pred uporabo na celicah sterilno filtrirali s filtracijskim sistemom za vakuumsko filtriranje tekočin z velikostjo por 0,22 µM. Pufrom smo dodali tudi reducent DTT do končne koncentracije 1 mM, v primeru kaspaz, ali 0,5 mM, v primeru katepsinov, ter ustrezne inhibitorje, in sicer inhibitor serinskih proteaz PMSF do končne koncentracije 0,5 mM, inhibitor metaloproteaz EDTA do končne koncentracije 1 mM, inhibitor cisteinskih katepsinov E-64 do končne 25 µM ali 50 µM ter pankaspazni inhibitor zVAD-FMK do končne koncentracije 50 µM. Inhibitorja, ki inhibirata tudi izbrane proteaze, torej E-64 in zVAD-FMK, smo dodali le v vzorce, kjer je to posebej označeno. Kjer je posebej označeno, da smo uporabili tudi znotrajcelični inhibitor E64d, smo najprej celice preko noči tretirali z 10 µM koncentracijo inhibitorja, ki smo jo dodali direktno v celično gojišče, in nato enako koncentracijo inhibitorja uporabili tudi v izbranem pufru, ki smo ga uporabili za tretiranje celic.

Poleg različnih pufrov smo pri tretiranju uporabili tudi različne eksperimentalne pogoje, in sicer kontrolo, ki je vsebovala le izbran pufer z vsemi dodatki, vzorec z nižjo koncentracijo encima, ki je vseboval izbran pufer z vsemi dodatki in izbran encim s končno koncentracijo 0,2 µM, vzorec z višjo koncentracijo encima, ki je poleg izbranega pufra z vsemi dodatki vseboval še 1 µM končno koncentracijo izbranega encima, ter vzorec z inhibiranim izbranim encimom, ki je vseboval izbran pufer z vsemi dodatki, 1 µM končno koncentracijo izbranega encima in inhibitor le-tega encima, in sicer s končno koncentracijo 50 µM v primeru tako E-64 kot zVAD-FMK. Vzorec z inhibiranim izbranim encimom smo zmeraj pripravili približno 1 h preden smo ga uporabili za resuspendiranje celičnega peleta,

saj smo tako omogočili popolno inhibicijo izbranega encima. Različne eksperimentalne pogoje smo uporabili le v primeru tretiranja celic z rekombinantnim človeškim katepsinom K, saj smo le-tega uporabili le v eni koncentraciji, in sicer 0,5 µM. Prav tako smo zaradi vpliva na aktivnost MMP-jev v primeru tretiranja s katepsinom K osnovni pufer pripravili brez EDTA.

Resuspendirane celične pelete smo nato inkubirali 30 ali 45 min, v primeru tretiranja zgolj s cisteinskimi katepsini, in 60 min, v primeru tretiranja zgolj z apoptotskimi kaspazami oziroma v primeru sočasnega tretiranja s cisteinskimi katepsini in apoptotskimi kaspazami, na 37 °C. Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali pri sobni temperaturi 5 min pri 500×g in supernatante prenesli v nove mikrocentrifugirke, celične pelete pa zavrgli. Supernatantom smo dodali ustrezni inhibitor do končne koncentracije 20 µM, v primeru tako E-64 kot zVAD-FMK, in s tem ustavili vso preostalo encimsko aktivnost izbranih encimov. Po dodatku inhibitorja smo supernatante centrifugirali za 15 min pri 4 °C in 13.000×g in po centrifugiranju smo supernatante, ki so predstavljali šedome celic, prenesli v nove mikrocentrifugirke ter takoj uporabili za nadaljnje poskuse ali shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –20 °C za krajše časovno obdobje. V primeru daljšega shranjevanja smo vzorce shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –80 °C.

3.2.2.5 Diferenciacija monocitnih celic

Celice monocitne rakave celične linije U937 smo prenesli iz gojitvene posode v centrifugirko, določili celično gostoto živih celic in jih centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi pri 200×g. Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli, pelet celic pa resuspendirali v kompletnem celičnem gojišču RPMI-1640 z dodanim PMA do končne koncentracije 30 nM tako, da je bila končna celična gostota živih celic 1×10^6 celic/ml. Nato smo 1 ml pripravljene suspenzije prenesli v vdolbine na prozorni mikrotiterski plošči za gojenje celic z 12-imi vdolbinami in celice 48 h gojili pod opisanimi pogoji. Po 48 h smo s celic, ki so med diferenciacijo postale adherentne, z vakuumsko črpalko odstranili celično gojišče s PMA, jih trikrat sprali s pufrom DPBS z magnezijem in kalcijem ter jim dodali kompletno celično gojišče RPMI-1640 brez PMA. Celice smo nato še 7 dni gojili pod temi pogoji. Po 7-ih dneh smo diferencirane celice uporabili za nadaljnje poskuse.

3.2.2.6 Priprava sekretomov celic

Za pripravo sekretomov celic smo uporabili s PMA-diferencirane monocitne celice U937 in rakavo celično linijo MDA-MB-231.. ter jim dodali ustrezno gojišče ali pufer. Celice MDA-MB-231 smo nacepili na ploščo za gojenje celic z 12-vdolbinami, tako da smo v vsako vdolbino nacepili $0{,}8\times10^6$ celic, in jih preko noči oziroma dokler niso prerasle rastne površine gojili v kompletnem gojišču DMEM ter nato dvakrat sprali s pufrom DPBS z magnezijem in kalcijem. V primeru celic U937 smo le-te diferencirali po opisanem postopku in jih po končani diferenciaciji prav tako dvakrat sprali.

Za pripravo sekretomov celic U937 smo celicam dodali pufer DPBS z magnezijem in kalcijem z nizkim (pH 6,0) in fiziološkim pH (pH 7,4) ali čisto gojišče RPMI-1640 z dodanim nadomestkom seruma Nutridoma-SP do končne 1 % (v/v) koncentracije. Tako v čisto gojišče RPMI-1640 z dodanim nadomestkom Nutridoma-SP kot v oba pufra DPBS z različnima pH smo dodali še reducent DTT do končne koncentracije 0,5 mM. Celice smo nato za 2 h in 6 h gojili v inkubatorju, ki vzdržuje nadzorovano atmosfero s 5 % CO_2.

Sekretome celic MDA-MB-231 smo pripravili tako, da smo celicam dodali čisto gojišče DMEM brez dodanega seruma, čisto gojišče DMEM z dodanim nadomestkom seruma Nutridoma-SP do končne 1 % (v/v) koncentracije ali gojišče Opti-MEM z zmanjšano vsebnostjo seruma. Pod temi pogoji smo celice nato za 24 h ali 48 h gojili v inkubatorju z vzdrževano atmosfero s 5 % CO_2.

Po končanem gojenju smo uporabljena gojišča oz. pufre, ki so vsebovali izločene proteine, prenesli v mikrocentrifugirke in jih centrifugirali pri sobni temperaturi 5 min pri 500×g ter po končanem centrifugiranju supernatant prenesli v nove mikrocentrifugirke, pelet pa zavrgli. Pripravljen supernatant smo ponovno centrifugirali za 30 min pri 4 °C in maksimalnih obratih (31.150×g). Po centrifugiranju smo supernatante, ki so predstavljali pripravljene sekretome, prenesli v nove mikrocentrifugirke in takoj uporabili za nadaljnje poskuse ali shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –80 °C.

3.2.2.7 Detekcija aktivacije komplementa

Aktivacijo komplementa smo testirali na celični liniji MDA-MB-231. Celice smo najprej do gojili dokler niso dosegle 80-90 % konfluentnost nakar smo jih najprej dvakrat sprali s pufrom DPBS z magnezijem in kalcijem ter jim dodali raztopino za neencimsko odlepljanje celic pripravljeno na osnovi HBSS. Celice smo 5 min inkubirali pri sobni temperaturi z nežnim stresanjem in nato s ponavljajočim pipetiranjem poskrbeli za neencimsko odlepljanje od podlage. Po inkubaciji smo suspenzijo celic prenesli v centrifugirko in določili število živih celic glede na barvanje z barvilom tripansko modrilo. Suspenzijo celic smo centrifugirali pri sobni temperaturi 5 min pri 400×g in po končanem centrifugiranju smo supernatant zavrgli pelet pa resuspendirali v pufru DPBS z magnezijem in kalcijem, pH 6,0 in dodanim DTT do končne koncentracije 0,5 mM. Resuspendiran pelet smo ponovno centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi pri 400×g, odstranili supernatant in pelet ponovno resuspendirali v enakem pufru DPBS tako, da je bila celična gostota celic 6×10^6 celic/ml. Nato smo 100 µl suspenzije celic dodali v centrifugirke v katerih smo predhodno pripravili 100 µl raztopin, ki so vsebovale samo pufer (kontrolni vzorci), pufer in nižjo koncentracijo izbranega katepsina (končna koncentracija encima je bila 0,2 µM), pufer in višjo koncentracijo izbranega katepsina (končna koncentracija encima je bila 1 µM) ali pufer in mešanico izbranega katepsina ter inhibitorja E-64 (končna koncentracija katepsina je bila 1 µM, končna koncentracija E-64 pa 50 µM). Pripravljene vzorce smo 45 min inkubirali z nežnim stresanjem (300 rpm) pri 37 °C. Med inkubacijo smo toplotno inaktivirali človeški serum NHS ali C1q-Dpl s 30 min inkubacijo z nežnim stresanjem (300 rpm) pri 56 °C. Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali 3 min pri sobni temperaturi pri 1.500×g, pelete resuspendirali v pufri GVB++ ter ponovno centrifugirali 3 min pri sobni temperaturi pri 1.500×g. V naslednjem koraku smo odstranili supernatant in celične pelete resuspendirali v pufru GVB++ z dodanim normalnim ali toplotno inaktiviranim človeškim serumom NHS do končne 20 % (v/v) koncentracije ali pufru GVB++, ki je vseboval 50 µg/ml izolirane človeške komponente C1q. Resuspendirane pelete smo 45 min inkubirali pri 37 °C z nežnim stresanjem (300 rpm) in nato vzorce pri sobni temperaturi centrifugirali 3 min pri 1.500×g, odstranili supernatant ter pelet sprali s pufrom PBS++. Če smo izvajali poskus z dodatno inkubacijo s komponento C1q smo pelet sprali s pufrom GVB++ in ga ponovno centrifugirali pri sobni temperaturi 5 min pri 1.500×g. Temu je sledila 45-minutna inkubacija pri 37 °C z nežnim stresanjem (300 rpm), pri čemer smo celični pelet resuspendirali v pufru GVB++ z dodanim normalnim ali toplotno inaktiviranim človeškim serumom C1q-Dpl do končne 20 % (v/v) koncentracije. Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali pr sobni temperaturi 5 min pri 1.500×g, odstranili supernatant in pelet sprali s pufrom PBS++. Sprane vzorce smo nato pripravili na analizo s pretočno citometrijo.

3.2.3 Masna spektrometrija

3.2.3.1 Priprava vzorcev in analiza z masnim spektrometrom

Pripravo vzorcev za identifikacijo zunajceličnih substratov apoptotskih kaspaz ter njihovo analizo z masnim spektrometrom Orbitrap LTQ Velos je naredil dr. Matej Vizovišek. Protokol priprave je temeljil na protokolu razvitem za identifikacijo zunajceličnih substratov cisteinskih katepsinov L in S [77], in sicer smo celice MDA-MB-231 najprej gojili do konfluentnosti in jih nato tretirali z rekombinantnima kaspazama-3 in -7 po postopku opisanem v poglavju 3.2.2.4. Za tretiranje smo celice razdelili na 6 paralelk pri čemer je vsaka paralelka vsebovala vsaj $0{,}3\times10^6$ celic. Izbrane paralelke so predstavljale kontrolo z inhibitorjem z VAD-FMK, ki je vsebovala pufer DPBS z magnezijem in kalcijem in dodanimi 0,5 mM PMSF, 1 mM EDTA in 1 mM DTT ter 50 µM zVAD-FMK, kontrolo z inhibitorjema zVAD-FMK in E-64, ki je poleg pufra DPBS z vsemi dodatki vsebovala tudi 50 µM koncentracijo obeh inhibitorjev, tretirana vzorca z nižjo koncentracijo izbrane kaspaze, ki sta poleg pufra DPBS z vsemi dodatki vsebovala tudi 0,2 µM koncentracijo kaspaze-3 ali kaspaze-7, in vzorca z višjo koncentracijo izbrane kaspaze, ki sta poleg pufra DPBS z vsemi dodatki vsebovala 1 µM koncentracijo kaspaze-3 ali kaspaze-7.

Pripravljene supernatante, ki so predstavljali šedom celic, smo najprej koncentrirali do približno 5-kratne koncentracije z uporabo centrifugalnega filtra Amicon Ultra 0,5 ml, ki prepušča molekule manjše od 3 kDa. Nato smo tretjini koncentrata dodali 6-krat koncentriran nanašalni pufer za NaDS PAGE do končne enkratne koncentracije, jih toplotno obdelali z 10-minutno inkubacijo pri 95 °C ter nanesli na komercialne gele za poliakrilamidno gelsko elektroforezo z 12-odstotno zamreženostjo poliakrilamida. Gelsko elektroforezo smo izvedli z uporabo konstantnega toka 35 mA. Potek elektroforeze smo spremljali s spremljanjem potovanja označevalca velikosti proteinov. Elektroforezo smo ustavili, preden je označevalec z namanjšo velikostjo zapustil gel. Gel smo nato prenesli v standardno barvalno raztopino z barvilom Commassie Brilliant blue ter ga 1 h z nežnim stresanjem inkubirali v tej raztopini. Po inkubaciji smo gel prenesli v razbarvalni pufer za poliakrilamidne gele in ga z nežnim stresanjem inkubirali preko noči ali dlje, če razbarvanje še ni bilo popolno. Ko smo na gelu videli obarvane le še proteinske lise, smo gel najprej slikali z napravo za slikanje gelov in membran G:Box Chemi XR nato pa vsak stolpec lis razrezali na 18 rezin. Vsako od 18-ih rezin smo naprej razrezali na približno 1 mm^3 velike koščke, ki smo jih nato najprej povsem razbarvali z razbarvalno raztopino za masno spektrometrijo in izvedli nadaljnjo pripravo po internem protokolu. Vzorec smo najprej reducirali z uporabo raztopine za redukcijo in nato alkilirali z uporabo raztopine za alkilacijo. Po alkilaciji smo za pripravo peptidov vzorec tripsinizirali s pufrom za tripsinizacijo v katerem smo koščke gela po redukciji in alkilaciji inkubirali preko noči pri 37 °C. Dobljene peptide po tripsinizaciji smo ekstrahirali z uporabo pufra za ekstrakcijo peptidov in po zaključeni ekstrakciji smo dobljene raztopine peptidov koncentrirali do ustreznega volumna ter jih nato nanesli na pripravljene predkolone C18. Pripravljene kolone z nanešenimi vzorci smo shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –20 °C ali takoj uporabili za elucijo peptidov, ki smo jo izvedli elucijsko raztopino. Po eluciji smo vzorce, ki so vsebovali eluirane peptide ponovno skoncentrirali do volumna 10-12 µl in jih pripravili za analizo z masnim spektrometrom.

Za analizo z masnim spektrometrom smo uporabili enake parametre kot Sobotič, in sod. pri identifikaciji zunajceličnih substratov cisteinskih katepsinov [77]. Dobljene rezultate smo analizirali s programsko opremo MaxQuant z iskalnikom Andromeda. Identifikacijo proteinov iz masnospektroskopskih podatkov smo izvedli z iskanjem po človeški bazi proteinov UniProt KB, pri čemer smo za iskanje uporabili kanonično bazo, ki ne vsebuje izoform. Dodatne omejitve iskanja smo nastavili v skladu z objavljenim protokolom [77].

3.2.3.2 Analiza rezultatov masne spektrometrije

Dobljene rezultate iskanj s programsko opremo MaxQuant smo nadalje analizirali tako, da smo s seznama najprej odstranili vse kontaminante (oznaka CON) in reverzna zaporedja, ki jih program uporabi za oceno FDR (oznaka REV). Dodatno smo odstranili tudi proteine, ki smo jih identificirali le z modificiranimi peptidi (ang. identified only by site). Prav tako smo se omejili na proteine, ki smo jih identificirali z vsaj enim edinstvenim peptidom in na takšne, za katere je bila vsota zaznanih edinstvenih in skupnih peptidov več kot 1 (eng. razor+unique ≥ 1). Na koncu smo izločili tudi vse proteine z dvoumno identifikacijo, torej takšne pri katerih programska oprema identifikacijskih peptidov ni uspela pripisati le enemu večinskemu proteinu.

V naslednjem koraku smo izračunali razmerje SCR, in sicer smo za vsak identificiran protein število posnetih spektrov MS/MS pri tretiranju celic z višjo koncentracijo izbranih kaspaz delili s številom posnetih spektrov MS/MS v kontroli pripravljeni z inhibitorjema E-64 in zVAD-FMK. Pri izračunu smo obema uporabljenima številoma prišteli 1, saj smo se na ta način izognili deljenju z 0 v primerih, ko v kontroli nismo posneli nobenega spektra MS/MS za dotični protein. Glede na razmerje SCR smo se osredotočili na proteine, ki so bili značilno povišano identificirani v tretiranem vzorcu v primerjavi s kontrolo, torej je bilo njihovo razmerje SCR ≥ 3. Preostale proteine smo razdelili med takšne z nespremenjeno koncentracijo po tretiranju s kaspazama-3 ali -7 ($0{,}3 < \text{SCR} < 3$) in takšne, ki smo jih redkeje identificirali v tretiranih vzorcih ($\text{SCR} \leq 0{,}3$). S seznama značilno povišanih proteinov smo nato izločili še identifikacijo uporabljenega encima, saj smo v obeh primerih uporabljeno kaspazo zaznali kot značilno povišano.

Identificirane značilno povišane proteine smo z uporabo podatkov v podatkovnih bazah UniProt KB in Gene Ontology razdelili še glede na njihovo celično lokalizacijo in se nadalje osredotočili na proteine, ki se nahajajo na celični membrane. Le-te smo z uporabo obeh podatkovnih baz razdelili še glede na način povezave s celično membrano in glede na njihovo molekulsko funkcijo. Identificirane proteine z znanim načinom povezave s celično membrano smo analizirali tudi s programsko opremo PeptideVisualizer (Kolarič et al., neobljavljeno, članek v pripravi) in izločili tiste, pri katerih smo v tretiranih vzorcih zaznali peptide, ki so del znotrajcelične domene proteina. Dobljene podatke smo preko vmesnika PRIDE [255] naložil v bazo podatkov ProteomeXchange [256] in so javno dostopni pod identifikacijsko kodo PXD061399.

Za izbrane identificirane proteine smo izvedli tudi bioinformatsko napovedovanje cepitvenih mest z bioinformatskim orodjem Procleave [257], s katerim smo analizirali aminokislinska zaporedja zunajceličnih domen izbranih identificiranih proteinov.

3.2.4 Detekcija encimske aktivnosti

Za detekcijo encimske aktivnosti apoptotskih kaspaz smo uporabili sintetični fluorogeni substrat Ac-DEVD-AFC, in sicer smo kot vzbujevalno valovno dolžino uporabili 400 nm in nato merili emitirano fluorescence pri emisijski valovni dolžini 510 nm. V primeru detekcije encimske aktivnosti cisteinskih katepsinov smo le-to detektirali z uporabo fluorogenih substratov Z-FR-AMC, Z-RR-AMC in Z-FVR-AMC. Kot vzbujevalno valovno dolžino smo uporabili 380 nm, medtem ko smo emisijo fluorescence merili pri valovni dolžini 460 nm. Za vse poskuse smo uporabili črne mikrotitrske plošče in samo meritev izvedli s čitalcem mikrotitrskih plošč TECAN Infinite M1000 Pro. Iz dobljenih podatkov spreminjanja fluorescence s časom smo izračunali hitrost spremembe (naklon; enota: RFU/s), pri čemer smo za izračun uporabili le začetno časovno obdobje, ko se je detektirana fluorescence linearno povečevala s časom.

3.2.4.1 Merjenje aktivnosti apoptotskih kaspaz

Encimsko aktivnost apoptotskih kaspaz-3 in -7 smo merili v celičnih lizatih in celičnih gojiščih apoptotičnih celic celične linije Jurkat E6-1. Dodatno smo vpliv rahlo kislega pH (pH 6,0) na encimsko aktivnost apoptotskih kaspaz-3 in -7 preverjali tudi z meritvijo encimske aktivnosti rekombinantnih encimov.

Za meritev zunajcelične in znotrajcelične aktivnosti apoptotskih kaspaz-3 in -7 po sprožitvi apoptoze z dodatkom STS smo celične lizate in celična gojišča apoptotičnih celic Jurkat E6-1 iz poglavja 3.2.2.2 zmešali s standardnim pufrom za detekcijo aktivnosti apoptotskih kaspaz ali s pufrom za detekcijo aktivnosti apoptotskih kaspaz s kislim pH. Paralelno smo za pripravo polovice vzorcev v pufer dodali tudi pankaspazni inhibitor zVAD-FMK do končne koncentracije 25 µM. V primeru celičnih lizatov smo 20 µl le-teh dodali 70 µl izbranega pufra, medtem ko smo v primeru celičnih gojišč zmešali 50 µl gojišča s 40 µl ustreznega pufra. Za preverjanje vpliva znižanja pH na aktivnost apoptotskih kaspaz smo delu celičnih gojišč predhodno znižali pH na pH 6,0 z dodatkom koncentrirane HCl. Pripravljene mešanice smo nato 1 h inkubirali na 37 °C in po inkubaciji smo mešanicam dodali 10 µl substrata Ac-DEVD-AFC. Končna koncentracija substrata v meritvi je bila 20 µM. Po dodatku substrata smo takoj začeli z merjenjem emitirane fluorescence fluoroforja AFC in le-to izvajali 30 min ter iz dobljenih podatkov spremembe fluorescence v odvisnosti od časa izračunali hitrost hidrolize substrata. Dodatno smo vpliv uporabe obeh pufrov za detekcijo aktivnosti apoptotskih kaspaz preverjali z meritvijo aktivnosti rekombinantnih kaspaz-3 in -7. V tem primeru smo založne raztopine rekombinantnih kaspaz iz kaspazne banke odseka B1 redčili z izbranim pufrom za detekcijo aktivnosti do končne koncentracije 10 nM in nato 90 µl redčene raztopine zmešali z 10 µl raztopine substrata Ac-DEVD-AFC ter takoj, brez predhodne inkubacije, začeli z merjenjem emitirane fluorescence.

Vpliv uporabe različnih pufrov in rahlo kislega (pH 6,0) ter fiziološkega pH (pH 7,4) na aktivnost apoptotskih kaspaz smo preverjali tako z meritvijo aktivnosti rekombinantnih encimov kot z meritvijo kaspazne aktivnosti v koncentriranih celičnih gojiščih iz poglavja 3.2.2.3. Za vse meritve smo izbranim pufrom dodali tudi DTT do končne koncentracije 1 mM, EDTA do končne koncentracije 1 mM, PMSF do končne koncentracije 0,5 mM in E-64 do končne koncentracije 25 µM in le-to označili kot standardne pogoje tretiranja. Meritve smo izvedli z uporabo koncentriranih pufrov HEPES in MES, ki smo jih v primeru meritve encimske aktivnosti rekombinantnih kaspaz predhodno redčili z dH_2O do 1-kratne koncentracije, in s pufroma DPBS z magnezijem in kalcijem ter kislim (pH 6,0) in fiziološkim pH (pH 7,4). Založne raztopine rekomvinantnih kaspaz smo z izbranimi pufri redčili do koncentracije 10 nM, jih 1 h inkubirali pri 37 °C in nato 90 µl redčene raztopine dodali 10 µl substrata AC-DEVD-AFC pripravljenega v ustreznem pufru. Paralelno smo pred inkubacijo polovici vzorcev dodali pankaspazni inhibitor zVAD-FMK do končne koncentracije 25 µM. V primeru meritve kaspazne aktivnosti v koncentriranih celičnih gojiščih iz poglavja 3.2.2.3 smo le-te zmešali s komponentami, ki so predstavljali standardne pogoje tretiranja in jih nato razdelili na tri dele. Tretjini vzorcev smo po 1-urni inkubaciji pri 37 °C dodali le še 10 µl raztopine substrata Ac-DEVD-AFC, pripravljene v čistem gojišču RPMI-164, medtem ko smo 90 µl preostalih vzorcev zmešali z 10 µl koncentriranega pufra MES ali HEPES in pripravljeno mešanico nato 1 h inkubirali pri 37 °C. Paralelno smo v vseh primerih polovici vzorcev dodali še pankaspazni inhibitor zVAD-FMK do končne koncentracije 25 µM. Prav tako smo preverili pH pripravljenih mešanic takoj po pripravi in ponovno po 1-urni inkubaciji ter 20 µl pripravljenih mešanic ob obeh časovnih točkah (pred in po 1-urni inkubaciji) uporabili za nadaljnjo imunodetekcijo apoptotskih kaspaz. Po inkubaciji smo 90 µl pripravljenih mešanic koncentriranih gojišč in koncentriranih pufrov prav tako dodali 10 µl raztopine substrata AC-DEVD-AFC,

pripravljene v ustreznem koncentriranem pufru, predhodno redčenem do 1-kratne koncentracije. Končna koncentracija substrata v meritvah, tako v primeru rekombinantnih kaspaz kot v primeru uporabe koncentriranih celičnih gojišč apoptotičnih celic Jurkat E6-1, je bila 20 µM. Po dodatku substrata smo takoj začeli z detekcijo emitirane fluorescence fluoroforja AFC in jo detektirali 30 min ter dobljene podatke uporabili za izračun hitrosti hidrolize substrata, ki je sorazmerna encimski aktivnosti apoptotskih kaspaz.

3.2.4.2 Merjenje aktivnosti cisteinskih katepsinov v sekretomih celic

Aktivnost cisteinskih katepsinov v sekretomih celic smo detektirali tako v sekretomih PMA-diferenciranih celic U937 kot v celicah MDA-MB-231. Pripravljene sekretome iz poglavja 3.2.2.6 smo zmešali s pufrom DPBS z magnezijem in kalcijem in ustreznim pH (pH 6,0 ali 7,4), ki smo mu predhodno dodali DTT in EDTA. Polovico vzorcev smo pripravili s pufrom brez inhibitorja, za pripravo preostalih vzorcev pa smo pufru dodali še inhibitor E-64. Končna koncentracija DTT v meritvi je bila 5 mM, končna koncentracija EDTA je bila 1 mM in kjer je bil dodan E-64 je bila končna koncentracija le-tega 100 µM. Mešanico sekretomov in ustreznega pufra smo pripravili tako, da smo 50 µl sekretoma dodali k 40 µl pufra in pripravljene mešanice nato 30 min inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo mešanicam dodali 10 µl fluorogenega substrata redčenega z ustreznim pufrom. Uporabili smo vse tri fluorogene substrate, Z-FR-AMC, Z-RR-AMC in Z-FVR-AMC, s končno koncentracijo 40 µM. Po dodatku substrata smo takoj začeli izvajati detekcijo emitirane fluorescence in le-to izvajali nadaljnjih 30 min. Hitrost hidrolize substrata smo izračunali iz odvisnosti detektirane fluorescence od časa.

3.2.4.3 Določitev skupne koncentracije cisteinskih katepsinov v sekretomih celic

Za določitev skupne koncentracije cisteinskih katepsinov v sekretomih celic smo uporabili sekretome PMA-diferenciranih celic celične linije U937. Sekretome smo pripravili po protokolu opisanem v poglavju 3.2.2.6, in sicer smo skupno koncentracijo določali le v sekretomih pripravljenih v pufrih DPBS z magnezijem in kalcijem ter nižjim (pH 6,0) ali fiziološkim pH (pH 7,4). Pripravljene sekretome smo zmešali z ustreznim pufrom z naraščajočimi koncentracijami inhibitorja E-64, in sicer smo 50 µl sekretoma dodali k 40 µl pufra DPBS z magnezijem in kalcijem (pH 6,0 ali 7,4), ki smo mu predhodno dodali DTT, EDTA in inhibitor E-64. Končna koncentracija DTT v mešanici je bila 5 mM, končna koncentracija EDTA je bila 1 mM, končne koncentracije E-64 pa so bile 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60 in 80 nM. Pripravljene mešanice smo 30 min inkubirali pri 37 °C in jim nato dodali 10 µl ustreznega pufra z dodanim substratom Z-FR-AMC. Končna koncentracija substrata v mešanici je bila 40 µM. Po dodatku substrata smo takoj začeli 20-minutno meritev emitirane fluorescence in izračunali hitrost reakcije za vsako uporabljeno koncentracijo inhibitorja. Razmerja hitrosti reakcij v prisotnosti inhibitorja in hitrosti reakcije brez inhibitorja smo nanesli na graf v odvisnosti od koncentracije inhibitorja ter iz presečišča z abscisno osjo ocenili skupno koncentracijo cisteinskih katepsinov v vzorcu. Pri končnem izračunu smo upoštevali tudi redčitveni faktor in z njim ustrezno pomnožili grafično določeno navidezno koncentracijo.

3.2.5 Imunodetekcija proteinov

3.2.5.1 Priprava totalnih celičnih lizatov

Totalne celične lizate celic celičnih linij HT-144 in MDA-MB-231 smo pripravili tako, da smo celice najprej do konfluentnosti gojili na sterilnih petrijevkah, Ko so celice prerastle gojitveno površino, smo jih najprej dvakrat sprali s pufrom DPBS z magnezijem in kalcijem

in nato odlepili od podlage z uporabo neencimske raztopine soli za odlepljanje celic na osnovi HBSS. Po približno 5-minutni inkubaciji v neencimski raztopini soli za odlepljanje celic, smo celice mehansko odlepili s ponavljajočim pipetiranjem in celično suspenzijo prenesli v centrifugirko. V naslednjem koraku smo celično suspenzijo centrifugirali pri sobni temperaturi 5 min pri 400×g, zavrgli supernatant in celični pelet resuspendirali v pufru DPBS z magnezijem in kalcijem. Resuspendiran celični pelet smo ponovno centrifugirali pri sobni temperaturi 5 min pri 400×g, zavrgli supernatant in celični pelet takoj uporabili za nadaljnjo pripravo ali shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –80 °C.

Pelet celic smo resuspendirali s standardnim pufrom za lizo celic, pri čemer smu uporabili 200 µl lizirnega pufra za vsako konfluentno petrijevko celic, in jih nato mehansko lizirali z uporabo injekcijske igle z oznako 26G. Suspenzijo celičnega peleta smo najmanj 20-krat prenesli skozi iglo, čemur je sledila še 30-minutna inkubacija na ledu z močnim stresanjem. Po inkubaciji smo suspenzije liziranih celic centrifugirali 10 min pri 16.000×g in 4 °C, shranili supernatant in zavrgli oborino, s čimer smo se znebili vsega netopnega materiala. Koncentracijo proteinov v pripravljenih supernatantih, ki so predstavljali totalne celične lizate, smo določili z uporabo reagenta Bradford. Glede na določeno koncentracijo proteinov smo pripravili vzorce za NaDS PAGE tako, da smo totalne celične lizate zmešali z destilirano vodo in 6-kratnim nanašalnim pufrom za NaDS PAGE do končne 1-kratne koncentracije nanašalnega pufra in končne koncentracije proteinov v vzorcu 10 µg/ml.

3.2.5.2 Določanje koncentracije proteinov z reagentom Bradford

Koncentracijo proteinov v totalnih celičnih lizatih smo določili z metodo po Bradfordu, s katero določimo relativno koncentracijo proteinov glede na umeritveno krivuljo proteina z znano koncentracijo. Zato smo najprej pripravili umeritveno krivuljo z uporabo komercialnega proteina BSA z založno koncentracijo 10 mg/ml. Za pripravo umeritvene krivulje smo komercialni BSA najprej redčili z destilirano do založne koncentracije 100 µg/ml nato pa v vdolbinice mikrotitrske plošče z 96-imi vdolbinicami pripravili ustrezne redčitve BSA s katerimi smo pokrili pričakovano območje. Pripravili smo redčitve s končno koncentracijo BSA 0, 2, 6, 10, 14, 16, 20 in 25 µg/ml in končnim volumnom 160 µl. Pripravljenim redčitvam smo nato dodali 40 µl reagenta Bradford in celotno mešanico premešali s ponavljajočim pipetiranjem. Po mešanju smo s čitalcem mikrotitrskih plošč TECAN Infinite M1000 Pro takoj pomerili absorbanco pripravljenih mešanic pri valovni dolžini 595 nm. Z dobljenimi podatki smo pripravili umeritveno krivuljo.

Totalne celične lizate smo najprej redčili z destilirano vodo v razmerju 1:800 in nato 160 µl redčenih lizatov prenesli v vdolbinice mikrotitrske plošče z 96-imi vdolbinicami. Redčenim lizatom smo dodali 40 µl reagenta Bradford ter mešanico premešali s ponavljajočim pipetiranjem. S čitalcem mikrotitrskih plošč smo pomerili absorbanco vzorcev pri valovni dolžini 595 nm in iz dobljenih podatkov z uporabo umeritvene krivulje izračunali celokupno koncentracijo proteinov v totalnih celičnih lizatih.

3.2.5.3 Obarjanje proteinov s trikloroocetno kislino

Za imunodetekcijo apoptotskih kaspaz-3 in -7 v celičnih gojiščih apoptotičnih celic Jurkat E6-1 smo delež pripravljenih gojišč odvzetih po različno dolgi izpostavljenosti STS uporabili za obarjanje proteinov s trikloroocetno kislino. Proteine iz celičnih gojišč, ki smo jih pripravili po protokolu opisanem pod točko 3.2.2.2, smo oborili tako, da smo 200 µl gojišča dodali 100 % (w/v) trikloroocetno kislino do končne 10 % (v/v) koncentracije. Pripravljeno mešanico smo vorteksirali in za najmanj 1 h ali čez noč shranili pri temperaturi 4 °C. V naslednjem koraku smo gojišča z dodano trikloroocetno kislino centrifugirali 10 min pri 18.000×g in 4 °C, zavrgli supernatant in oborini proteinov dodali 300 µl ekvivolumske

mešanice etanola in etil etra. Po dodatku smo vzorce vorteksirali, ponovno centrifugirali 10 min pri 18.000×g in 4 °C ter zavrgli supernatant. Korak spiranja z mešanico etanola in etil etra smo še dvakrat ponovili in nato dobljeno oborino proteinov posušili na zraku. Posušeno oborino smo raztopili v 20 µl 1-kratnega nanašalnega pufra za NaDS PAGE, ki smo ga pripravili tako, da smo koncentriran 6-kratni pufer redčili z destilirano vodo. Raztopljene oborine smo toplotno obdelali z 10-minutno inkubacijo pri 95 °C in takoj uporabili za NaDS PAGE ali shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –20 °C.

3.2.5.4 Obarjanje proteinov z acetonom

Pripravljene šedome po tretiranju celic z rekombinantnimi encimi iz poglavja 3.2.2.4 in pripravljene sekretome rakavih in monocitnih celic iz poglavja 3.2.2.6 smo za imunodetekcijo s prenosom western pripravili z obarjanjem z acetonom [258]. Najprej smo 200 µl šedoma ali sekretoma zmešali s 4-kratnim volumnom hladnega acetona in pripravljene mešanice preko noči shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –20 °C. Mešanice smo nato centrifugirali 15 min pri 13.000 rpm in 4 °C, zavrgli supernatant in oborino sprali s 400 µl hladnega acetona. Vzorce smo takoj, brez vmesnega vorteksiranja, ponovno centrifugirali 15 min pri 13.000 rpm in 4 °C ter postopek spiranja še enkrat ponovili. Po končanem spiranju smo dobljeno oborino posušili na zraku in jo nato raztopili v 20 µl 1-kratnega nanašalnega pufra za NaDS PAGE, toplotno obdelali z 10-minutno inkubacijo pri 95 °C in takoj uporabili za NaDS PAGE ali shranili v zamrzovalniku pri temperaturi –20 °C.

3.2.5.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

Za ločevanje proteinov v vzorcih sekretomov, šedomov, celičnih lizatov in celičnih gojišč smo uporabili poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (tabela 1).

Tabela 1: Sestava poliakrilamidnega gela za NaDS PAGE. z 12,5 % zamreženostjo ločevalnega gela in 4 % zamreženostjo koncentracijskega gela.

Sestavina	**Ločevalni gel (12,5 %)**	**Koncentracijski gel (4 %)**
dH_2O	5,52 ml	3,075 ml
40 % akrilamid/bisakrilamid	3,13 ml	625 µl
ločevalni pufer (8x)	1,25 ml	/
koncentracijski pufer (4x)	/	1,25 ml
10 % (w/v) NaDS	100 µl	50 µl
10 % (w/v) APS	40 µl	20 µl
TEMED	20 µl	10 µl

Elektroforezo smo izvedli pod redukcijskimi pogoji, saj smo vzorce pripravili z dodatkom 6-kratnega nanašalnega pufra za NaDS PAGE, ki je vseboval 300 mM DTT. Vzorce z dodanim nanašalnim pufrom do končne 1-kratne koncentracije smo toplotno obdelali z 10-minutno inkubacijo pri 95 °C. Za izvedbo smo uporabili poliakrilamidne gele, ki smo jih pripravili po protokolu v tabeli 1. Elektroforezo smo izvedli v elektroforeznem pufru pri konstantnem električnem toku 35 mA/gel in za določanje velikosti uporabili proteinski označevalec PAGE Ruler. Na gel smo v primeru šedomov, ki smo jih uporabili za identifikacijo substratov katepsina K in kaspaz-3 in -7 z masno spektrometrijo, nanesli

tretjino (35 µl) koncentriranega šedoma s 5-kratno koncentracijo. V ostalih primerih, ko smo za NaDS PAGE uporabili vzorce šedomov, sekretomov ali celičnih gojišč, smo na gel nanesli celoten vzorec, ki smo ga pripravili z obarjanjem 200 µl celičnega gojišča, šedoma ali sekretoma. V primeru koncentriranih celičnih gojišč apoptotskih celic smo na gel nanesli 20 µl koncentriranega gojišča. Kadar smo v nadaljnjih korakih izvedli imunodetekcijo zunajceličnih cepitev, smo poleg vzorcev šedomov na gel nanesli tudi 200 µg totalnega celičnega lizata ustreznih celic. Za detekcijo apoptotskih kaspaz v celičnih lizatih apoptotičnih celic smo na gel za vsak pogoj nanesli 20 µl pripravljenega celičnega lizata.

3.2.5.6 Prenos western

NaDS PAGE smo ustavili glede na potovanje proteinskega označevalca in glede na velikost proteinov, ki smo jih želeli detektirati, in nato gele uporabili za prenos western. Gele smo prenesli na nitrocelulozno membrano in v ustreznih posodah izvedli prenos western, in sicer mokri prenos za večino predstavljenih imunodetekcij. Edina izjema, za katero smo opravili polsuhi prenos western, je detekcija prisotnosti cisteinskih katepsinov v sekretomih celic.

Za mokri prenos western smo uporabili prenašalni pufer z metanolom, in sicer s končno 20 % (v/v) koncentracijo metanola v primeru imunodetekcije proteinov, manjših od 50 kDa, ter 10 % (v/v) končno koncentracijo v primeru imunodetekcije proteinov, večjih od 50 kDa. Prenos smo izvedli pri konstantnem električnem toku 250 mA in je trajal 3 h. V primeru polsuhega prenosa western je le-ta potekal 10 min pri konstantnem električnem toku 1,3 A in zanj smo uporabili prenašalni pufer za polsuhi prenos western, ki vsebuje etanol. Po prenosu smo membrane najprej sprali s pufrom TBS-T in jih nato prenesli v blokirno raztopino posnetega mleka v prahu ter 2 h inkubirali pri sobni temperaturi z nežnim stresanjem. V naslednjem koraku smo membrane znova sprali s pufrom TBS-T in nanje nanesli raztopino primarnih protiteles, pripravljeno v 5 % raztopini posnetega mleka ali BSA v pufru TBS-T, ter jih preko noči inkubirali pri 4°C z nežnim stresanjem. Naslednji dan smo membrane najprej spirali, tako da smo nanje 4-krat nanesli svež pufer TBS-T in jih vsakič 15 min inkubirali pri sobni temperaturi z nežnim stresanjem. Po zadnjem spiranju smo na membrane nanesli raztopino sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo, pripravljeno v 5 % raztopini posnetega mleka v TBS-T ali v 3 % raztopini BSA v TBS-T, in membrane v tej raztopini 1 h inkubirali pri sobni temperaturi z nežnim stresanjem. Inkubaciji s sekundarnimi protitelesi je sledilo ponovno spiranje s pufrom TBS-T, ki smo ga izvedli s štirimi menjavami pufra in vmesnimi 15-minutnimi inkubacijami pri sobni temperaturi z nežnim stresanjem. Sprane membrane smo uporabili za detekcijo na podlagi kemiluminiscence s sistemom ECL in le-to izvedli po navodilih proizvajalca. Gele smo nato slikali z napravo za slikanje membran in gelov G:Box. Kjer je bilo potrebno, smo poleg nivoja iskanih proteinov detektirali tudi nivo β-aktina, ki smo ga uporabili za kontrolo nanosa na gel.

3.2.6 Pretočna citometrija

Pretočno citometrijo smo izvedli z uporabo pretočnega citometra FACSCalibur ali pretočnega citometra BD Accuri™ C6 Plus in pridobljene rezultate nato analizirali s programsko opremo FlowJO. V primeru pretočnega citometra FACSCalibur smo za vzbujanje uporabljali laser valovne dolžine 488 nm, medtem ko smo v primeru BD Accuri™ C6 Plus vzorce ekscitirali z laserjema z valovnima dolžinama 488 nm in 640 nm.

3.2.6.1 Spremljanje poteka apoptoze

Potek apoptoze smo spremljali z označevanjem celic z rekombinantnim proteinom Annexin V označenim z barvilom PE in fluorescenčnim barvilom PI. V celicah Jurkat E6-1 smo

sprožili apoptozo po protokolu opisanem v poglavju 3.2.2.1 in po 12 h ter 24 h smo celično suspenzijo apoptotičnih celic prenesli v epruvetke za pretočni citometer ter jih centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi pri 400×g. Po centrifugiranju smo z vakuumsko črpalko odstranili celično gojišče in resuspendirali pelet celic v vezavnem pufru za Annexin V. Celice smo nato označili tako, da smo vsakemu vzorcu dodali 2 µl konjugata Annaxin V-PE in po 15-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo vzorcem dodali še takšno količino založne raztopine PI, da je vsak vzorec vseboval 100 ng barvila PI. Pripravljene označene vzorce celic smo pomerili s pretočnim citometru FACSCalibur pri čemer smo zaznavali emisijo z detektorjema FL2, s filtrom 585/42, ter FL3, s filtrom 661/16.

3.2.6.2 Spremljanje aktivacije komplementa z detekcijo odlaganja komponent C1q in C3c na površino celic

Za detekcijo odlaganja komponent C1q in C3c na površino rakavih celic smo celice tretirali po protokolu opisanem v poglavju 3.2.2.7. Po končani obdelavi celic s človeškim serumom ali z izolirano komponento C1q smo celične pelete resuspendirali v pufru PBS++ ter jih centrifugirali 5 min pri 4 °C in 400×g. Po centrifugiranju smo z vakuumsko črpalko odstranili supernatant in pelet resuspendirali v raztopini z barvilom FITC-označenih protiteles proti človeški komponenti C1q ali proti človeški komponenti C3c. Raztopino protiteles smo pripravili tako, da smo založno raztopino protiteles redčili s pufrom PBS++ v razmerju 1:100. Vzorce resuspendiranih peletov smo prenesli na led in jih 30 minut inkubirali v temi. Po 20 min inkubacije smo v kontrolni vzorec za živost celic dodali 0,05 % (v/v) Triton-X-100 ter s tem povzročili celično smrt v tem vzorcu. Med vsemi nadaljnjimi koraki po končani inkubaciji smo vzorce ščitili pred direktno svetlobo. Vzorce smo po končani inkubaciji centrifugirali 5 min pri 4 °C in 400×g, odstranili raztopino protiteles in pelet sprali s pufrom DPBS brez magnezija in kalcija. Nato smo vzorce ponovno centrifugirali 5 min pri 4 °C in 400×g, odstranili pufer in pelet resuspendirali v 300 µl pufra DPBS brez magnezija in kalcija ter suspenzijo prenesli v epruvetke za pretočni citometer. Pripravljene označene vzorce smo pomerili s pretočnim citometrom, pri čemer smo v primeru citometra FACSCalibur zaznavali emisijo z detektorjema FL1, s filtrom 530/30, in FL3, s filtrom 661/16, v primeru citometra BD Accuri™ C6 Plus pa z detektorjema FL1, s filtrom 533/30, in FL3, s filtrom 610/20. Tik pred meritvijo smo v vzorce v vsak vzorec dodali še takšno količino založne raztopine barvila PI, da je vsak vzorec vseboval 100 ng barvila.

3.2.6.3 Detekcija zunajcelične cepitve NRP-1

Detektcijo zunajcelične cepitve NRP-1 na površini rakavih celic smo izvedli tako, da smo celice MDA-MB-231 najprej tretirali z rekombinantnim človeškim katepsinom L ali človeškim katepsinom S po protokolu opisanem v poglavju 3.2.2.4. Pelete celic smo sprali s pufrom PBS++ in jih centrifugirali 5 min pri 4 °C in 400×g. Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli in pelet resuspendirali v raztopini primarnih protiteles proti človeškemu NRP-1 s koncentracijo 0,5 µg/ml pripravljeni v pufru PBS++. Vzorce resuspendiranih peletov smo 45 min inkubirali pri 37 °C z nežnim stresanjem s 300 rpm. Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali 5 min pri 4 °C in 400×g, pelete sprali s pufrom PBS++ in izvedli ponovno centrifugiranje pod enakimi pogoji. V naslednjem koraku smo zavrgli supernatant in pelete resuspendirali v raztopini sekundarnih z barvilom Alexa Fluor 488-označenih protiteles. Raztopino sekundarnih protiteles smo pripravili tako, da smo založno raztopino redčili s pufrom PBS++ do končne koncentracije 0,2 µg/ml. Vzorce resuspendiranih peletov smo prenesli na led in jih 45 min inkubirali v temi z nežnim stresanjem. 10 min pred koncem inkubacije smo v kontrolni vzorec za živost celic dodali

0,05 % (v/v) Triton-X-100. Vse nadaljnje postopke smo izvedli tako, da smo vzorce med izvedbo ščitili pred svetlobo. Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali, sprali s pufrom DPBS brez magnezija in kalcija ter ponovno centrifugirali za 5 min pri 4 °C in 400×g. Po zadnjem centrifugiranju smo pelete resuspendirali v pufru DPBS brez magnezija in kalcija ter pripravljene suspenzije prenesli v epruvetke za pretočni citometer. Tako pripravljene označene vzorce smo nato pomerili s pretočnim citometrom z uporabo nastavitev opisanih v prejšnjem poglavju. Prav tako smo v vzorce tik pred meritvijo dodali raztopino barvila PI, tako da je vsak vzorec vseboval 100 ng barvila.

3.2.7 Cimografija

S cimografijo smo detektirali vpliv zunajcelične aktivnosti človeškega katepsina K na zaznavno želatinazno aktivnost v šedomih. V ta namen smo celice tretirali po postopku opisanem v poglavju 3.2.2.4 in pri tem uporabili različne eksperimentalne pogoje. Za tretiranje celic smo uporabili pufer DPBS z magnezijem in kalcijem in dvema različnima pH, in sicer pH 6,0 in pH 7,4. Pufru smo dodali še inhibitor serinskih proteaz PMSF do končne koncentracije 1 mM. V primeru tretiranih vzorcev, ki so vsebovali človeški katepsin K s končno koncentracijo 0,5 µM, smo založni raztopini katepsina K predhodno dodali reducent DTT do končne koncentracije 2,5 mM in tako poskrbeli za odstranitev reverzibilnega inhibitorja MMTS iz aktivnega mesta encima. Poskus smo nato izvedli v treh paralelkah in kot eksperimentalne pogoje uporabili pogoje predstavljene v tabeli 2.

Tabela 2: Uporabljeni eksperimentalni pogoji za spremljanje vpliva katepsina K na zaznavno želatinazno aktivnost.

Izbran pufer	**Eksperimentalni pogoj**	**Dodatne komponente**
DPBS z magnezijem in kalcijem 1 mM PMSF pH 6,0	kontrola	0,5 µM hctsK, 50 µM E-64
	hctsK	1 mM PMSF, 0,5 µM hctsK, 50 µM E-64
	hctsK + inhibitorji MMP-jev	0,5 µM hctsK, 2,5 mM EDTA, 10 µM ilomastat/GM6001, 10 µM batimastat
DPBS z magnezijem in kalcijem 1 mM PMSF pH 7,4	kontrola	0,5 µM hctsK, 50 µM E-64
	hctsK	0,5 µM hctsK
	hctsK + inhibitorji MMP-jev	0,5 µM hctsK, 2,5 mM EDTA, 10 µM ilomastat/GM6001, 10 µM batimastat

Odlepljene celice smo resuspendirali v pripravljenih mešanicah pufrov za vsak eksprimentalni pogoj in jih nato 30 min inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali pri sobni temperaturi 5 min pri 500×g, pelete zavrgli, supernatantom pa dodali inhibitor E-64 do končne koncentracije 50 µM, s čimer smo ustavili morebitno nadaljnjo encimsko aktivnost katepsina K. Nato smo supernatante ponovno centrifugirali 5 min pri 4 °C in 14.000×g in po centrifugiranju smo pelet zavrgli, supernatante pa razdelili na dva dela. Prvemu delu vzorcev nismo dodali ničesar, drugemu pa inhibitorje MMP-jev,

in sicer EDTA do končne koncentracije 2,5 mM, ilomastat/GM6001 do končne koncentracije 10 µM in batimastat do končne koncentracije 10 µM. Pripravljene vzorce smo nato 30 min inkubirali pri 37 °C in po končani inkubaciji 35 µl vzorca zmešali s 7 µl 6-kratnega nanašalnega pufra za NaDS PAGE brez DTT ter celotno mešanico nanesli na NaDS PAGE gel, ki je vseboval 1 mg/ml želatine (tabela 3). Elektroforezo smo nato izvedli s stalnim tokom 35 mA/gel in med elektroforezo kadičko za NaDS PAGE obdali z ledom in tako preprečili prekomerno segrevanje ter posledično denaturacijo proteinov v vzorcih. Dodatno smo na enak način pripravili še en set vzorcev, ki smo ga uporabili za standardno poliakrilamidno elektroforezo v prisotnosti NaDS in nadaljnjo imunodetekcijo s prenosom western.

Elektroforezo smo ustavili preden je označevalec z najmanjšo velikostjo zapustil gel in nato izvedli renaturacijo, tako da smo gel ob nežnem stresanju 1 h inkubirali v renaturacijskem pufru. Po 1 h smo gel sprali z dH_2O s 5 min inkubacijo ob nežnem stresanju in po spiranju smo gel ponovno prenesli v renaturacijski pufer in ga preko noči inkubirali pri 37 °C. V naslednjem koraku smo gel prenesli v barvalno raztopino za poliakrilamidne gele in ga v tej raztopini 1 h inkubirali pri sobni temperaturi ob nežnem stresanju. Obarvan gel smo nato prenesli v razbarvalni pufer za poliakrilamidne gele in ga pri sobni temperaturi inkubirali ob nežnem stresanju dokler nismo opazili brezbarvnih lis, ki kažejo na razgradnjo želatine, oziroma dokler ni prišlo do popolnega razbarvanja koncentracijskega gela, ki želatine ne vsebuje. Razbarvan gel smo slikali z napravo za slikanje membran in gelov G:Box.

Tabela 3: Sestava gela za NaDS PAGE z želatino.

Sestavina	**Ločevalni gel**	**Koncentracijski gel**
2,65 mg/ml želatina	4,2 ml	/
dH_2O	/	3 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,6 ml	/
0,5 M Tris, pH 6,8	/	1,25 ml
40 % akrilamid/bisakrilamid	3,5 ml	0,65 ml
50 % (v/v) glicerol	82 µl	/
10 % (w/v) NaDS	82 µl	50 µl
TEMED	15 µl	7,5 µl
10 % (w/v) APS	30 µl	15 µl

3.2.8 Svetlobna mikroskopija

Svetlobno mikroskopijo smo izvedli z mikroskopom Olympus IX81 opremljenim s CO_2 komoro za spremljanje živih celic in kamero Olympus DP28. Mikroskop smo upravljali s programsko opremo cellSens, ki omogoča avtomatsko zaporedno slikanje celic od izbranih časovnih točkah. V našem primeru smo celice spremljali s fazno-kontrastnim objektivom z 20-kratno povečavo in jih slikali vsako minute s skupnim časom slikanja 15 minut. Dobljene slike smo analizirali s programom ImageJ.

3.2.8.1 Spremljanje vpliva katepsina K na adhezijo rakavih celic

Vpliv katepsina K na adhezijo rakavih celic smo spremljali s tretiranjem celic celične linije HT-144 z rekombinantnim človeškim katepsinom K. V ta namen smo celice nacepili na sterilne petrijevke in gojili v kompletnem mediju DMEM dokler niso dosegle 90-100 % konfluentnosti. S celic smo odstranili izrabljeno gojišče in jih dvakrat sprali s pufrom DPBS z magnezijem in kalcijem. Vmes smo pripravili rekombinantni človeški katepsin K tako, da smo založnemu katepsinu K iz katepsinske banke dodali DTT do končne koncentracije 2,5 mM in s tem vzpostavili reducirajoče okolje ter poskrbeli za odcep reverzibilnega inhibitorja MMTS, ki je standardno dodan rekombinantnim katepsinom shranjenim v katepsinski banki odseka B1. Spranim celicam smo nato dodali pufer DPBS z magnezijem in kalcijem in nižjim pH (pH 6,0) ali fiziološkim pH (pH 7,4) ter izbranimi eksperimentalnimi pogoji predstavljenimi v tabeli 4. Mešanico, ki je vsebovala tako katepsin K kot njegov inhibitor smo pripravili približno 1 h pred uporabo in tako omogočili inhibicijo katepsina K. K ostalim mešanicam smo katepsin K dodali tik pred uporabo. Kot dodatno kontrolo smo celicam dodali tudi raztopino za encimsko odlepljanje celic TrypLE Select, ki smo jo redčili z izbranim pufrom v razmerju 1:3. Po dodatku pripravljenih puferskih mešanic na celice smo le te 15 min slikali s svetlobnim mikroskopom in po končanem poskusu celice zavrgli. S programom ImageJ smo izvozili slike celic ob izbranih časovnih točkah (0, 2, 6, 10 in 15 min), jim spremenili barvo v črno-beli odtenek (8-bitna slika) in dobljene slike uporabili za nadaljnje štetje prisotnih okroglih celic, saj gre v primeru okrogle oblike za morfologijo, ki je značilna za suspenzijske celice. Glede na število okroglih celic smo določili vpliv tretiranja s katepsinom K na adhezijo celic HT-144.

Tabela 4: Uporabljeni eksperimentalni pogoji za spremljanje vpliva katepsina K na adhezijo rakavih celic. Razen, ko smo uporabili TrypLE Select smo v vseh ostalih primerih v osnovni pufer dodali inhibitor serinskih proteaz PMSF. Založni raztopini človeškega katepsina K smo predhodno dodali reducent DTT, zato le-tega naknadno nismo dodali v pufer. Prav tako v pufer nismo dodali EDTA, saj le-ta vpliva tako na aktivnost hctsK kot tudi na aktivnost MMP-jev.

Izbran pufer	**Eksperimentalni pogoj**	**Dodatne komponente**
DPBS z magnezijem in kalcijem pH 6,0	kontrola	1 mM PMSF
	hctsK + E-64	1 mM PMSF, 0,5 µM hctsK, 50 µM E-64
	hctsK	1 mM PMSF, 0,5 µM hctsK
	hctsK + inhibitorji MMP-jev	1 mM PMSF, 0,5 µM hctsK, 10 µM ilomastat/GM6001, 10 µM batimastat
	TrypLE Select	/
DPBS z magnezijem in kalcijem pH 7,4	kontrola	1 mM PMSF
	hctsK + E64	1 mM PMSF, 0,5 µM hctsK, 50 µM E-64
	hctsK	1 mM PMSF, 0,5 µM hctsK
	hctsK + inhibitorji MMP-jev	1 mM PMSF, 0,5 µM hctsK, 10 µM ilomastat/GM6001, 10 µM batimastat
	TrypLE Select	/

3.2.9 Statistična analiza

Prikazani rezultati predstavljajo povprečno vrednost treh neodvisnih poskusov opravljenih z meritvami tehničnih replikatov in so prikazani skupaj s standardno napako (± SD). Slikovni rezultati imunodetekcije po prenosu western, cimografije in svetlobne mikroskopije predstavljajo reprezentativne rezultate več ponovitev. Kadar smo primerjali rezultate različnih tretiranj celic, predvsem pri detekciji depozicije komponent človeškega sistema komplementa, smo rezultate predstavili s stopnjo spremembe gMFI izbranega fluoroforja, in sicer smo primerjali stopnjo spremembe s pozitivno kontrolo, kadar smo za vsa tretiranja uporabili enake pogoje za pozitivno kontrolo, ali netretirane celice, kadar so se pozitivne kontrole med različnimi tretiranji razlikovale. V primerih, kjer smo ugotavljali statistično značilnost spremembe smo le-to določili z analizo variance ANOVA, ki je del programske opreme GraphPad Prism. ****p ≤ 0,0001; ***p ≤ 0,001; **p ≤ 0,01; *p ≤ 0,05; ns – nesignifikantno.

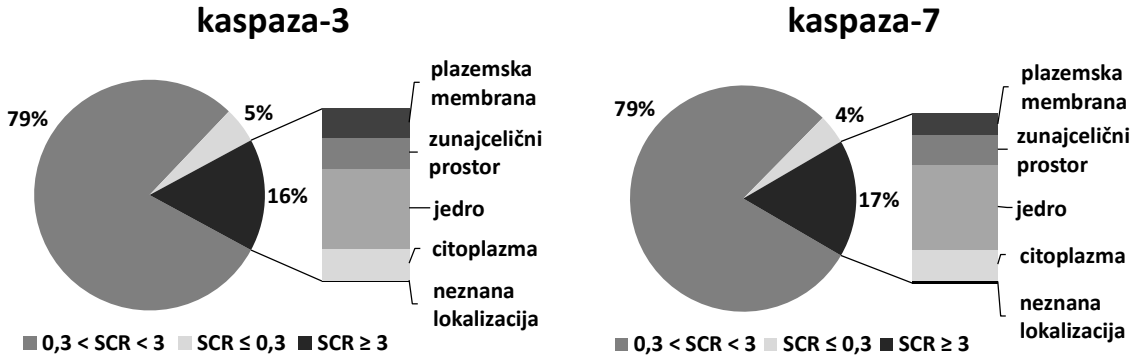
Poglavje 4

Rezultati

4.1 Zunajcelična vloga apoptotskih kaspaz

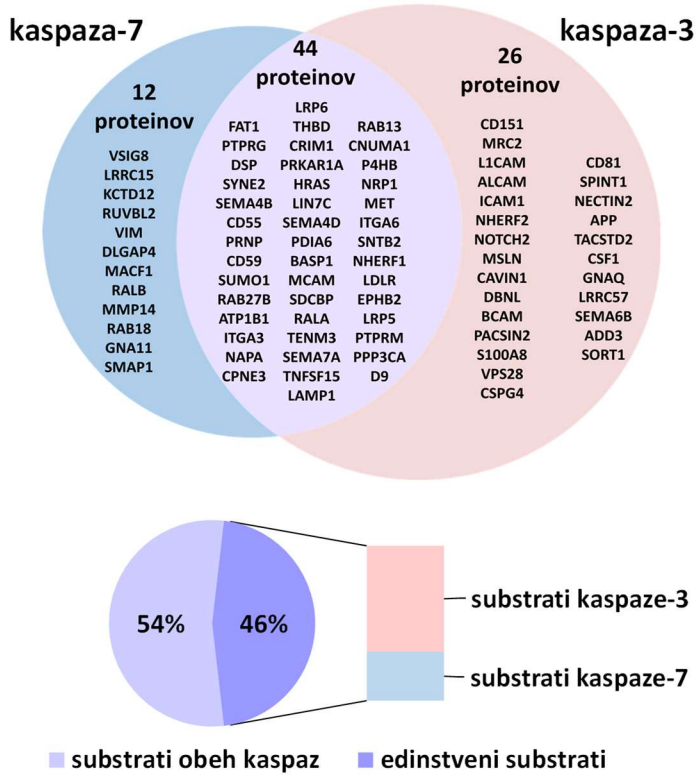
4.1.1 Identifikacija zunajceličnih substratov apoptotskih kaspaz z masno spektrometrijo

Kaspaze, kot cisteinski katepsini, prav tako spadajo v skupino cisteinskih endopeptidaz glede na klasifikacijo MEROPS, zato smo preverili, ali po tretiranju celic z apoptotskimi kaspazami-3 in -7 pride do zunajceličnih cepitev membransko-usidranih proteinov s celične membrane rakavih celic. Zunajcelična proteoliza membransko-usidranih proteinov je značilna predvsem za mikrookolje tumorja [259] in nedavno so kolegi kot potencialne šedaze identificirali tudi cisteinske katepsine [77]. Posledično smo preverili, ali bi podobno vlogo lahko imele tudi apoptotske kaspaze. Po tretiranje celic rakave celične linije MDA-MB-231 smo z masno spektrometrijo identificirali proteine, ki so bili značilno bolj prisotni v šedomih, pridobljenih s tretiranih vzorcev, v primerjavi s kontrolo, tretirano le s pufrom z inhibitorjema zVAD-FMK in E-64. Rezultati kažejo, da je v primeru obeh kaspaz približno 1/6 proteinov takšnih z značilno povišano prisotnostjo in od teh se jih 16 %, v primeru kaspaze-3, oziroma 12 %, v primeru kaspaze-7, nahaja na plazemski membrani celic (slika 8).



Slika 8: Po tretiranju rakave celične linije MDA-MB-231 so v šedomih zaznavni proteini z značilno povišano prisotnostjo. Z metodo računanja razmerij spektralnega štetja smo polkvantitativno določili koncentracijo proteinov v šedomih tretiranih celic v primerjavi s kontrolo in tako identificirali proteine z značilno povišano koncentracijo po tretiranju s kaspazama-3 in -7. Rezultati prikazujejo deleže proteinov z značilno povišano (SCR $\geq$ 3), značilno zmanjšano (SCR $\leq$ 0,3) in nespremenjeno (0,3 $<$ SCR $<$ 3) prisotnostjo in celično lokalizacijo proteinov z značilno povišano prisotnostjo.

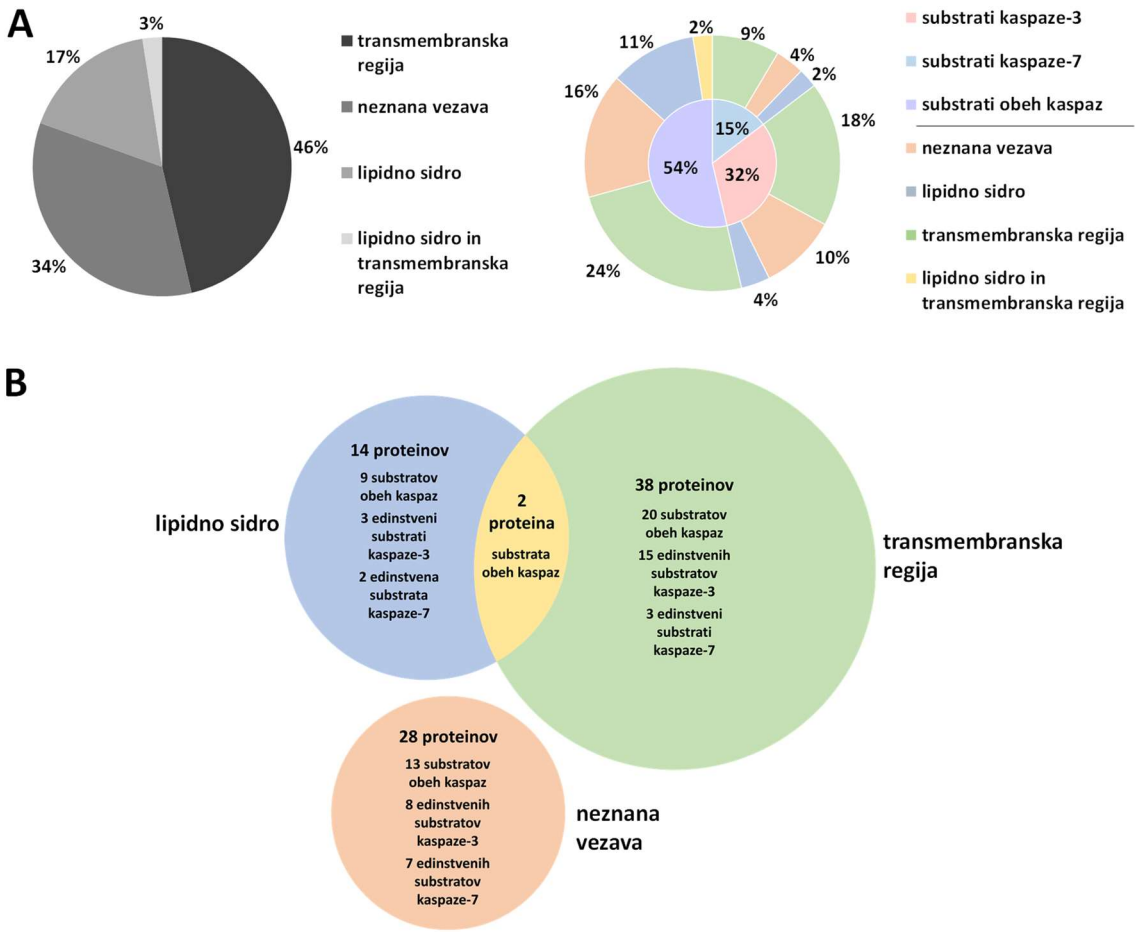
Za obe kaspazi smo tako identificirali 82 proteinov z značilno povišano prisotnostjo v šedomih tretiranih celic in znano lokalizacijo na plazemski membrane. Identificirane proteine smo obravanavali kot potencialne zunajcelične substrate obeh apoptotskih kaspaz in za 54 % potencialnih substratov se je izkazalo, da smo cepitve zaznali po tretiranju celic z obema kaspazama, medtem ko so ostali identificirani proteini predstavljali potencialne edinstvene substrate vsake izmed preiskovanih kaspaz. Med edinstvenimi substrati smo za približno 2/3 identificiranih proteinov značilno povišano prisotnost zaznali le po tretiranju z apoptotsko kaspazo-3, preostala tretjina pa predstavlja potencialne edinstvene substrate kaspaze-7 (slika 9).



Slika 9: Približno polovico identificiranih potencialnih zunajceličnih substratov lahko cepita obe preiskovani kaspazi. Vennov diagram prikazuje katere identificirane proteine, ki so zapisani z njihovimi imeni genov, lahko cepita obe kaspazi in kateri so edinstveni substrati vsake kaspaze. Grafični prikaz prav tako kaže, da lahko večino proteinov cepita obe kaspazi, med tistimi, ki predstavljajo edinstvene substrate, pa večji delež predstavljajo potencialni edinstveni substrati kaspaze-3.

Identificirane potencialne substrate z znano lokalizacijo na plazemski membrani smo nato razdelili še glede na način asociacije z membrano, in sicer na proteine s transmembransko regijo, proteine z lipidiranim sidrom, proteine z lipidiranim sidrom in transmembransko regijo ter takšne za katere natančen način asociacije ni znan (slika 10). Glede na to delitev skoraj polovica identificiranih potencialnih substratov spada med transmembranske proteine in tudi, ko identificirane substrate nadalje razdelimo še glede na to ali gre za substrate obeh kaspaz ali za edinstvene substrate še zmeraj v vseh treh skupinah transmembranski proteini predstavljajo največji delež. Transmembranskim proteinom sledijo takšni z neznanim načinom asociacije, ki predstavljajo približno tretjino vseh identificiranih substratov. V primeru teh proteinov gre najpogosteje za proteine z

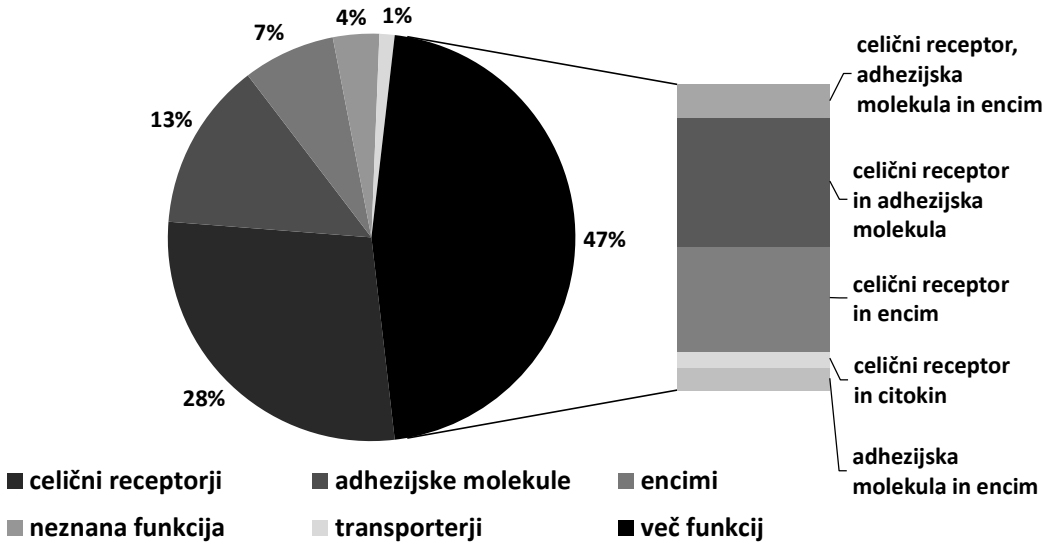
neznano strukturo, ki ne vsebujejo nobenega aminokislinskega zaporedja, ki bi mu glede na podobnost lahko pripisali sposobnost asociacije s plazemsko membrano. Naslednji najpogostejši način asociacije z membrano je prisotnost lipidnega sidra, medtem ko najmanj identificiranih potencialnih substratov vsebuje tako transmembransko regijo kot tudi lipidno sidro (slika 10A). Identificirane potencialne substrate smo združili v skupine glede na njihov način asociacije z membrano in analizirali kakšno je prekrivanje skupin (slika 10B). Glede na prekrivanje skupin ni izrazitega odstopanja, torej rezultati okvirno sledijo trendu, da večino substratov v vsaki skupini cepita obe kaspazi, čemur sledijo edinstveni substrati kaspaze-3 in nato edinstveni substrati kaspaze-7.

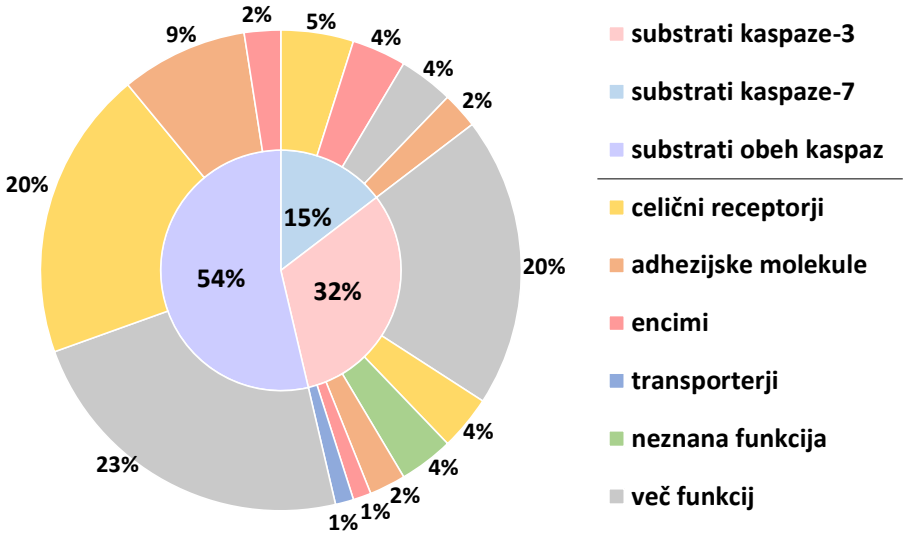


Slika 10: Največ identificiranih potencialnih substratov apoptotskih kaspaz-3 in -7 je usidranih v membrano preko transmembranske regije. A. Tortni diragrami, ki prikazujejo kakšen delež proteinov izmed vseh identificiranih potencialnih substratov prehaja membrano (transmembranska regija), kakšen je vanjo le usidran (lipidno sidro) in za kakšen delež način asociacije še ni znan. Dodatno je prikazana tudi razdelitev, ki upošteva še osnovno delitev identificiranih substratov med edinstvene substrate in substrate obeh kaspaz. B. Vennov diagram, ki prikazuje kako se prekrivajo skupine substratov, ki so združeni glede na njihov način asociacije z membrano.

Glede na različne molekulske funkcije, ki jih opravljajo identificirani potencialni zunajcelični substrati apoptotskih kaspaz-3 in -7, pa rezultati kažejo, da za skoraj polovico substratov ne moremo enolično določiti molekulske funkcije, medtem ko med substrati z enolično funkcijo prevladujejo celični receptorji (slika 11). Poleg celičnih receptorjev več kot 10 % izmed vseh identificiranih potencialnih substratov predstavljajo še adhezijske

molekule. V precej manjši meri pa lahko kaspazi-3 in -7 cepita tudi z membrano asociirane encime in membranske transporterje, medtem ko za 4 % identificiranih substratov njihova molekulska funkcija še ni znana. Med potencialnimi substrati brez enolično določene molekulske funkcije prevladujejo takšni, ki delujejo kot celični receptorji in hkrati sodelujejo pri adheziji celic. Sledijo jim takšni, ki imajo poleg receptorske tudi encimsko funkcijo. Dodatno lahko glede na delitev funkcij med substrati z več molekulskimi funkcijami najdemo tudi celične receptorje, ki lahko delujejo tudi kot citokini. Če identificirane substrate nadalje razdelimo še glede na to ali gre za edinstvene substrate ali za substrate obeh kaspaz, rezultati kažejo, da med edinstvenimi substrati kaspaze-3 in substrati obeh kaspaz prevladujejo proteini brez enolično določene molekulske funkcije, medtem ko kaspaza-7 preferenčno cepi celične receptorje (slika 11).





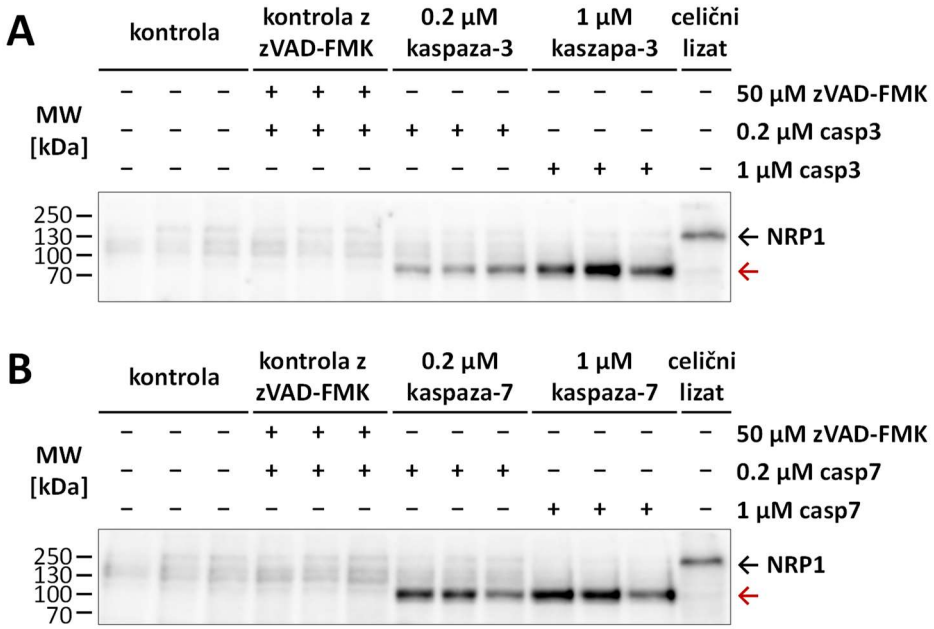
Slika 11: Večini identificiranih potencialnih zunajceličnih substratov apoptotskih kaspaz-3 in -7 ne moremo enolično določiti molekulske funkcije. Med proteini z enolično funkcijo pa kaspazi-3 in -7 najpogosteje cepita celične receptorje in adhezijske molekule.

Za polkvantitativno določitev proteinov, ki so znatno povišani v šedomu celic tretiranih z rekombinantnima kaspazama-3 in -7, smo uporabili metodo spektralnega štetja in tako identificirali potencialne zunajcelične substrate obeh kaspaz ter jih skupaj s številom posnetih spektrov MS/MS v kontrolnih in tretiranih šedomih, identifikacijsko kodo v podatkovni bazi UniProt KB in razmerjem SCR navedli v tabelah 7 in 8 v dodatkih A.1 in A.2. Osredotočili smo se na substrate z znanim načinom asociacije z membrano in z upoštevanjem najvišjih povprečij razmerij SCR pripravili seznam 10-ih izbranih substratov obeh apoptotskih kaspaz (tabela 5). V dodatku A.3 je za vse izbrane substrate predstavljena tudi pokritost njihovega aminokislinskega zaporedja z zaznanimi identifikacijskimi peptidi, ki smo jo pripravili s programsko opremo PeptideVisualizer (Kolarič et al., neobjavljeno, članek v pripravi). Kot je razvidno, gre pri skoraj vseh 10-ih substratih z najvišjim povprečjem SCR za substrate obeh kaspaz. Edina izjema je protein VSIG8, ki smo ga identificirali le kot edinstveno tarčo kaspaze-7 ampak po povprečju SCR se kljub temu uvršča med 10 najboljših substratov. Glede na dobljena razmerja SCR pri ostalih substratih lahko za večino sklepamo, da jih obe kaspazi cepita podobno učinkovito. Večje razlike v razmerjih SCR so prisotne le pri nesprinu 2 (SYNE2), faktorju pospeševanja razpada komplementa (CD55) in integrinu alfa 6 (ITGA6), ki jih najverjetneje precej bolje cepi kaspaza-3, ter pri semaforinu 4B (SEMA4B), ki smo ga glede na SCR identificirali kot boljši substrat kaspaze-7.

Tabela 5: Izbrani identificirani zunajcelični substrati apoptotskih kaspaz-3 in -7. Prikazanih je 10 substratov z najvišjim povprečjem razmerja SCR za obe apoptotski kaspazi. Z modro barvo je označen edinstven substrat kaspaze-7, s sivo pa razmerje SCR, ki ne ustreza pogoju za značilno povišane proteine (SCR ≥ 3).

		Kaspaza-3		**Kaspaza-7**		
Ime proteina	**Ime gena**	**Posneti MS/MS spektri (1 µM casp3)**	**SCR**	**Posneti MS/MS spektri (1 µM casp7)**	**SCR**	**Povprečje SCR**
Protokadherin Fat 1	FAT1	20	21,0	31	32,0	26,5
Receptorska protein-tirozin fosfataza gama	PTPRG	22	23,0	21	22,0	22,5
Nesprin 2	SYNE2	20	21,0	10	11,0	16,0
Neuropilin 1	NRP1	51	10,4	57	11,6	11,0
Receptor za hepatocitni rastni faktor	MET	10	11,0	8	9,0	10,0
Protein 8, ki vsebuje V-set in imunoglobulinsko domeno	VSIG8	0	1,0	17	18,0	9,5
Semaforin 4B	SEMA4B	4	5,0	11	12,0	8,5
Faktor pospeševanja razpada komplementa	CD55	9	10,0	6	7,0	8,5
Integrin alfa 6	ITGA6	10	11,0	4	5,0	8,0
Poglavitni prionski protein	PRNP	7	8,0	5	6,0	7,0

Glede na število detektiranih spektrov MS/MS, lahko med 10-imi identificiranimi potencialnimi substrati kaspaz-3 in -7 kot najverjetneje najboljši substrat obeh kaspaz izpostavimo nevropilin 1 (NRP1). V primeru NRP1 smo namreč v šedomu tretiranih celic v primeru obeh kaspaz zaznali največ identifikacijskih spektrov MS/MS. Prav tako rezultati pokritosti proteina z zaznanimi identifikacijskimi peptidi kaže, da so vsi identifikacijski peptidi del zunajcelične domene NRP1 (dodatek A.3). Posledično smo NRP1 izbrali za nadaljnjo validacijo zunajceličnih cepitev kaspaz-3 in -7. S prenosom western smo v šedomih pripravljenih v treh neodvisnih ponovitvah uspešno zaznali prisotnost zunajceličnega fragmenta NRP1 po tretiranju celic tako z nižjo (0,2 µM) kot višjo (1 µM) koncentracijo rekombinantnih kaspaz-3 (slika 12A) in -7 (slika 12B), pri čemer rezultati kažejo na vsaj delno koncentracijsko odvisnost procesa, saj tretiranje z nižjo koncentracijo obeh kaspaz privede do zaznavno šibkejše zaznave fragmenta zunajcelične domene. Velikost dobljenega cepljenega fragmenta zunajcelične domene se sklada z okvirno velikostjo zunajcelične domene in tudi z bioinformatsko napovedjo najverjetnejših cepitvenih mest s programom Procleave (dodatek A.4).

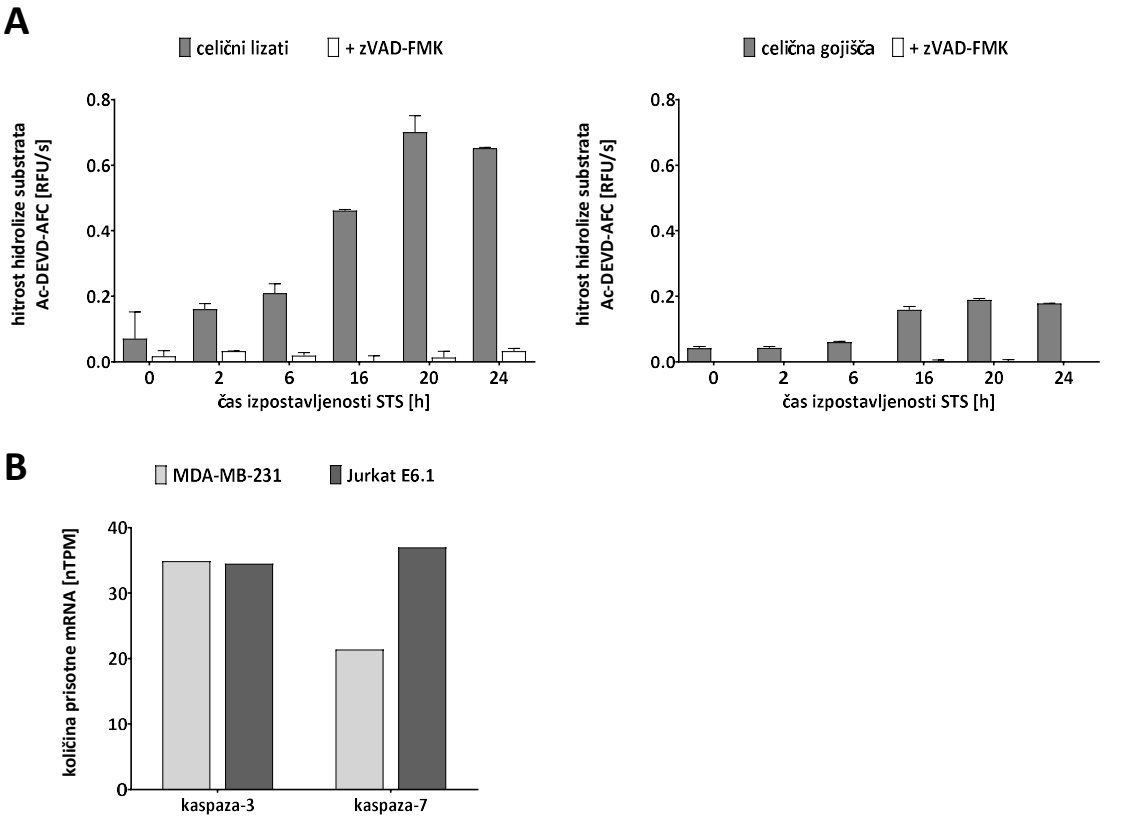


Slika 12: Rekombinantni kaspazi-3 in -7 cepita zunajcelično domeno nevropilina 1. Prikazani so rezultati treh neodvisnih poskusov. Rdeča puščica označuje fragment cepljene zunajcelične domene NRP1. A. V šedomih tretiranih celic MDA-MB-231 lahko zaznamo cepljen NRP1, ki je znatno manjši od celotnega NRP1, ki je prisoten v totalnem celičnem lizatu. B. Kaspaza-7 prav tako cepi zunajcelično domeno NRP1 in po tretiranju lahko zaznamo fragment podobne velikosti kot v primeru uporabe kaspaze-3.

4.1.2 Apoptotski kaspazi-3 in -7 sta zaznavni v celičnem gojišču apoptotičnih celic

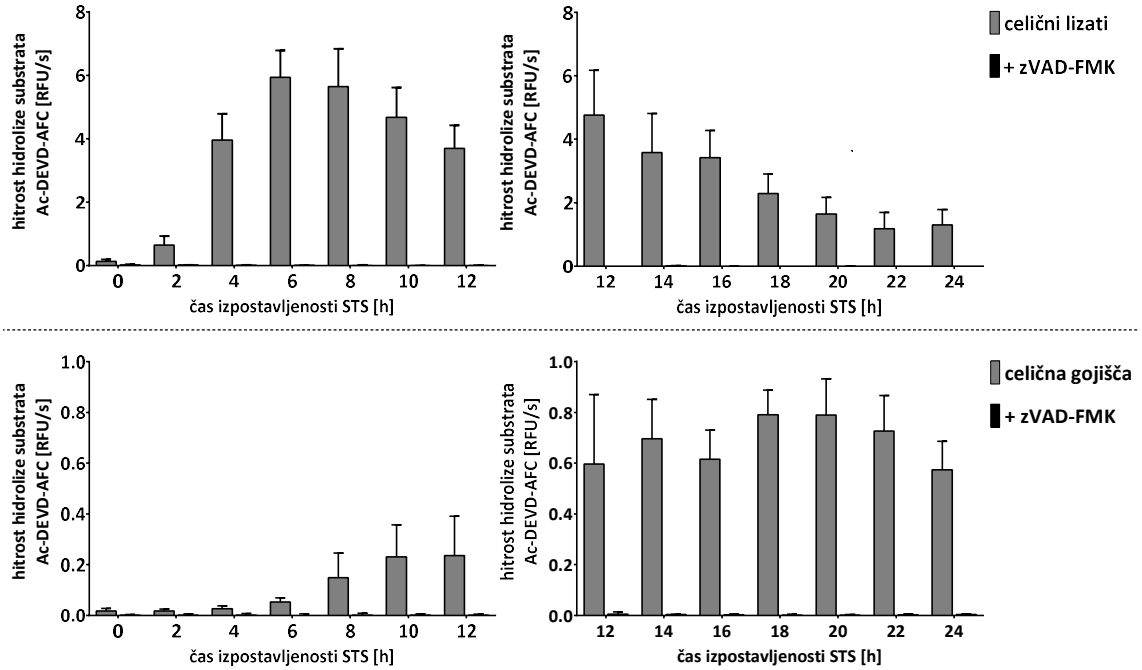
Identifikacija potencialnih zunajceličnih membransko-usidranih substratov apoptotskih kaspaz-3 in -7 ter nadaljnja validacija z imunodetekcijo kažeta, da sta obe kaspazi sposobni zunajceličnih cepitev membransko-usidranih proteinov. Zato smo v naslednjem koraku preverili ali v celičnem gojišču apoptotičnih celic lahko zaznamo encimsko aktivnost kaspaz-3 in -7. V ta namen smo celice celične linije MDA-MB-231 tretirali s sprožilcem apoptoze STS in ob različnih časovnih točkah merili kaspazno aktivnost ali v celičnih lizatih

ali v celičnih gojiščih z detekcijo cepitve fluorogenega substrata Ac-DEVD-AFC. Rezultati kažejo, da lahko kaspazno aktivnost zaznamo tako v celičnih lizatih kot v celičnih gojiščih celic MDA-MB-231 (slika 13A), vendar je le-ta zelo nizka, kar je lahko povezano tudi z nivojem izražanja obeh kaspaz v teh celicah (slika 13B). Glede na podatke pridobljene iz baze podatkov »The Human Protein Atlas« [260] lahko opazimo tudi, da je količina zaznane mRNA za kaspazo-7 v celicah MDA-MB-231 znatno nižja od količine zaznane mRNA za kaspazo-3, kar nakazuje na neenakomerno izražanje obeh kaspaz v teh celicah. Posledično smo za nadaljnje raziskave zunajcelične prisotnosti apoptotskih kaspaz-3 in -7 uporabili celice celične linije Jurkat E6-1, v katerih naj bi bil nivo izražanja obeh kaspaz primerljiv (slika 13B).



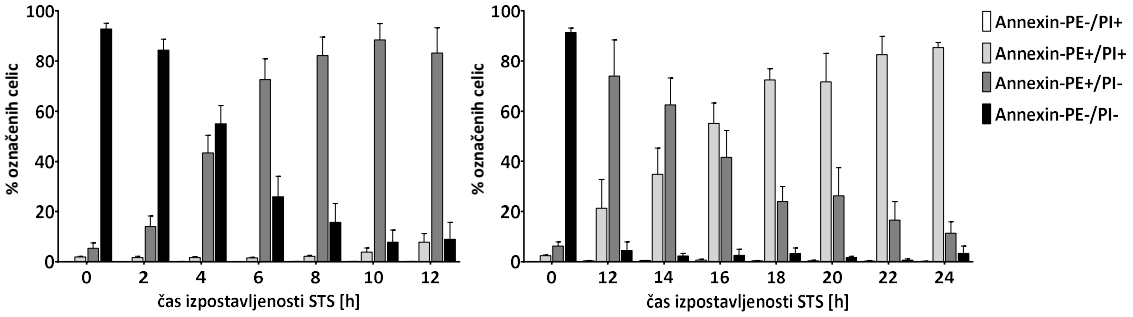
Slika 13: Apoptotične celice MDA-MB-231 imajo zaznavno kaspazno aktivnost tako v celičnih lizatih kot v celičnih gojiščih, kljub različnemu nivoju izražanja obeh apoptotskih kaspaz. A. Apoptoza privede do zaznavne kaspazne aktivnosti predvsem pri daljših časih izpostavljenosti sprožilcu apoptoze STS. B. Primerjava nivoja izražanja obeh kaspaz v celicah celičnih linij MDA-MB-231 in Jurkat E6-1 glede na podatke iz baze podatkov »The Human Protein Atlas«. *nTPM = normalizirano število transkriptov na milijon*

Celice celične linije Jurkat E6-1 smo prav tako tretirali z sprožilcem apoptoze STS in detektirali kaspazno aktivnost v celičnih lizatih in gojiščih. Hidrolizo substrata Ac-DEVD-AFC smo zaznali tako v celičnih lizatih kot tudi v celičnih gojiščih (slika 14). Znotrajcelična kaspazna aktivnost v celičnih lizatih hitro naraste v začetnih 6-ih urah po dodatku STS in nato začne upadati, medtem ko je zunajcelična aktivnost v celičnih gojiščih sprva nezaznavna in začne naraščati šele 8 ur po dodatku STS ter nato narašča do 20-ih ur po dodatku STS. Zunajcelično kaspazno aktivnost lahko torej najmočneje zaznamo pri daljši izpostavljenosti celic sprožilcu STS in tudi pri teh časovnih točkah je zaznana aktivnost še zmeraj znatno nižja od znotrajcelične aktivnosti, ki jo zaznamo v celičnih lizatih.



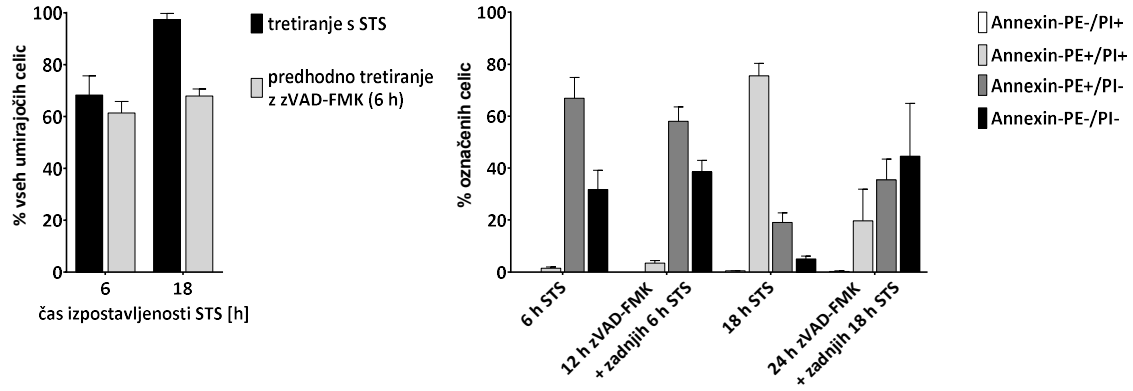
Slika 14: Kaspazna aktivnost je zaznavna tako znotraj kot zunajcelično ob različnih časih izpostavljenosti celic celične linije Jurkat E6-1 sprožilcu apoptoze STS. Dodatek pankaspaznega inhibitorja zVAD-FMK povem izniči zaznano aktivnost tako v celičnih lizatih kot v celičnih gojiščih.

Glede na rezultate detekcije kaspazne aktivnosti smo nato preverili kdaj med potekom apoptoze postane kaspazna aktivnost zaznavna tudi izven celic. Potek apoptoze smo spremljali z označevanjem celic z barvilom PI in rekombinantnim proteinom Annexin V-PE in tako za vsako časovno točko izpostavljenosti STS s pretočno citometrijo določili katere populacije celic so prisotne (slika 15). Korelacija med rezultati detekcije kaspazne aktivnosti in pretočne citometrije kaže, da postane kaspazna aktivnost zaznavna v celičnih gojiščih šele, ko celice napredujejo iz zgodnje v pozno apoptozo oziroma nadalje v sekundarno nekrozo. Pri daljših časih izpostavljenosti STS, torej med 12 in 24 h, namreč narašča odstotek celic, ki so označene tako s PI kot z Annexin V-PE, torej je pri teh celicah že prišlo izgube integritete celične membrane. V zgodnji apoptozi, ko se na celice veže le konjugiran rekombinantni protein Annexin V-PE, pa znotrajcelična kaspazna aktivnost doseže maksimalno vrednost po 6 h izpostavljenosti STS, medtem ko je največji odstotek celic pozitiven na označevanje z Annexin V-PE po 10 h izpostavljenosti. Zunajcelična kaspazna aktivnost je v zgodnji apoptozi praktično nezaznavna.



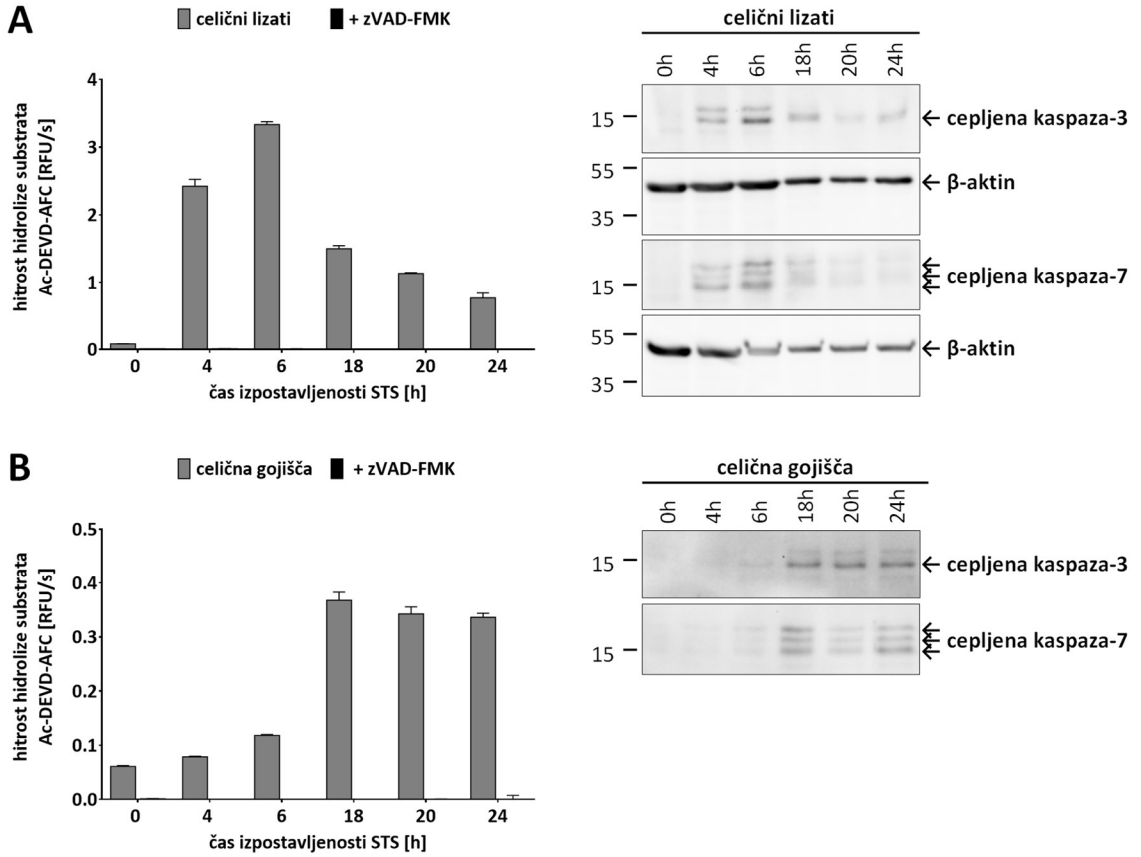
Slika 15: Spremljanje poteka apoptoze v celicah Jurkat E6-1 po dodatku sprožilca STS. Celice smo označili z barvilom PI in s konjugiranim rekombinantnim proteinom Annexin V-PE, pri čemer so neobarvane celice (Annexin V-PE–/PI–) predstavljale žive celice. Celice obarvane le z Annexin V-PE (Annexin V-PE+/PI–) so predstavljale zgodnje apoptotične celice, medtem ko smo celice obarvane z obema označevalcema (Annexin V-PE+/PI+) obravnavali kot pozno apoptotične oziroma sekundarno nekrotične. Zanemarljiv odstotek celic je bil označen le z barvilom PI (Annexin V-PE–/PI+) in le-te so predstavljale nekrotične celice.

Preverili smo tudi kako dodatek pankaspaznega inhibitorja zVAD-FMK vpliva na potek apoptoze sprožene s STS v celicah Jurkat E6-1. V ta namen smo celicam 6 h pred dodatkom STS dodali inhibitor zVAD-FMK in ponovno spremljali obarvanje celic z barvilom PI in konjugiranim rekombinantnim proteinom Annexin V-PE (slika 16). Kot je razvidno, predhodno tretiranje celic z inhibitorjem zVAD-FMK ni povsem preprečilo apoptoze, je pa precej upočasnilo njen potek, saj smo v primeru predhodnega dodatka zVAD-FMK tako po 6-ih kot po 18-ih urah izpostavljenosti STS zaznali približno enako število vseh umirajočih celic. Predhodno tretiranje celic z zVAD-FMK pa je precej zmanjšalo odstotek sekundarno nekrotičnih celic pri daljši izpostavljenosti STS, saj smo ob predhodnem tretiranju z zVAD-FMK in kasnejši 18-urni izpostavljenosti STS zaznali le 20 % sekundarno nekrotičnih celic, medtem ko je bilo takšnih celic ob 18-urni izpostavljenosti samo STS kar 80 %.



Slika 16: Predhodno tretiranje celic Jurkat E6-1 z inhibitorjem zVAD-FMK ne prepreči apoptoze ampak zgolj upočasni njen potek. Kot vse umirajoče celice smo obravnavali celice, ki so bile obarvane vsaj z enim (Annexin V-PE+/PI– ali Annexin V-PE–/PI+) ali z obema (Annexin V-PE+/PI+) uporabljenima označevalcema. Predhodno tretiranje z zVAD-FMK nima signifikantnega vpliva na potek zgodnje apoptoze sprožene s 6-urno izpostavljenostjo STS.

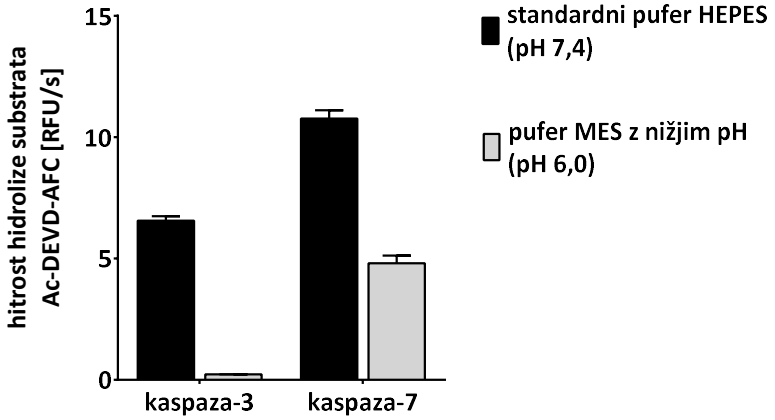
Glede na rezultate spremljanja poteka apoptoze in detekcije zunajcelične in znotrajcelične kaspazne aktivnosti smo v naslednjem koraku preverili ali lahko z imunodetekcijo s prenosom western zaznamo aktivni apoptotski kaspazi-3 in -7 v celičnih gojiščih in lizatih zgodnje apoptotičnih ter pozno apoptotičnih oziroma sekundarno nekrotičnih celic. Posledično smo pripravili celične lizate in gojišča celic, ki smo jih izpostavili STS za največ 6 h in takšnih, ki so bile izpostavljene STS za več kot 18 h. Dobljeni rezultati kažejo, da lahko pri krajši izpostavljenosti STS zaznamo cepljeni kaspazi-3 in -7, ki predstavljata aktivni kaspazi, le v celičnih lizatih, kar se sklada tudi z zaznano kaspazno aktivnostjo (slika 17A). Ravno obratno pa sta obe cepljeni kaspazi praktično nezaznavni v celičnih gojiščih celic, ki so bile izpostavljene STS za največ 6 h, medtem ko v gojišču celic, ki so bile izpostavljene STS za več kot 18 h in predstavljajo sekundarno nekrotične celice lahko zaznamo tako kaspazno aktivnost kot tudi prisotnost obeh cepljenih kaspaz (slika 17B).



Slika 17: Aktivni apoptotski kaspazi-3 in -7 sta prisotni v celičnih gojiščih sekundarno nekrotičnih celic. A. Detekcija kaspazne aktivnosti v celičnih lizatih celic Jurkat E6-1 in nadaljnja imunodetekcija kaspaz-3 in -7. Kot kontrolo nanosa celičnih lizatov smo uporabili β-aktin in primerjali nanose znotraj krajših (0, 4 in 6 h) in daljših (18, 20 in 14 h) časov izpostavljenosti. B. Rezultati detekcije zunajcelične kaspazne aktivnosti v celičnih gojiščih apoptotičnih celic in imunodetekcije aktivnih kaspaz-3 in -7 ob enakih časih izpostavljenosti STS. Cepljeni kaspazi, ki predstavljata aktivni kaspazi, lahko zaznamo le pri daljših časih izpostavljenosti STS.

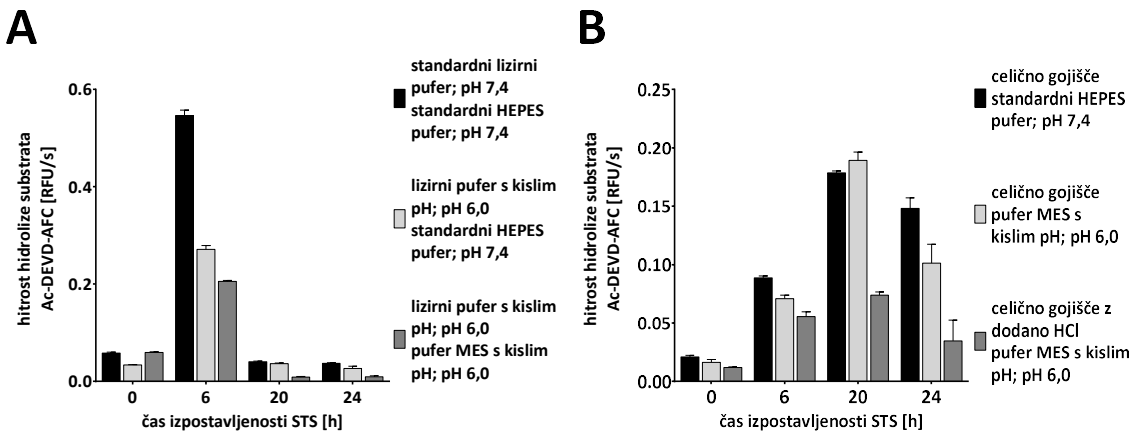
4.1.3 Kaspazna aktivnost je prisotna tudi v okolju s kislim pH

Glede na to, da smo za identifikacijo potencialnih zunajceličnih substratov apoptotskih kaspaz uporabili rakavo celično linijo, smo preverili tudi, kako okolje s kislim pH vpliva na aktivnost kaspaz, saj ima mikrookolje tumorja pogosto nekoliko nižji pH [261]. Najprej smo preverili kako nižji pH vpliva na aktivnost rekombinantnih človeških kaspaz -3 in -7 tako, da smo pomerili encimsko aktivnost obeh kaspaz v standardnem pufru HEPES za detekcijo kaspazne aktivnosti in v pufru MES s pH 6,0. Dobljeni rezultati kažejo, da lahko encimsko aktivnost kaspaze-7 zaznamo tudi v okolju s kislim pH, medtem ko kaspaza-3 v takšnem okolju izgubi praktično vso aktivnost (slika 18).



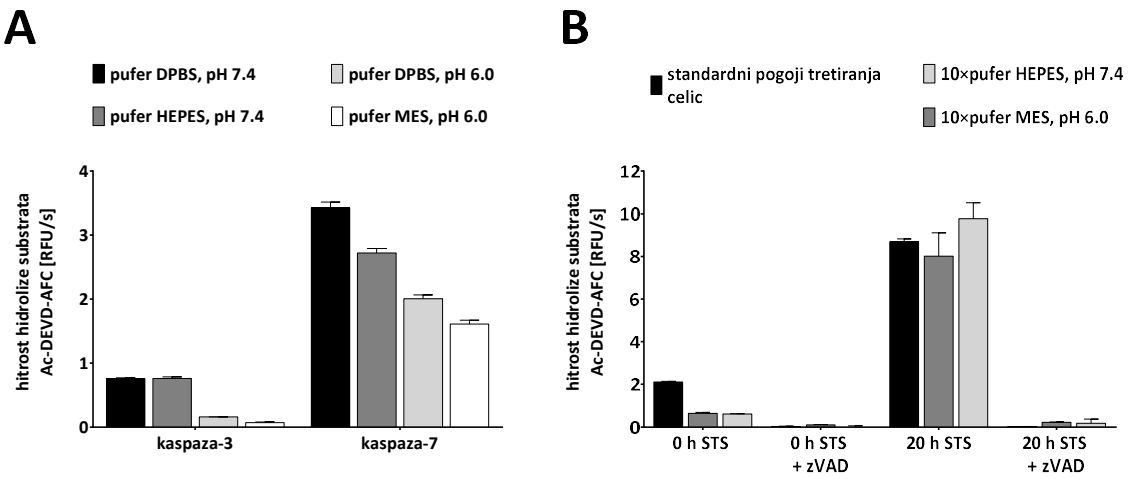
Slika 18: Apoptotska kaspaza-7 ohrani del encimske aktivnosti tudi v okolju s kislim pH. Za izvedbo meritev smo uporabili rekombinantni človeški kaspazi-3 in -7 s končno koncentracijo 10 nM. Rezultati kažejo, da je kaspaza-3 precej bolj občutljiva na okolje s kislim pH.

V naslednjem koraku smo preverili tudi kako kisel pH vpliva na znotrajcelično in zunajcelično kaspazno aktivnost v celičnih lizatih in celičnih gojiščih apoptotičnih celic Jurkat E6-1 (slika 11). S tem namenom smo celične lizate pripravili z uporabo standardnega lizirnega pufra in lizirnega pufra z nižjim pH, medtem ko smo delu celičnih gojišč znižali pH z dodatkom koncentrirane HCl. Encimsko aktivnost smo nato pomerili tako z uporabo standardnega pufra za detekcijo kot tudi pufra za detekcijo z nižjim pH. Glede na zaznano kaspazno aktivnost lahko rečemo, da je znotrajcelična kaspazna aktivnost prisotna v celičnih lizatih apoptotičnih celic precej bolj občutljiva na prisotnost kislega pH, saj smo že zgolj v primeru uporabe lizirnega pufra s kislim pH zaznali precejšen upad znotrajcelične kaspazne aktivnosti, ki je nato še bolj upadla, če smo uporabili tudi pufer MES za detekcijo kaspazne aktivnosti s kislim pH (slika 19A). Ravno nasprotno smo tudi ob uporabi pufra MES za detekcijo kaspazne aktivnosti s kislim pH v celičnih gojiščih zaznali primerljivo kaspazno aktivnost kot v primeru uporabe standardnega pufra za detekcijo, kar nakazuje na nekoliko manjšo občutljivost zunajcelične kaspazne aktivnosti na prisotnost kislega pH. Znatni upad zunajcelične kaspazne aktivnosti smo zaznali le, če smo celičnim gojiščem predhodno znižali pH do pH 6,0 z dodatkom koncentrirane HCl (slika 19B).



Slika 19: Zunajcelična kaspazna aktivnost v celičnih gojiščih apoptotičnih celic Jurkat E6-1 je zaznavna tudi v okolju s kislim pH. A. Detektirana encimska aktivnost apoptotskih kaspaz v celičnih lizatih celic Jurkat E6-1 po sprožitvi apoptoze z dodatkom STS. Aktivnost apoptotskih kaspaz v celičnih lizatih je znatno nižja v okolju s kislim pH (pH 6,0). B. Aktivnost apoptotskih kaspaz v celičnih gojiščih celic Jurkat E6-1 tretiranih s sprožilcem apoptoze STS. Kisel pH precej manj vpliva na aktivnost kaspaz v celičnih gojiščih, saj se zaznana aktivnost ohrani tudi ob uporabi pufra MES s kislim pH.

Vpliv pH na encimsko aktivnost kaspaz smo preverili tudi v primeru uporabe standardnih pogojev tretiranja, ki smo jih uporabili za tretiranje celic MDA-MB-231 in nadaljnjo identifikacijo potencialnih zunajceličnih substratov apoptotskih kaspaz. Vsi pufri, za razliko od standardnega pufra za detekcijo kaspazne aktivnosti in pufra za detekcijo kaspazne aktivnosti z nižjim pH niso vsebovali detergenta CHAPS, ki stabilizira aktivnost kaspaz [42]. Pufrom smo namesto tega dodali inhibitorje preostalih skupin proteaz, in sicer PMSF, ki inhibira serinske proteaze, EDTA, ki inhibira metaloproteaze, ter E-64, ki inhibira cisteinske katepsine. Dodatno smo preverjali tudi vpliv osrednje puferske komponente, in sicer smo primerjali razliko med aktivnostjo kaspaz v primeru uporabe pufra DPBS in pufrov HEPES ter MES. Pod temi pogoji smo najprej pomerili vpliv na aktivnost rekombinantnih kaspaz-3 in -7 in potrdili trend, da kaspaza-7 ohrani večji delež aktivnosti v pufrih s kislim pH kot kaspaza-3, pri čemer značilnega vpliva osrednje puferske komponente nismo zaznali (slika 20A). V naslednjem koraku pa smo pod temi pogoji merili kaspazno aktivnost v koncentriranih celičnih gojiščih celic Jurkat E6-1, ki niso bile izpostavljene sprožilcu apoptoze STS in takšnim, ki so bile sprožilcu izpostavljene 20 h (slika 20B). Zaradi višje puferske kapacitete pufrov HEPES in MES, smo za detekcijo kaspazne aktivnosti v koncentriranih gojiščih uporabili le 10-kratna omenjena pufra ne pa tudi pufrov DPBS s fiziološkim in kislim pH. Dobljeni rezultati so ponovno pokazali, da se tudi ob uporabi pufra s kislim pH ohrani večina kaspazne aktivnosti, ki je zaznavna v celičnih gojiščih apoptotičnih celic Jurkat E6-1. Pred detekcijo kaspazne aktivnosti in po dodatku koncentriranih pufrov HEPES in MES smo tudi preverili ali smo z dodatkom ustrezno spremenili pH samih gojišč in ugotovili, da smo s koncentriranim pufrom MES uspešno znižali pH koncentriraniih gojišč, medtem ko dodatek koncentriranega pufra HEPES pričakovano ni znatno vplival na pH koncentriranih gojišč (dodatek A.5).



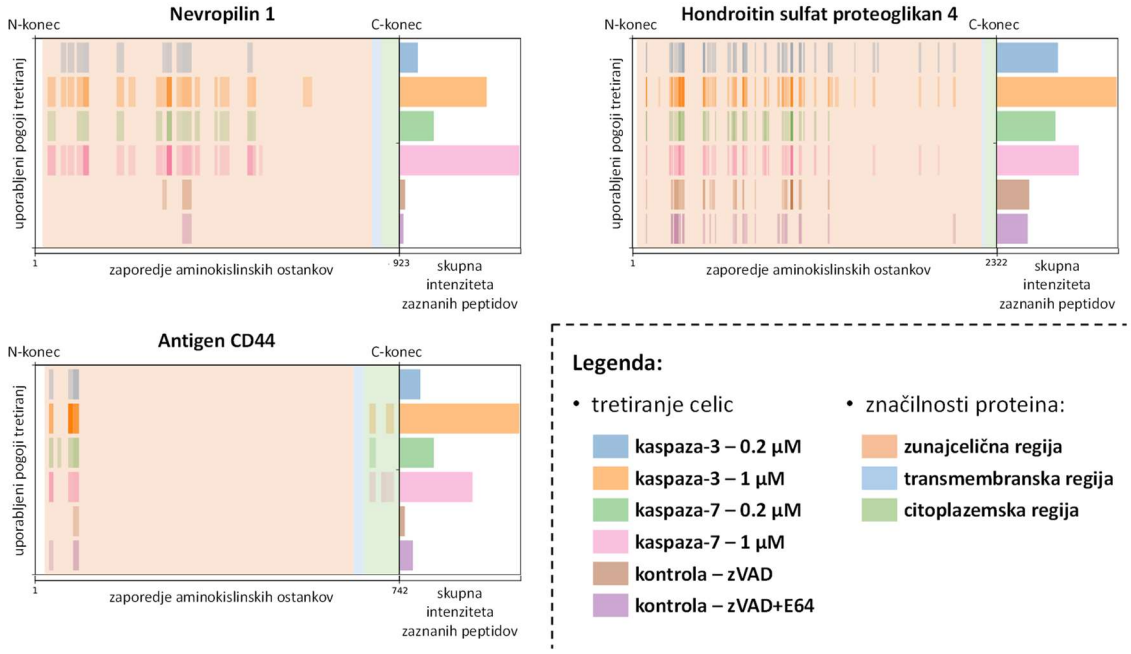
Slika 20: Ob uporabi standardnih pogojev tretiranja celic MDA-MB-231 lahko še vedno zaznamo kaspazno aktivnost tudi v okolju s kislim pH. A. Encimska aktivnost rekombinantnih človeških kaspaz-3 in -7 v pufrih s fiziološkim (pH 7,4) in kislim pH (pH 6,0) ter različnimi osrednjimi puferskimi komponentami (DPBS, HEPES in MES). B. Kaspazna aktivnost pri fiziološkem in kislem pH v koncentriranih celičnih gojiščih celic Jurkat E6-1, v katerih nismo sprožali apoptoze (0 h STS) in takšnih, ki so že prešle v pozno apoptozo oziroma naprej v sekundarno nekrozo (20 h STS).

Poleg vpliva pH na encimsko aktivnost kaspaz smo preverili tudi kakšen je vpliv na zaznavanje potencialnih zunajceličnih cepitev membransko-usidranih proteinov. Za detekcijo smo izbrali NRP1 kot enega najboljših substratov obeh kaspaz glede na rezultate identifikacije z masno spektrometrijo, hondroitin sulfat proteoglikan 4 (CSPG4) kot substrat, ki ga glede na SCR potencialno cepi le kaspaza-3, in antigen CD44 (CD44), ki sicer z masno spektrometrijo ni bil zaznan z značilno povišano koncentracijo (SCR < 3) v šedomih celic tretiranih z rekombinantnima kaspazama, ampak vseeno predstavlja pogosto tarčo drugih zunajcelično prisotnih proteaz predvsem v mikrookolju tumorja [77, 210]. Razmerja SCR za vse tri izbrane substrate so predstavljena v tabeli 6, pokritost njihovih aminokislinskih zaporedij z identifikacijskimi peptidi pa na sliki 21. Za vse tri izbrane substrate smo tudi bioinformatsko napovedali cepitvena mesta (dodatek A.4), pri čemer smo rezultate napovedi nato primerjali z nadaljnjo imunodetekcijo (slika 22).

Tabela 6: Razmerja spektralnega štetja za izbrane membransko-usidrane proteine. Za identifikacijo z masno spektrometrijo smo uporabili šedome pripravljene s tretiranjem celic MDA-MB-231 z rekombinantnima kaspazama-3 in -7, pri čemer smo za tretiranje uporabili pufer DPBS s fiziološkim pH (pH 7,4).

		Kaspaza-3	Kaspaza-7
Ime proteina	**Ime gena**	**SCR**	**SCR**
Neuropilin-1	NRP1	10,4	11,6
Hondroitin sulfat proteoglikan 4	CSPG4	3,0	2,3
Antigen CD44	CD44	2,7	2,7

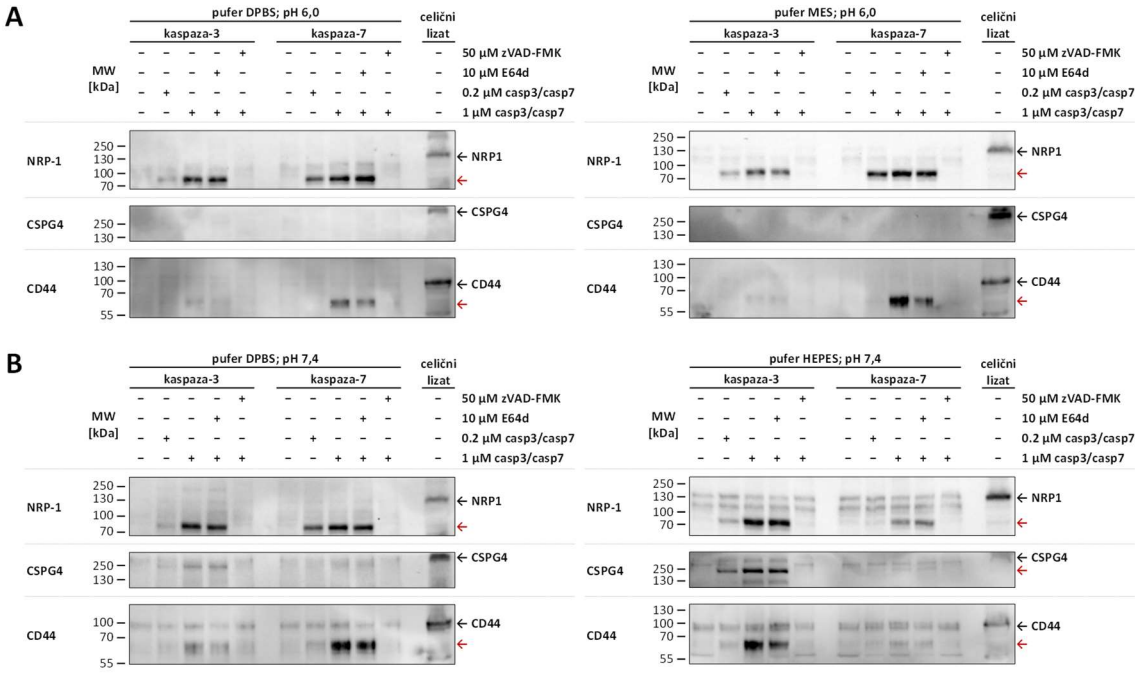
Glede na pokritost aminokislinskih zaporedij, lahko opazimo, da smo v primeru CD44 zaznali tudi identifikacijske peptide, ki pokrivajo citoplazemsko regijo, kar zmanjša signifikantnost njegove identifikacije. Prav tako vsi zunajcelični identifikacijski peptidi pokrivajo le aminokislinsko zaporedje na skrajnem N-koncu proteina, kar nakazuje, da gre v primeru CD44 najverjetneje le za obrezovanje zunajcelične domene in ne za odcep večjega dela domene. V primeru CSPG4 pa smo precej identifikacijskih peptidov zaznali tudi v kontrolnih vzorcih, torej ne moremo trditi, da sta apoptotski kaspazi-3 in -7 odgovorni za cepitve zunajcelične domene CSPG4.



Slika 21: Pokritost aminokislinskih zaporedij treh izbranih membransko-usidranih proteinov z zaznanimi identifikacijskimi peptidi. Vsi trije izbrani proteini so transmembranski proteini in na peptografih so ustrezno označene zunajcelična, transmembranska in citoplazemska regija.

Detekcijo izbranih membransko-usidranih proteinov pri različnih pogojih smo izvedli tako, da smo celice MDA-MB-231 tretirali z rekombinantnima kaspazama-3 in -7 in pri tem uporabili pufra DPBS in MES s kislim pH (pH 6,0) (slika 22A) ter pufra DPBS in HEPES s fiziološkim pH (pH 7,4) (slika 22B). Pripravljene šedome smo v naslednjem koraku uporabili za imunodetekcijo potencialnih zunajceličnih cepitev membransko-usidranih proteinov NRP1, CSPG4 in CD44. Z imunodetekcijo smo pokazali, da apoptotski kaspazi-3 in -7 med izbranimi proteini res najbolje cepita NRP1, saj smo prisotnost cepljenega fragmenta zunajcelične domene zaznali tako v primeru uporabe obeh pufrov s kislim pH kot ob uporabi obeh pufrov s fiziološkim pH. Ravno nasprotno, pa smo ugotovili, da so cepitve zunajceličnih domen CD44 in CSPG4 s strani apoptotskih kaspaz precej bolj odvisne od uporabljenih pogojev za tretiranje celic. Cepitev zunajcelične domene CSPG4 smo v skladu z rezultati identifikacije potencialnih substratov z MS zaznali le v primeru tretiranja celic z apoptotsko kaspazo-3 in to v obeh pufrih s fiziološkim pH (pH 7,4). Pri tem smo precej močnejšo liso, ki predstavlja cepljen fragment zunajcelične domene, zaznali v primeru uporabe pufra HEPES, kar nakazuje, da je cepitev zunajcelične domene CSPG4 s strani apoptotske kaspaze-3 odvisna ne samo od pH okolja ampak tudi od osnovne puferske komponente. V primeru CD44 smo ugotovili, da lahko v primeru obeh apoptotskih

kaspaz zaznamo cepitev njegove zunajcelične domene, čeprav ga z MS nismo identificirali kot potencialni substrat apoptotskih kaspaz-3 in -7. Dodatno smo z imunodetekcijo ugotovili, da je zaznavnost cepljenega fragmenta zunajcelične domene odvisna tako od pH okolja kot tudi od osnovne puferske komponente. Prisotnost cepljenega fragmenta smo sicer uspešno zaznali v vseh uporabljenih pogojih, vendar v primeru uporabe obeh pufrov s kislim pH le po tretiranju celic s kaspazo-7, medtem ko smo v primeru uporabe pufrov s fiziološkim pH ugotovili, da je cepljen fragment v pufru HEPES bolj zaznaven po tretiranju celic s kaspazo-3 v pufru DPBS pa ravno nasprotno po tretiranju s kaspazo-7. Prav tako smo cepitve zaznali le v primeru tretiranja z višjo koncentracijo (1 µM) obeh apoptotskih kaspaz, kar nakazuje, da CD44 najverjetneje v fizioloških pogojih res ni med najboljšimi zunajcelčnimi substrati apoptotskih kaspaz-3 in -7. V vseh primerih smo dodatno del celic predhodno tretirali še z znotrajceličnim inhibitorjem cisteinskih katepsinov E64d in tako povsem preprečili morebitne cepitve s cisteinskimi katepsini. Glede na to, da smo vse cepitve zaznali v prisotnosti tako E64d kot E-64, ki je komponenta standardnih pogojev uporabljenih za tretiranje celic MDA-MB-231, gre res za cepitve z apoptotskimi kaspazami in ne za potencialne cepitve z endogeno prisotnimi cisteinskimi katepsini.

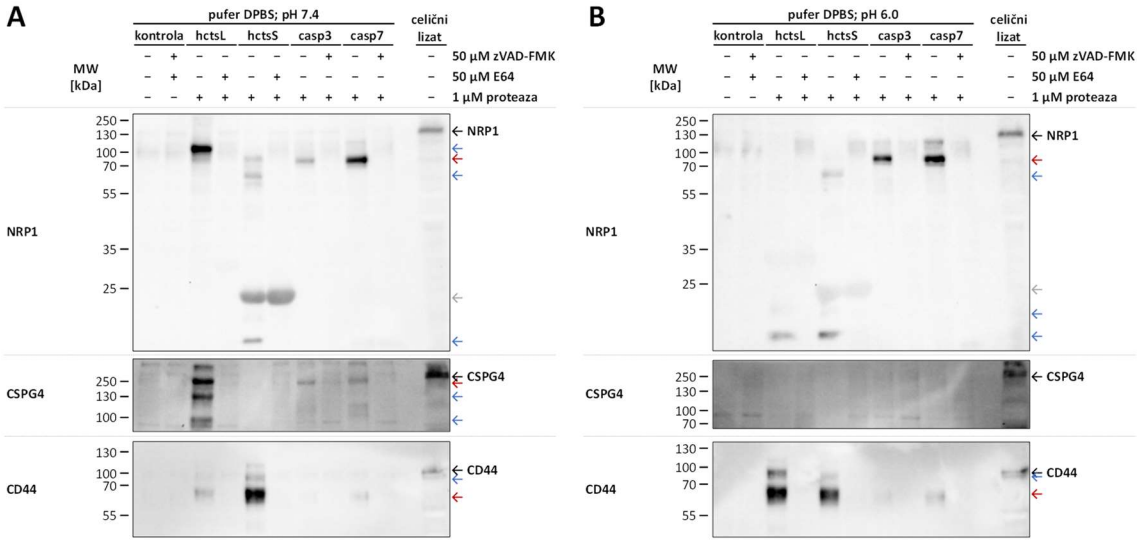


Slika 22: Kaspazi-3 in -7 lahko cepita zunajcelične domene transmembranskih proteinov NRP1, CSPG4 in CD44 v različnih pogojih. Rdeča puščica označuje zaznan fragment cepljene zunajcelične domene izbranih proteinov. A. Imunodetekcija cepljenih fragmentov zunajceličnih domen izbranih proteinov v primeru uporabe pufrov DPBS in MES s kislim pH (pH 6,0). B. Zaznani cepljeni fragmenti zunajceličnih domen NRP1, CSPG4 in CD44 v primeru tretiranja celic s pufroma DPBS in HEPES s fiziološkim pH (pH 7,4).

4.1.4 Zunajcelične cepitve s kaspazama-3 in -7 se razlikujejo od cepitev s cisteinskima katepsinoma L in S

S primerjavo identificiranih substratov apoptotskih kaspaz s substrati, ki jih v zunajceličnem prostoru lahko cepita cisteinska katepsina L in S [77] smo ugotovili, da je nabor potencialnih substratov za obojne cisteinske proteaze precej podoben. Posledično smo preverili ali v primeru tretiranja celic MDA-MB-231 z apoptotskima kaspazama-3 in

-7 zaznamo drugačne fragmente cepljenih zunajceličnih domen transmembranskih proteinov NRP1, CSPG4 in CD44 kot v primeru tretiranja celic s cisteinskima katepsinoma L in S. Celice MDA-MB-231 smo tretirali z višjo koncentracijo izbranih encimov, in sicer v enem primeru z uporabo pufra DPBS s fiziološkim pH (slika 23A), ki naj bi bolj ustrezal encimski aktivnosti apoptotskih kaspaz, v drugem primeru pa z uporabo pufra DPBS s kislim pH (slika 23B), ki naj bi bil bolj optimalen za delovanje cisteinskih katepsinov. Rezultati imunodetekcije fragmentov cepljenih zunajceličnih domen kažejo, da kaspaze zunajcelično domeno najverjetneje cepijo le enkrat, saj smo v vseh primerih zaznali le en fragment cepljene zunajcelične domene izbranih transmembranskih proteinov, medtem ko cisteinska katepsina povzročita nastanek več fragmentov, kar nakazuje na nadaljnjo razgradnjo zunajceličnih domen z obema katepsinoma. Prav tako rezultati kažejo, da obe apoptotski kaspazi cepita zunajcelične domene na drugih mestih kot oba cisteinska katepsina, saj smo v šedomih zaznali več fragmentov, ki so specifični za posamezno proteazo. Če nadalje primerjamo cepitve izbranih transmembranskih proteinov, lahko največjo podobnost pri cepitvah opazimo v primeru CD44, saj vse uporabljene proteaze povzročijo nastanek fragmenta približno enake velikosti, medtem ko se vzorci fragmentov cepljenih zunajceličnih domen NRP1 in CSPG4, ki jih zaznamo po tretiranju z vsako izmed preiskovanih proteaz, precej manj prekrivajo. V primeru CSPG4 opazimo tudi, da ga vse preiskovane proteaze lahko cepijo le v okolju s fiziološkim pH, saj v primeru uporabe pufra DPBS s kislim pH (pH 6,0) nismo zaznali nobenih fragmentov, ki so posledica cepitve njegove zunajcelične domene.

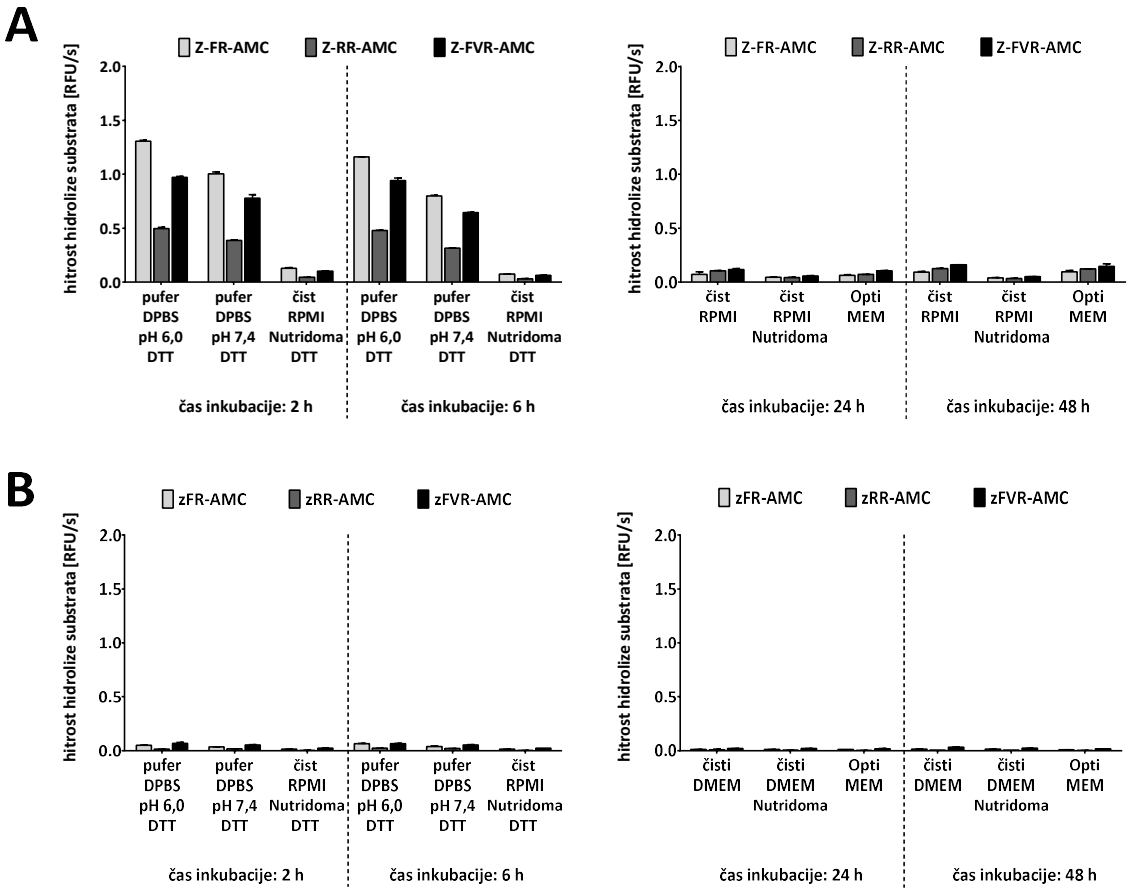


Slika 23: Apoptotski kaspazi-3 in -7 cepita zunajcelične domene NRP1, CSPG4 in CD44 na različnih mestih v primerjavi s cisteinskima katepsinoma L in S. Z rdečimi puščicami so označeni fragmenti zunajcelične domene, ki jih lahko zaznamo po tretiranju z apoptotskima kaspazama-3 in -7, medtem ko modra puščica označuje fragmente, ki so prisotni le v šedomih celic MDA-MB-231 tretiranih s cisteinskima katepsinoma L ali S. Siva puščica označuje rekombinantni človeški katepsin S, ki ga nespecifično spoznajo protitelesa proti človeškemu NRP1. A. Imunodetekcija cepitev zunajceličnih domen NRP1, CSPG4 in CD44 ob uporabi pufra DPBS s fiziološkim pH (pH 7,4) za tretiranje celic z apoptotskima kaspazama-3 in -7 in cisteinskima katepsinoma L in S. B. Zaznani fragmenti zunajceličnih domen NRP1, CSPG4 in CD44 ob uporabi pufra DPBS s kislim pH (pH 6,0) za izvedbo tretiranja celic z izbranimi proteazami.

4.2 Zunajcelične vloge cisteinskih katepsinov

4.2.1 Imunske in rakave celice sproščajo cisteinske katepsine v zunajcelični prostor

Poleg vloge kaspaz v zunajceličnem prostoru, smo raziskovali tudi vlogo cisteinskih katepsinov. Izločanje cisteinskih katepsinov v zunajcelični prostor namreč spremlja več tako fizioloških kot patoloških procesov, pri čemer prevladujejo z vnetjem povezane bolezni, kot na primer rakava obolenja [62].

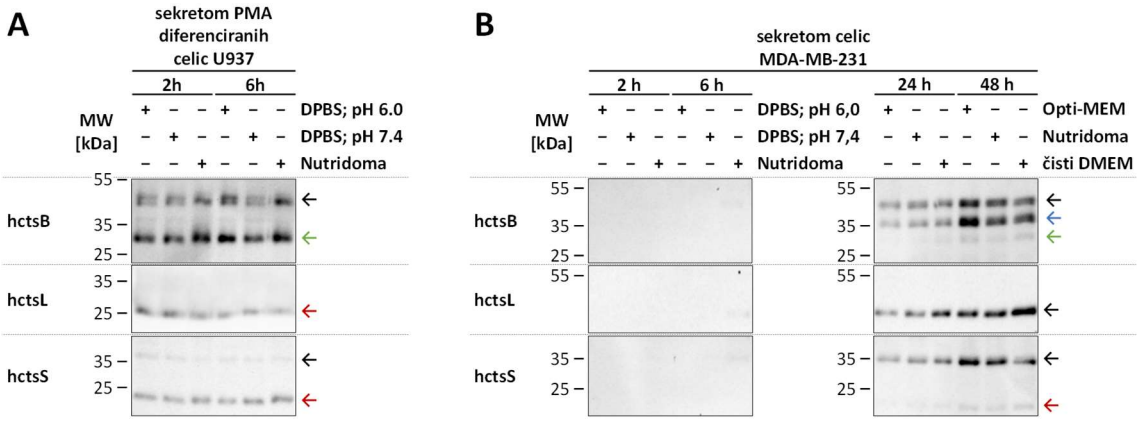


Slika 24: Encimsko aktivnost cisteinskih katepsinov lahko zaznamo v sekretomih človeških makrofagov. V vseh primerih smo aktivnost cisteinskih katepsinov določili glede na hidrolizo fluorogenih substratov Z-FR-AMC, Z-RR-AMC in Z-FVR-AMC. A. Aktivnost cisteinskih katepsinov v sekretomih PMA-diferenciranih celic U937, ki predstavljajo človeške makrofage. B. Detekcija katepsinske aktivnosti v sekretomih rakavih celic MDA-MB-231.

Posledično smo najprej preverili ali lahko katepsinsko encimsko aktivnost zaznamo v zunajceličnem okolju tako imunskih celic, ki pogosto predstavljajo glavni vir zunajceličnih proteaz v tumorskem mikrookolju, kot samih rakavih celic. V ta namen smo pripravili različne sekretome celic monocitne celične linije U937, ki smo jih predhodno diferencirali in so predstavljale model s tumorjem povezanih maktofagov, in rakavih celic MDA-MB-

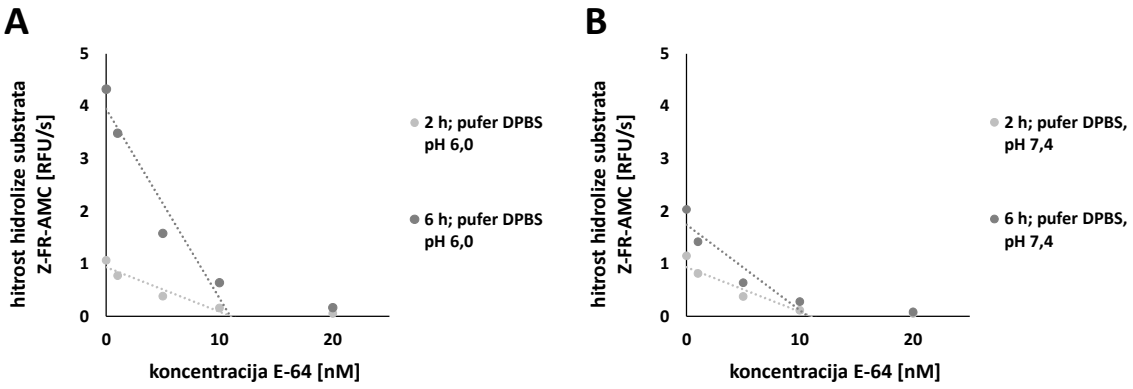
231 ter jih uporabili za detekcijo katepsinske encimske aktivnosti (slika 24). Rezultati nakazujejo, da so aktivni cisteinski katepsini prisotni predvsem v sekretomih diferenciranih celic U937, pri čemer smo najvišjo aktivnost zaznali v sekretomih, ki smo jih pripravili s krajšim gojenjem (2 h in 6 h) celic v pufru DPBS s kislim in fiziološkim pH ter dodanim reducentom DTT. Za daljše gojenje celic (24 h in 48 h) smo namesto pufrov uporabili različna celična gojišča brez dodanega seruma oziroma z zmanjšano koncentracijo seruma ali z dodanim nadomestkom seruma in pod temi pogoji smo v sekretomih zaznali znatno nižjo aktivnost cisteinskih katepsinov (slika 24A). V primeru rakavih pa v sekretomih tako po krajšem kot po daljšem gojenju nismo zaznali katepsinske aktivnosti, kar nakazuje, da rakave celice v svoje zunajcelično okolje najverjetneje ne izločajo aktivnih cisteinskih katepsinov (slika 24B).

Prisotnost aktivnih cisteinskih katepsinov v sekretomih celic smo nato nadalje preverili tudi z imunodetekcijo človeških katepsinov B, L in S, saj dosedanji podatki kažejo, da gre za katepsine, ki so najpogosteje prisotni v tumorskem mikrookolju [262-265]. V primeru diferenciranih celic U937 (slika 25A) smo za imunodetekcijo uporabili le sekretome pripravljene s krajšima časoma gojenja celic, saj smo v le-teh zaznali najvišjo katepsinsko aktivnost, medtem ko smo v primeru rakavih celic MDA-MB-231 izvedli imunodetekcijo katepsinov v vseh pripravljenih sekretomih (slika 25B). Dobljeni rezultati kažejo, da so cisteinski katepsini prisotni tako v sekretomih človeških makrofagov kot rakavih celic, vendar v primeru le-teh šele po daljših časih gojenja celic (24 h in 48 h). Prav tako lahko opazimo, da sta v sekretomih precej različno zastopani zrela oblika in oblika neativnega cimogena izbranih cisteinskih katepsinov. V sekretomih človeških makrofagov lahko namreč zaznamo več zrele oblike katepsinov L in S, medtem ko sta v sekretomih rakavih celic oba katepsina prisotna skoraj izključno v obliki neaktivnega cimogena, kar se sklada tudi z rezultati detekcije encimske aktivnosti. Tudi v primeru katepsina B smo v sekretomih makrofagov in rakavih celic zaznali različna razmerja posameznih oblik, in sicer smo v sekretomih rakavih celic zaznali več oblike neaktivnega cimogena, medtem ko smo v sekretomih makrofagov zaznali več enoverižne oblike, ki predstavlja encimsko aktivno obliko katepsina B. Dodatno smo v sekretomih rakavih celic zaznali tudi prekurzorsko vmesno obliko neaktivnega cimogena katepsina B pri približno 40 kDa.



Slika 25: Imunodetekcija katepsinov B, L in S potrjuje njihovo prisotnost v sekretomih človeških makrofagov (A) in rakavih celic (B). Črna puščica označuje obliko neaktivnega cimogena detektiranih cisteinskih katepsinov. Zrelo obliko katepsinov L in S označuje rdeča puščica, medtem ko je enoverižna zrela oblika katepsina B označena z zeleno puščico. Modra puščica pri katepsinu B označuje dodatno prekurzorsko obliko prokatepsina B, ki smo jo zaznali pri približno 40 kDa.

Nadalje smo v sekretomih diferenciranih celic U937 z uporabo naraščajočih koncentracij ireverzibilnega inhibitorja E-64 določili okvirno celokupno koncentracijo prisotnih aktivnih cisteinskih katepsinov. Za določitev zunajcelične koncentracije smo uporabili le sekretome, ki smo jih pripravili z uporabo pufrov DPBS s kislim (slika 26A) in fiziološkim pH (slika 26B). Hitrost hidrolize substrata Z-FR-AMC, ki smo ga uporabili za detekcijo, je bila pričakovano višja v primeru uporabe pufra s kislim pH, vendar se le-to ni odražalo tudi v višji detektirani celokupni koncentraciji prisotnih katepsinov. Neodvisno od pogojev smo namreč tako po 2-urnem kot 6-urnem gojenju v sekretomih pripravljenih tako v kislem kot fiziološkem pH-okolju določili primerljivo navidezno koncentracijo cisteinskih katepsinov, ki je bila približno 12 nM. Ob upoštevanju redčitvenega faktorja uporabljenega za izvedbo meritve rezultati kažejo, da so cisteinski katepsini v sekretomih diferenciranih celic U937 prisotni s celokupno koncentracijo približno 25 nM.

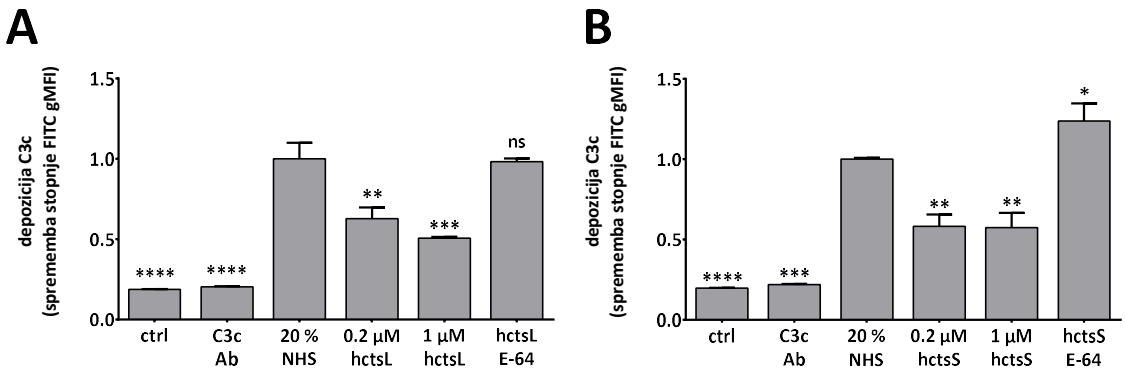


Slika 26: V sekretomih diferenciranih celic U937 so cisteinski katepsini prisotni z okvirno koncentracijo 25 nM. A. Določitev navidezne koncentracije cisteinskih katepsinov v sekretomih diferenciranih celic U937, ki smo jih gojili 2 h ali 6 h v pufru DPBS s kislim pH (pH 6,0) in dodanim reducentom DTT. B. Grafična določitev navidezne koncentracije cisteinskih katepsinov, ki so prisotni v sekretomih diferenciranih celic v primeru uporabe pufra DPBS s fiziološkim pH (pH 7,4) za gojenje celic.

4.2.2 Cisteinska katepsina L in S vplivata na aktivacijo človeškega komplementa

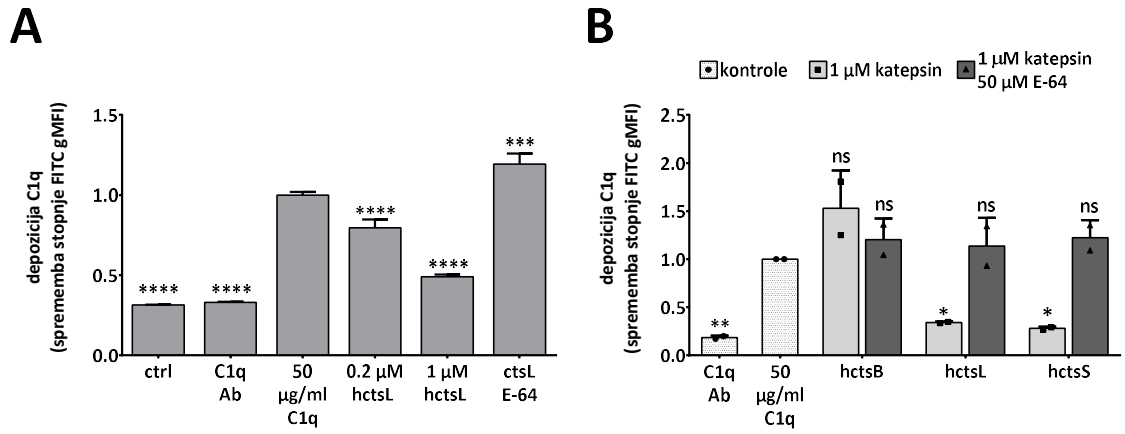
V naslednjem koraku smo raziskovali vpliv prisotnosti cisteinskih katepsinov L in S na aktivacijo človeškega sistema komplementa, saj so predhodno kot eno izmed zuanjceličnih njunih membransko-usidranih tarč identificirali faktor pospeševanja razpada komplementa (CD55) [77]. Vpliv zunajcelične proteolize s strani obeh katepsinov na aktivacijo komplementa smo najprej preverjali na stopnji konvertaze C3 in sicer preko detekcije depozicije komponente C3c, ki nastane ob njenem sestavljanju in aktivaciji. Posledično smo rakave celice MDA-MB-231, ki so bile v prvotni proteomski raziskavi uporabljene za identifikacijo zunajceličnih substratov obeh katepsinov, najprej tretirali z obema katepsinoma in nato tretirane celice izpostavili normalnemu človeškemu serumu ter primerjali depozicijo komponente C3c na površini ne-tretiranih celic s celicami tretiranimi s človeškima katepsinoma L (slika 27A) in S (slika 27B). V primeru tretiranja z obema katepsinoma smo ugotovili, da njuna zunajcelična proteolitična aktivnost privede do značilno zmanjšane depozicije komponente C3c, pri čemer lahko v primeru katepsina L opazimo tudi koncentracijsko odvisnost, saj je učinek njegove zunajcelične proteolize večji v primeru tretiranja z višjo koncentracijo (1 µM) rekombinantnega encima. Če smo oba katepsina predhodno inhibirali z inhibitorjem E-64, smo ponovno zaznali nivo depozicije

komponente C3c, ki je primerljiv z nivojem depozicije na celicah, ki smo jih izpostavili le normalnemu človeškemu serumu (20 % NHS).



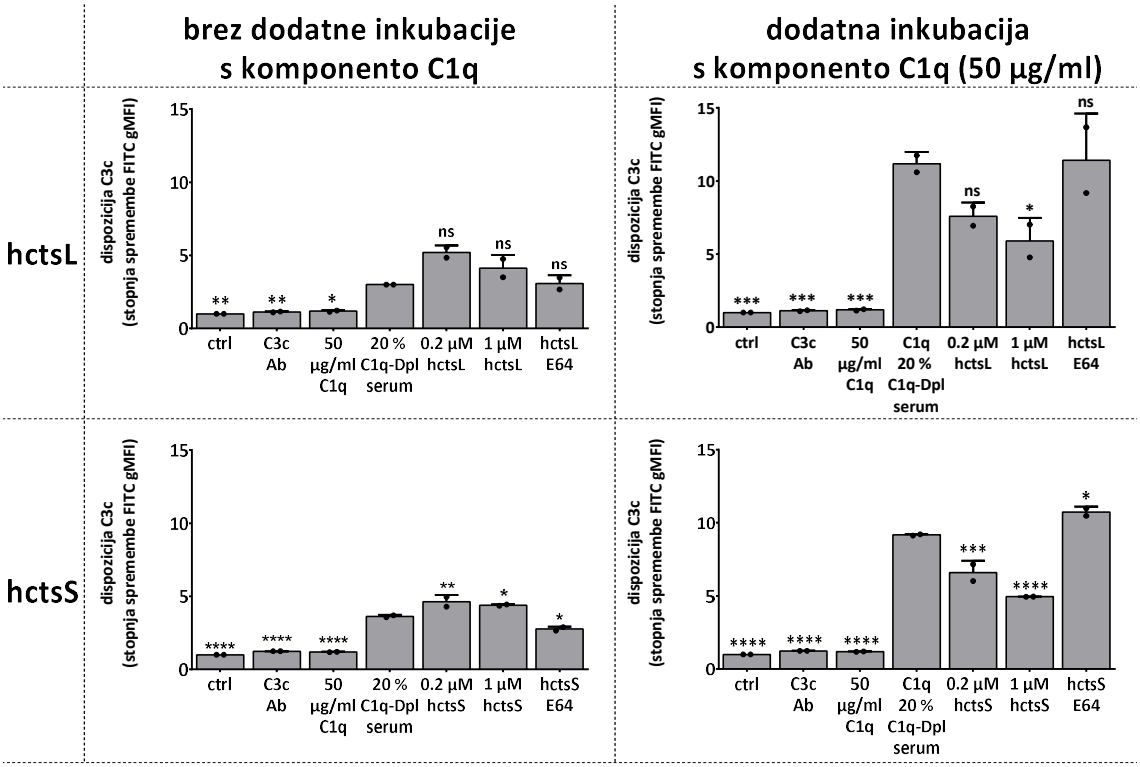
Slika 27: Zunajcelična proteoliza s katepsinoma L (A) in S (B) zmanjša depozicijo komponente C3c človeškega sistema komplementa. Rezultati prikazujejo spremembo stopnje gMFI barvila FITC preračunano glede na gMFI pozitivne kontrole, ki jo v danem primeru predstavljajo celice MDA-MB-231 izpostavljene le normalnemu človeškemu serumu (20 % NHS). Statistična značilnost sprememb je prav tako preračunana v primerjavi s pozitivno kontrolo.

Glede na značilno zmanjšano depozicijo komponente C3c smo sklepali, da cisteinska katepsina L in S vplivata na aktivacijo sistema komplementa najkasneje na stopnji konvertaze C3. Na tej stopnji konvergirajo vse tri poti aktivacije sistema komplementa [266], zato smo v naslednjem koraku preverili, ali lahko zaznamo specifično na katero pot aktivacije vplivata katepsina L in S.



Slika 28: Cisteinska katepsina L in S zmanjšata depozicijo komponente C1q na površino rakavih celic MDA-MB-231. Prikazani rezultati kažejo zmanjšanje depozicije komponente C1q glede na spremembo stopnje gMFI preračunane v odvisnosti od gMFI, ki smo jo zaznali v pozitivni kontroli (50 µg/ml C1q). Statistična značilnost zaznanih sprememb je prav tako prikazana v odvisnosti od pozitivne kontrole. A. Vpliv rekombinantnega človeškega katepsina L na depozicijo komponente C1q na površino celic MDA-MB-231. B. Primerjava vpliva obdelave celic MDA-MB-231 z višjo koncentracijo rekombinantnih človeških katepsinov B, L in S na depozicijo komponente C1q na površino celic.

Posledično smo z detekcijo depozicije komponente C1q na površino rakavih celic MDA-MB-231 preverili ali tretiranje celic s katepsinoma L in S vpliva direktno na klasično pot aktivacije sistema komplementa (slika 28). Na klasično pot smo se osredotočili saj so klinična opažanja pri različnih oblikah rakavih obolenj pokazala povišano prisotnost komponent, ki nakazujejo na aktivacijo sistema komplementa preko klasične poti [267]. Kontrolne celice in celice, ki smo jih tretirali s človeškimi katepsini, smo izpostavili komercialno dostopni komponenti, izolirani iz normalnega človeškega seruma, pri čemer smo uporabili koncentracijo, ki ustreza povprečni koncentraciji komponente C1q v človeškem serumu. Kot v primeru detekcije depozicije komponente C3c, smo tudi v primeru depozicije komponente C1q zaznali koncentracijsko-odvisno značilno znižanje zaznane depozicije v primeru, ko smo celice predhodno tretirali z rekombinantnim človeškim katepsinom L (slika 28A). Prav tako smo zmanjšano depozicijo zaznali tudi v primeru tretiranja celic z višjo koncentracijo (1 µM) katepsina S, medtem ko obdelava celic z višjo koncentracijo (1 µM) katepsina B ni značilno vplivala na zaznano depozicijo (slika 28B). V vseh primerih smo po inhibiciji katepsinov z E-64 zaznali raven depozicije primerljivo s pozitivno kontrolo, ki jo v danem primeru predstavljajo kontrolne celice izpostavljene komponenti C1q s končno koncentracijo 50 µg/ml.



Slika 29: Cisteinska katepsina L in S vplivata predvsem na klasično pot aktivacije sistema komplementa. Rezultati so prikazani glede na stopnjo spremembe gMFI, ki smo jo preračunali glede na neobdelane celice (ctrl), saj so le-te predstavljale vzorec, ki je bil v vseh primerih pripravljen z uporabo enakih pogojev.

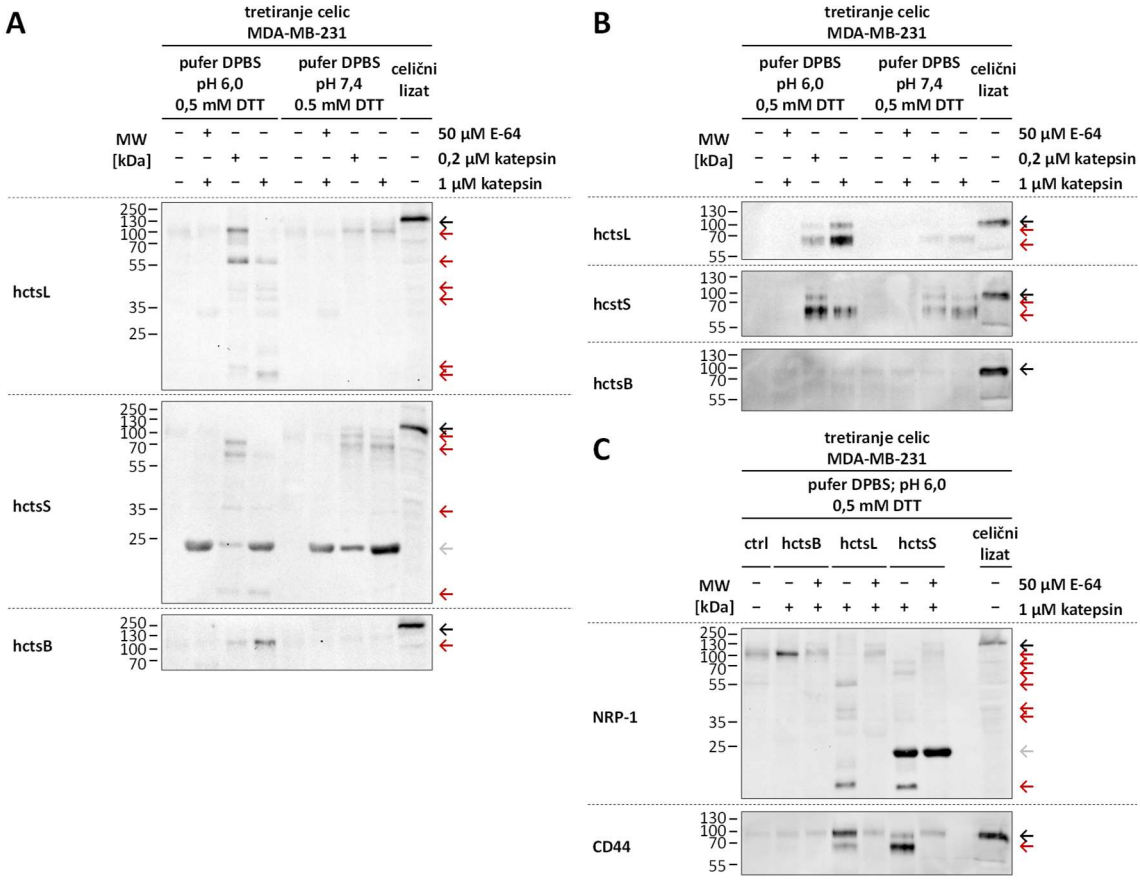
V naslednjem koraku smo nadalje preverili vpliv cisteinskih katepsinov L in S direktno na klasično pot aktivacije komplementa vse do nastanka aktivne konvertaze C3 tako, da smo preverili depozicijo komponente C3c v primeru uporabe človeškega seruma brez komponente C1q (C1q-Dpl) ter z in brez dodatnega tretiranja celic s komercialno komponento C1q. Kontrolne celice in celice tretirane s cisteinskima katepsinoma L in S

smo torej v enem primeru pred izpostavitvijo C1q-Dpl serumu tretirali še s 50 µg/ml komponente C1q, v drugem primeru pa smo namesto komponente C1q uporabili le pufer GVB++ (slika 29). Aktivacija sistema komplementa preko klasične poti je torej lahko potekla le v primeru dodatne inkubacije s komponento C1q in dobljeni rezultati kažejo, da smo le v tem primeru zaznali statistično značilno znižanje depozicije komponente C3c kar nakazuje, da zunajcelična cisteinska katepsina L in S zmanjšata aktivacijo sistema komplementa preko klasične poti. Brez dodatne inkubacije s komponento C1q smo pričakovano zaznali precej nižjo depozicijo komponente C3c po izpostavitvi celic C1q-Dpl serumu, kar nakazuje na znaten prispevek klasične poti k celokupni aktivaciji sistema komplementa. Presenetljivo smo v odsotnosti dodatne inkubacije s komponento C1q po tretiranja celic z obema katepsinoma zaznali trend šibkega povišanja depozicije komponente C3c, ki pa je bil statistično značilen le v primeru katepsina S.

4.2.3 Cisteinska katepsina L in S cepita NRP1 in antigen CD44 s površine rakavih celic

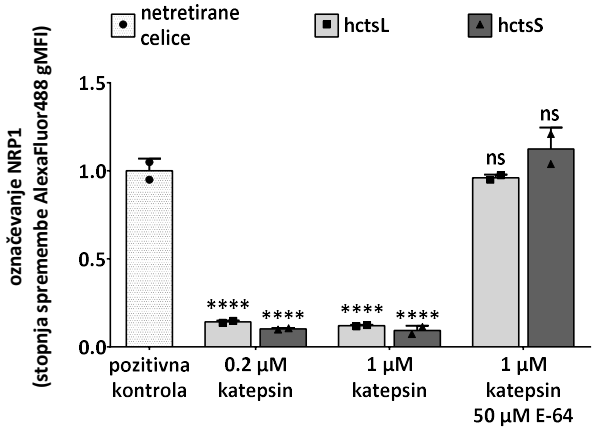
Glede na dobljene rezultate smo sklepali, da zunajcelična proteoliza s strani katepsinov L in S tako spremeni površino rakavih celic, da prepreči vezavo komponente C1q. Posledično smo se osredotočili na membransko-usidrane proteine, ki so bili identificirani kot tarče obeh katepsinov [77] in za katere smo s testom "pull down" pokazali, da lahko delujejo kot vezavni partnerji komponente C1q (Sobotič et al., neobljavljeno, članek v pripravi).

Dva proteina, ki sta ustrezala obema pogojema, sta bila CD44 in NRP1, zato smo z imunodetekcijo preverili ali lahko zaznamo cepljene fragmente njunih zunajceličnih domen, ki so rezultat encimske aktivnosti katepsinov L in S. Tako v kislem (pH 6,0) kot fiziološkem pH (pH 7,4) okolju smo preverili ali lahko v šedomu celic obdelanih s katepsini B, L ali S zaznamo fragmente cepljene zunajcelične domene NRP1 (slika 30A) in CD44 (slika 30B). Rezultati kažejo, da CD44 cepita samo katepsina L in S, medtem ko lahko NRP1 vsaj v kislem pH-okolju cepijo vsi trije katepsini. Dodatno lahko opazimo, da ob tretiranju celic s katepsinoma L in S v kislem pH-okolju poteče tudi nadaljnja razgradnja cepljene zunajcelične domene, medtem ko v fiziološkem pH delovanje obeh katepsinov privede do nastanka enega samega cepljenega fragmenta. Posledično smo v kislem pH-okolju izvedli še nadaljnjo direktno primerjavo delovanja vseh treh cisteinskih katepsinov in potrdili, da katepsina L in S ne samo cepita ampak tudi nadalje razgradita zunajcelično domeno NRP1, medtem ko rezultati kažejo, da katepsin B zunajcelično domeno NRP1 cepi le enkrat (slika 30C). V primeru CD44 smo tudi po tretiranju s katepsinoma L in S zaznali precej manjšo razgradnjo zunajcelične domene, saj smo v šedomih zaznali le dva fragmenta, medtem ko v primeru katepsina B nismo zaznali nobenih cepljenih fragmentov (slika 30). Direktna primerjava zunajceličnega delovanja vseh treh katepsinov tudi nakazuje, da katepsina L in S precej bolj učinkovito cepita obe izbrani tarči kot katepsin B.



Slika 30: Cisteinska katepsina L in S cepita zunajcelično domeno membransko-usidranih proteinov NRP1 in CD44. Črne puščice označujejo necepljeno obliko proteina, ki je prisotna v celičnem lizatu, medtem ko rdeče puščice označujejo zaznane fragmente cepljenih zunajceličnih domen obeh proteinov. V primeru imunodetekcije NRP1 siva puščica označuje dodan rekombinantni človeški katepsin S, ki ga primarna protitelesa proti NRP1 nespecifično prepoznajo. A. Imunodetekcija cepljenih fragmentov zunajcelične domene NRP1 po tretiranju celic z izbranimi katepsini v kislem (pH 6,0) in fiziološkem pH (pH 7,4) okolju. B. Katepsina L in S, ne pa tudi katepsin B, cepita zunajcelično domeno CD44 predvsem v kislem pH-okolju. C. Primerjava zunajcelične proteolize NRP1 in CD44 s katepsini B, L in S.

V primeru NRP1 smo nadalje tudi kvantificirali v kolikšni meri oba katepsina cepita njegovo zunajcelično domeno in tako spreminjata površino rakavih celic. Celice smo tretirali z obema katepsinoma in s pretočno citometrijo detektirali v kolikšni meri lahko po zunajcelični proteolizi z obema katepsinoma še zaznamo prisotnost NRP1 na površini celic MDA-MB-231 (slika 31). Rezultati kažejo, da oba katepsina že v primeru nižje koncentracije (0,2 µM) signifikantno zmanjšata detekcijo NRP1 na površini rakavih celic, saj intenziteta označevanja pade za skoraj 90 % glede na pozitivno kontrolo, ki jo v danem primeru predstavljajo neobdelane celice označene s primarnim protitelesom proti NRP1 in sekundarnim protitelesom konjugiranim s fluorescenčnim barvilom AlexaFluor488. Med samima katepsinoma je opazna le neznatno bolj učinkovita cepitev s katrpsinom S, vendar ne gre za statistično signifikantno spremembo. V primeru obeh katepsinov smo z dodatkom inhibitorja E-64 povrnili raven zaznavanja NRP1 na površini celic nazaj na raven, ki smo jo zaznali v primeru neobdelanih celic, kar potrjuje, da je zmanjšana detekcija res posledica delovanja obeh cisteinskih katepsinov.

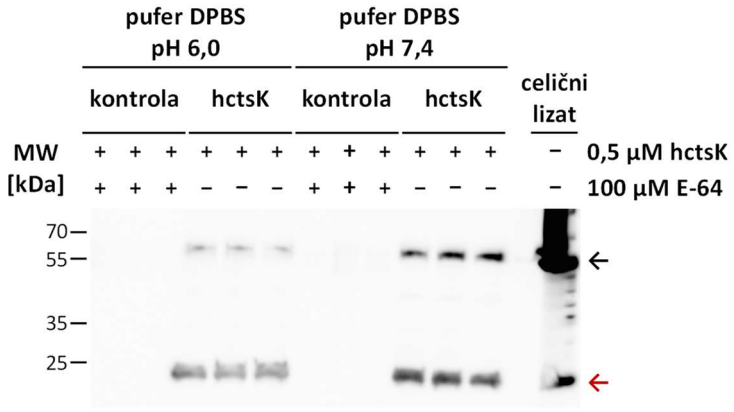


Slika 31: Cisteinska katepsina L in S skoraj povsem odstranita NRP1 s površine rakavih celic MDA-MB-231. Kvantifikacijo delovanja obeh katepsinov smo izvedli s pretočno citometrijo pri čemer smo celice označili s protitelesom proti NRP1 in vezavo protitelesa zaznavali s sekundarnim protitelesom konjugiranim z barvilom AlexaFluor488. Rezultati so predstavljeni kot stopnja spremembe gMFI, ki je preračunana glede na pozitivno kontrolo.

4.3 Katepsin K sprosti MMP-14 z membrane rakavih celic

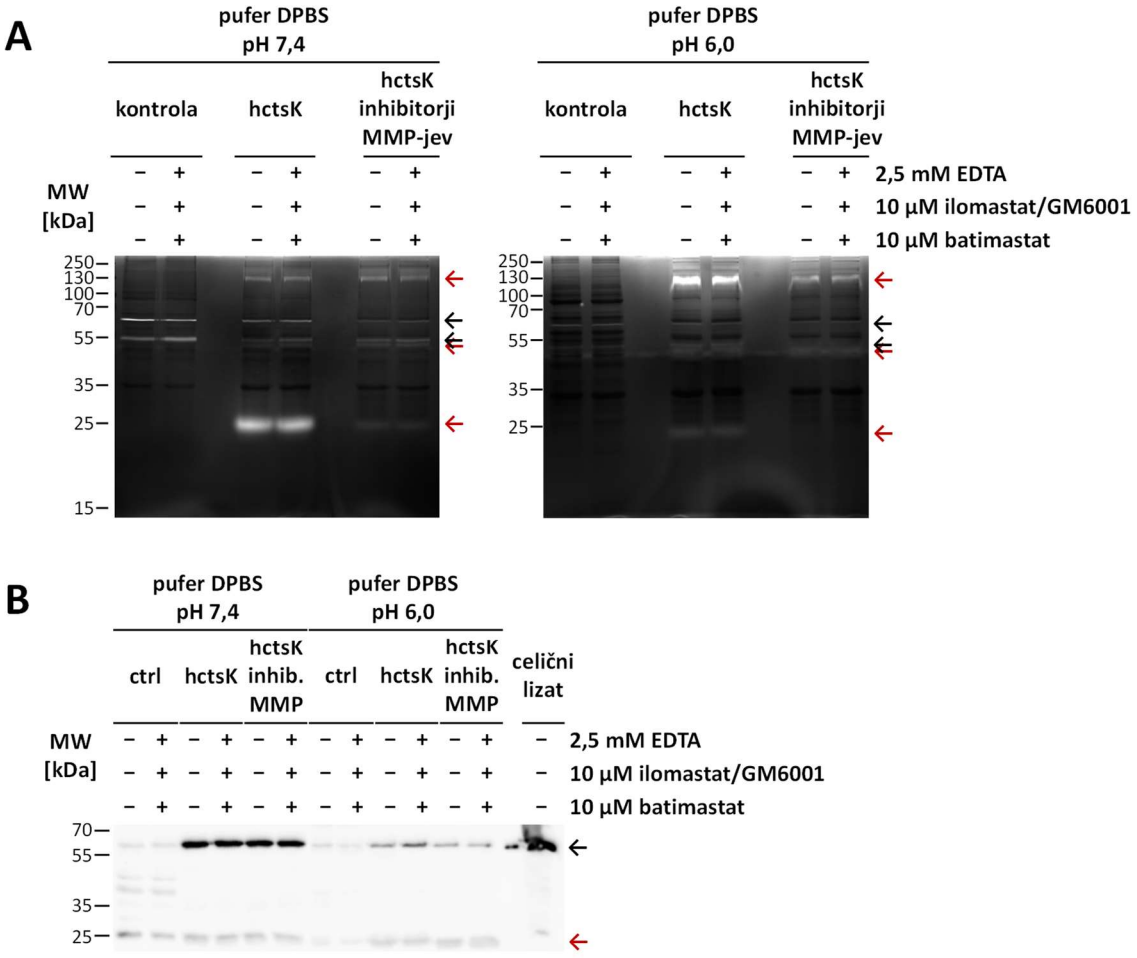
4.3.1 Zunajcelična aktivnost katepsina K privede do zaznavne želatinazne aktivnosti v šedomih

Poleg zunajcelične vloge cisteinskih katepsinov L in S, smo raziskovali tudi zunajcelično vlogo katepsina K. S proteomsko analizo šedoma celic HT-144 tretiranih z rekombinantnim človeškim katepsinom K smo namreč kot njegovo potencialno zunajcelično tarčo identificirali MMP-14 (Vizovišek et al., neobjavljeno, članek v pripravi), ki predhodno ni bila identificirana kot tarča katepsinov L in S [77].



Slika 32: Človeški katepsin K cepi zunajcelično domeno MMP-14 v kislem in fiziološkem pH-okolju. Za izvedbo imunodetekcije smo celice HT-144 tretirali z rekombinantnim katepsinom K ali z inhibiranim rekombinantnim katepsinom K in prikazani rezultati so pridobljeni s tremi neodvisnimi poskusi. Črna puščica označuje večji fragment MMP-14, ki je po velikosti primerljiv z necepljeno obliko prisotno v celičnem lizatu, rdeča puščica pa manjši fragment, ki po velikosti ustreza katalitični domeni in je prav tako zaznaven v celičnem lizatu.

Posledično smo najprej tako v kislem (pH 6,0) kot v fiziološkem pH-okolju (pH 7,4) z imunodetekcijo preverili ali so v šedomu celic prisotni fragmenti cepljene zunajcelične domene MMP-14 (slika 32). Tako v kislem kot v fiziološkem pH-okolju smo zaznali dva cepljena fragmenta, ki sta bila prisotna le v šedomu celic tretiranih s katepsinom K ne pa tudi v štedomu celic tretiranih s katepsinom K, ki smo ga predhodno inhibirali z dodatkom inhibitorja E-64. Oba zaznana fragmenta smo bolj intenzivno zaznali v šedomu pripravljenem v fiziološkem pH-okolju, medtem ko je bil v kislem pH-okolju predvsem večji fragment precej manj zaznaven. Nadaljnja analiza velikosti zaznanih fragmentov kaže, da je velikost večjega fragmenta primerljiva z velikostjo celotne MMP-14, ki je prisotna v celičnem lizatu, kar nakazuje, da ena izmed cepitev s strani katepsina K najverjetneje poteče tik ob plazemski membrani. Manjši izmed zaznanih fragmentov pa po velikosti ustreza velikosti katalitične domene MMP-14, kar daje slutiti, da zunajcelično delovanje katepsina K privede tudi do sprostitve katalitične domene MMP-14.



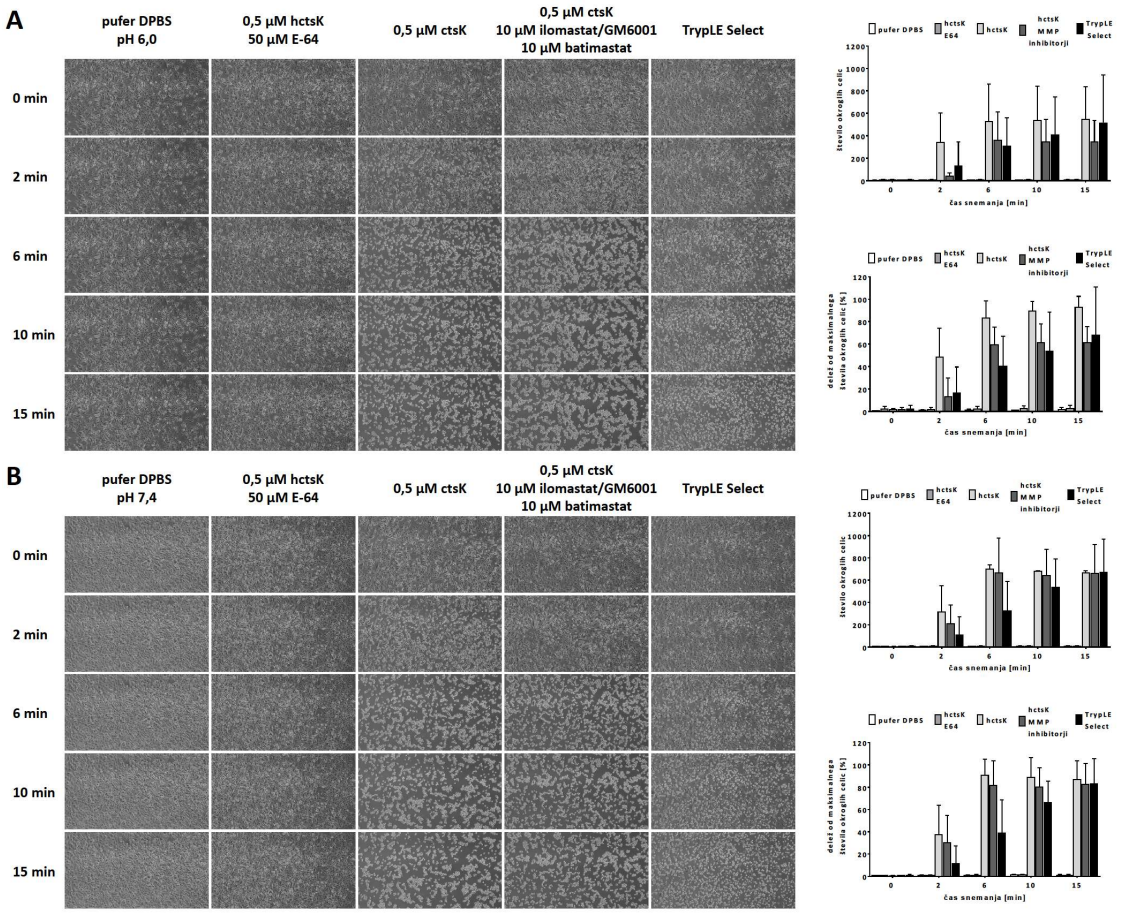
Slika 33: Zunajcelična aktivnost katepsina K privede do povišane želatinazne aktivnosti. A. Rezultati detekcije razgradnje želatine kažejo na povišano želatinazno aktivnosti v šedomih tretiranih celic, ki ostane prisotna tudi po dodatku inhibitorjev MMP-jev in je najbolj zaznavna pri velikosti približno 25 kDa in 130 kDa. Črne puščice označujejo lise, ki so prisotne tako v kontroli kot v tretiranih vzorcih, rdeče puščice pa lise, ki se pojavijo zgolj v primeru tretiranja s katepsinom K. B. Imunodetekcija cepitve zunajcelične domene MMP-14 v vzorcih šedomov uporabljenih za detekcijo želatinazne aktivnosti. Črna puščica označuje večji fragment MMP-14, po velikosti primerljiv z necepljeno obliko, rdeča puščica pa manjši fragment, po velikosti primerljiv s katalitično domeno MMP-14.

V naslednjem koraku smo glede na to, da lahko MMP-14 nadalje aktivira MMP-2 in MMP-9 [268], ki sta učinkoviti želatinazi, preverili ali lahko v šedomih zaznamo tudi povišano želatinazno aktivnost v primerjavi s kontrolo. Šedome pripravljene po tretiranju celic HT-144 smo v ta namen nanesli na poliakrilamidni gel z želatino in detektirali razgradnjo le-te v primeru različnih pogojev tretiranja (slika 33A). Pred nanosom smo šedome razdelili na dva dela in en del takoj uporabili za nanos, drugemu pa dodali inhibitorje metaloproteaz EDTA, ilomastat in batimastat, kar je na sliki označeno z znakoma – in +. Tako v fiziološkem pH, ki je bolj primeren za aktivnost MMP-jev, kot v kislem pH, ki bolj ustreza cisteinskim katepsinom, smo tako v primeru tretiranja zgolj s katepsinom K kot tudi ob tretiranju s katepsinom K z dodanimi inhibitorji MMP-jev, zaznali več razgradnje želatine kot v kontroli, ki jo v danem primeru predstavlja z E-64-inhibiran katepsin K. Ob izvedbi tretiranja v prisotnosti inhibitorjev MMP-jev smo večinoma, predvsem pa v primeru lis zaznanih pri približno 25 kDa ter v kislem pH-okolju tudi pri velikosti približno 130 kDa, zaznali znatno nižjo razgradnjo želatine. Po velikosti zaznane lise sicer ne ustrezajo pričakovanim velikostim topnih metaloproteinaz MMP-2 in MMP-9, zato ne moremo z gotovostjo trditi, da je povečana razgradnja želatine v primeru šedomov tretiranih celic posledica delovanja teh dveh želatinaz. Lise, ki kažejo razgradnjo želatine, so bile prisotne tudi v primeru dodatka inhibitorjev metaloproteaz v šedome celic pred nanosom na poliakrilamidni gel z želatino, kar je lahko posledica neučinkovite inhibicije metaloproteaz ali pa nakazuje, da so za razgradnjo želatine potencialno odgovorne druge želatinaze. Dodatno smo vzorce, ki smo jih uporabili za detekcijo želatinazne aktivnosti, uporabili za imunodetekcijo cepitev MMP-14 (slika 33B). Rezultati imunodetekcije potrjujejo, da je v vseh primerih prišlo do pričakovane cepitve zunajcelične domene MMP-14, pri čemer smo v fiziološkem pH-okolju zaznali prisotnost lise, ki najverjetneje predstavlja katalitično enoto MMP-14, tudi v primeru kontrole. To nakazuje, da zaznano cepitev najverjetneje vsaj delno katalizirajo tudi druge proteaze in ne sam katepsin K.

4.3.2 Zunajcelična aktivnost katepsina K zmanjša adhezijo rakavih celic

Za katepsina L in S so pokazali tudi vpliv na adhezijo rakavih celic [77], zato smo preverili, ali lahko tudi po tretiranju s katepsinom K zaznamo spremenjeno adhezijo rakavih celic. V ta namen smo celice HT-144 tretirali s katepsinom K pod različnimi pogoji in jih 15 minut spremljali s fazno kontrastno svetlobno mikroskopijo (slika 34). Za tretiranje smo uporabili tako pufer DPBS s kislim (pH 6,0) kot fiziološkim pH (pH 7,4). Za dodatno primerjavo smo celice tretirali tudi z raztopino TrypLE Select, ki se rutinsko uporablja za encimsko odlepljanje celic in kot takšna potrjeno vpliva na adhezijo celic. Rezultati kažejo, da dodatek samega pufra in pufra z inhibiranim katepsinom K ne vpliva na samo adhezijo celic tako v kislem kot v fiziološkem pH-okolju. Tretiranje celic s katepsinom K pa tudi v prisotnosti inhibitorjev MMP-jev, inhibitorja širokega spektra ilomastat/GM6001 in batimastat, privede do zmanjšane adhezije celic, in sicer skoraj takoj po dodatku katepsina K, saj zaznaven delež celic pridobi okroglo obliko, ki je značilna za izgubo adhezije, že 2 minuti po začetku tretiranja. V primerjavi s komercialno raztopino TrypLE Select rezultati kažejo, da katepsin K povzroči nekoliko hitrejšo odlepljanje celic, predvsem pa je vzorec odlepljanja drugačen. Po dodatku katepsina K namreč lahko zaznamo odlepljene skupke celice, medtem ko po tretiranju s TrypLE Select zaznamo predvsem posamezne odlepljene celice, ki ne tvorijo skupkov. Dodatno, primerjava delovanja katepsina K v kislem (slika 34A) in fiziološkem pH-okolju (slika 34B), kaže da lahko tako ob uporabi samega katepsina K kot tudi v primeru sočasne uporabe z inhibitorji MMP-jev v fiziološkem pH-okolju zaznamo nekoliko manj skupkov odlepljenih celic in nekoliko več posameznih odlepljenih celic. Statistična analiza prisotnosti okroglih celic potrjuje, da process izgube adhezije

poteka najhitreje v primeru uporabe rekombinantnega človeškega katepsina K. Prav tako je razvidno, da sočasna uporaba inhibitorjev metaloprotaz sicer nekoliko upočasni proces, vendar gre za neznačilno razliko. V primerjavi s komercialno raztopino TrypLE Select lahko pri le-tej opazimo predvsem pričakovano slabše delovanje v kislem pH-okolju in na splošno nekoliko počasnejše odlepljanje celic kot v primeru uporabe katepsina K, kar nakazuje, da ima zunajcelična proteoliza s katepsinom K precejšen vpliv na adhezijo rakavih celic HT-144.



Slika 34: Tretiranje celic HT-144 z rekombinatnim človeškim katepsinom K privede do zmanjšane adhezije celic. Prikazani rezultati predstavljajo izpostavljene časovne točke kontinuiranega spremljanja celic v okviru katerega smo celice slikali vsako minuto. Vpliv katepsina K na adhezijo celic HT-144 smo preverjali tako v kislem (A) kot v fiziološkem pH okolju (B). Grafični prikaz prikazuje število okroglih celic prisotnih pri vsaki časovni točki v treh neodvisnih poskusih skupaj s standardno napako. Delež glede na maksimalno število okroglih celic je preračunan za vsak neodvisni poskus posebej. Dobljeni rezultati so prikazani kot povprečje meritev s standardno napako.

Poglavje 5

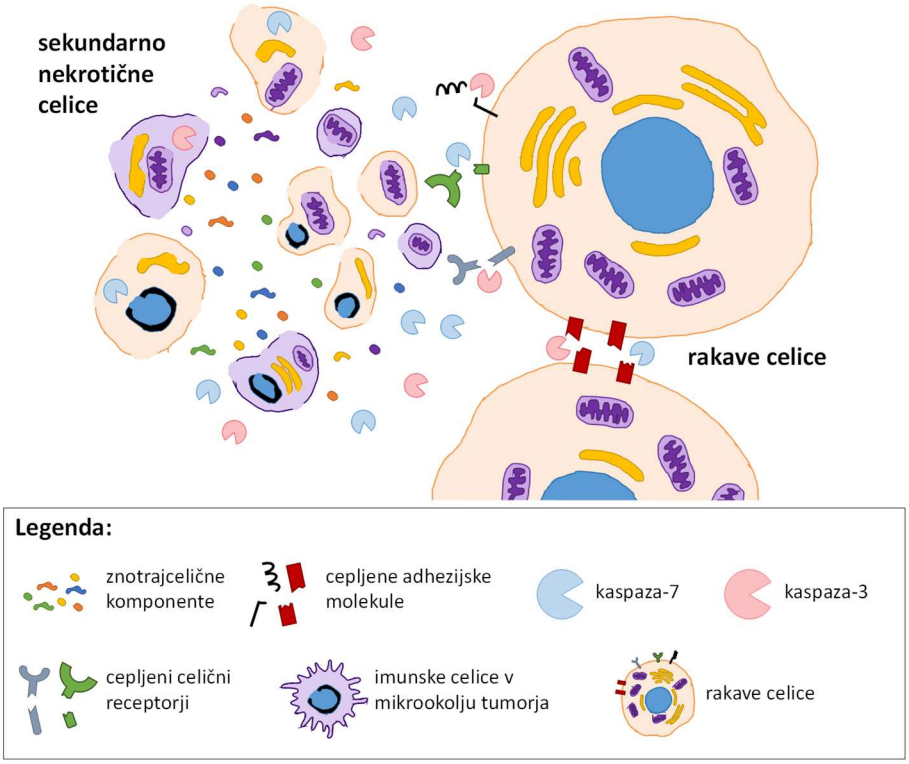
Razprava

Cisteinske proteaze predstavljajo skupino proteaz, ki preko proteolitičnih cepitev vršijo pomembne fiziološke vloge in posledično napake v njihovi regulaciji pogosto spremljajo nastanek in napredovanje raznih patoloških stanj, predvsem takšnih, ki jih spremlja vnetje. Med z vnetjem-povezanimi patološkimi stanji prednjačijo predvsem rakava obolenja, saj je proteolitična cepitev kot ireverzibilna post-translacijska modifikacija vpletena v mnoge biološke procese, ki spremljajo rakava obolenja, med drugim migracijo, proliferacijo in diferenciacijo celic, imunski odziv, vzdrževanje homeostaze tkiva in celično smrt [155]. Vpletenost v te procese in s tem v razvoj in napredovanje rakavih obolenj so do sedaj pokazali tako za cisteinske katepsine, pri čemer slabša prognoza bolezni korelira predvsem z njihovo zunajcelično lokalizacijo [269], kot tudi za kaspaze, pri čemer pa se večina raziskav osredotoča na njihovo znotrajcelično vlogo efektorjev raznih oblik celične smrti [160]. Glede na to, da je za rakava obolenja značilna predvsem nekanonična lokalizacija cisteinskih katepsinov [76], smo se v okviru doktorske raziskave osredotočili na zunajcelične vloge cisteinskih proteaz, in sicer efektorskih apoptotskih kaspaz-3 in -7 ter cisteinskih katepsinov K, L in S.

5.1 Zunajcelična vloga apoptotskih kaspaz-3 in -7

Kaspaze, ko spadajo v skupino cisteinskih proteaz, so ključni efektorji različnih oblik programirane celične smrti, med drugim tudi apoptoze, ki je ključna za ohranjanje homeostaze tkiva in odstranjevanje poškodovanih ali nevarno spremenjenih celic [86]. Zaradi vpletenost kaspaz v apoptozo, ki služi tudi kot obrambna strategija organizma proti tumorigenezi [160], so apoptotske kaspaze pomembne za razvoj terapevtskih strategij za zdravljenje rakavih obolenj, saj jih s ciljanjem drugih bioloških tarč poskušajo aktivirati in tako sprožiti apopotozo v rakavih celicah [270]. Raziskave njihovih vlog, ki presegajo izvedbo apoptoze, so torej ključne za razjasnitev njihovega delovanja predvsem v primeru patoloških sprememb. Z raziskavo, ki smo jo izvedli v okviru doktorske disertacije, smo pokazali, da se kaspaze lahko nahajajo tudi zunaj celic v mikrookolju tumorja in da lahko cepijo zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov (slika 35). Posledično bi kaspaze lahko predstavljale še eno skupino proteaz, ki s proteolitičnimi cepitvami v zunajceličnem okolju vplivajo na razvoj in napredovanje rakavih obolenj, saj zunajcelična proteoliza adhezijskih molekul ali celičnih receptorjev predstavlja enega ključnih mehanizmov, ki regulirajo celično signaliziranje in lastnosti celic v mikrookolju tumorja [170, 171, 271]. V splošnem so aktivne proteaze prisotne v zunajceličnem prostoru najpogosteje odgovorne za cepitve komponent zunajceličnega matriksa, različnih citokinov, endogenih inhibitorjev in zunajceličnih domen membransko-usidranih proteinov [77, 155, 171], vendar za apoptotske kaspaze do sedaj še ni bilo dokazano, da lahko cepijo tudi zunajcelične proteine. Apoptotske kaspaze so namreč znotrajcelične proteaze, ki med

apoptozo cepijo mnoge citoplazemske in jedrne proteine [46, 272], medtem ko njihove potencialne zunajcelične vloge še niso pojasnjene. Posledično smo se v okviru doktorske disertacije namenili raziskati zunajcelični potencial apoptotskih kaspaz pri čemer smo se omejili predvsem na mikrookolje tumorja, saj je povečana zunajcelična proteoliza pogosto povezana z razvojem in napredovanjem različnih rakavih obolenj [273].



Slika 35: Predpostavljena zunajcelična vloga apoptotskih kaspaz-3 in -7 v mikrookolju tumorja. Sekundarno nekrotične rakave celice in celice strome, predvsem imunske celice, v tumorskem mikrookolju predstavljajo vir zunajcelično prisotnih kaspaz-3 in -7, ki lahko nato cepijo zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov.

Potencialne zunajcelične vloge apoptotskih kaspaz-3 in -7 smo raziskovali na primeru rakavih celic MDA-MB-231, ki predstavljajo model raka dojk, in limfoblastnih imunskih rakavih celicah Jurkat E6-1, ki so služile kot model za imunske celice, ki v heterogeno mikrookolje tumorja pogosto izločajo največjo količino aktivnih proteaz [77, 274, 275]. Pri tem smo se osredotočili na potencialno sposobnost apoptotskih kaspaz, da cepijo zunanajcelične domene membransko-usidranih proteinov, saj gre za vlogo, ki so jo do sedaj že pokazali za druge cisteinske proteaze [77]. Membransko-usidrani proteini namreč sodelujejo pri vzpostavljanju celičnih stikov, pritrjevanju celic in celičnem signaliziranju, torej pri bioloških procesih, ki so patološko spremenjeni v primeru rakavih obolenj [154, 276]. Z masno spektrometrijo smo ugotovili, da lahko po tretiranju celic MDA-MB-231 z rekombinantnima kaspazama-3 in -7, v šedomih zaznamo fragmente mnogih membransko-usidranih proteinov (slika 9), kar nakazuje, da kaspazi-3 in -7 lahko cepita zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov. Med identificiranimi proteini smo z upoštevanjem števila zaznanih peptidov in razmerja SCR za obe kaspazi definirali NRP-1 kot glavno membransko-usidrano tarčo, kar dodatno potrjuje tudi zaznavnost cepljenih fragmentov NRP-1 v šedomih tretiranih celic (slika 12). Potrditev zunajceličnih tarč kaspaz-3 in -7 pa še ne pomeni, da do teh cepitev res lahko pride, zato smo s sprožanjem

apoptoze v rakavih in imunskih celicah preverili, ali lahko v celičnih gojiščih apoptotičnih celic zaznamo encimsko aktivnost kaspaz. Tako v primeru rakavih celic MDA-MB-231 (slika 13) kot v primeru imunskih celic Jurkat E6-1 (slika 14) smo v celičnih lizatih in v celičnih gojiščih apoptotičnih celic lahko zaznali hidrolizo kaspaznega fluorogenega substrata Ac-DEVD-AFC predvsem pri daljši izpostavljenosti sprožilcu apoptoze STS. Zaznavno zunajcelično hidrolizo substrata Ac-DEVD-AFC so predhodno že pokazali tako in vitro kot in vivo in glede na patološka stanja, ki jih spremlja, so zunajcelično DEVDazno aktivnost predlagali tudi kot biooznačevalce za spremljanje pretirano povišane apoptoze in posledične poškodbe organov, uspešnosti kemoterapije in napovedovanje stopnje preživetja po presaditvi organov [277]. Na zunajcelično pojavnost apoptotskih kaspaz dodatno nakazuje tudi prisotnost aktivne kaspaze-3 v sekretornih zrnih mastocit [278], ki lahko po izločanju, ki ga sproži grancim B, cepi značilno zunajcelični citokin IL-33 [279]. V tem primeru gre sicer za aktivno izločanje, medtem ko naši rezultati kažejo, da v primeru apoptotičnih celic zunajcelična prisotnost aktivnih apoptotskih kaspaz-3 in -7 sovpada z izgubo membranske integritete do katere pride med napredovanjem apoptoze v sekundarno nekrozo. Gre torej za pasivno sproščanje aktivnih kaspaz v primeru napredovanja v sekundarno nekrozo, do česar lahko v fizioloških pogojih pride, če apoptotska telesa niso pravočasno odstranjena s fagocitozo zaradi okvarjene ali preobremenjene eferocitoze fagocit [280, 281]. Poseben primer, ki bi prav tako lahko privedel do sproščanja aktivnih apoptotskih kaspaz v zunajcelični prostor, pa je tudi kemoterapija, saj so na modelu raka dojk pokazali, da lahko delovanje kemoterapevtikov privede do pospešenega napredovanja apoptoze v sekundarno nekrotično oziroma piroptotično celično smrt, ki ga s cepitvijo gasdermina E sproži kaspaza-3 [282, 283]. Mehanizem pospešenega napredovanja apoptoze zaradi cepitve gasdermina E so do sedaj zaznali v različnih celičnih linijah celic raka dojk [284, 285], medtem ko pri nekaterih drugih celičnih linijah te cepitve niso zaznali [134], kar nakazuje, da najverjetneje ne gre za univerzalni mehanizem prisoten pri različnih oblikah rakavih obolenj. Kljub temu pa obstoj mehanizmov, ki v mikrookolju tumorja spremenijo potek apoptoze iz neimunogenega v imunogen tip celične smrti, daje dodatne temelje potencialnim zunajceličnim vlogam apoptotskih kaspaz.

Vseeno pa mikrookolje tumorja ne predstavlja optimalnega okolja za delovanje apoptotskih kaspaz, saj je v mikrookolju tumorja pogosto zaznaven kisel pH [261], medtem ko so apoptotske kaspaze encimsko najbolj aktivne v nevtralnem pH. Karakterizacija encimske aktivnosti rekombinantno pripravljenih apoptotskih kaspaz je namreč pokazala, da so le-te encimsko najbolj aktivne znotraj ozkega območja pH in njihova proteolitična aktivnost hitro pade tako v kislem kot v bazičnem okolju [42]. Naši rezultati kažejo, da je izguba proteolitične aktivnosti v kislem okolju značilna predvsem za kaspazo-3, medtem ko smo v primeru kaspaze-7 pokazali, da le-ta ohrani skoraj polovico svoje proteolitične aktivnosti tudi v rahlo kislem pH-okolju, kakršno je značilno tudi za mikrookolje tumorja. Z nadaljnjo analizo zunajcelične kaspazne aktivnosti v celičnem mediju apoptotičnih celic Jurkat E6.1 smo pokazali, da je le-ta primerljiva v nevtralnem in kislem pH, zaradi česar lahko sklepamo, da je v zunajceličnem okolju bolj aktivna kaspaza-7, medtem ko precejšnji vpliv pH na kaspazno aktivnost v celičnih lizatih nakazuje, da je kaspaza-3 najverjetneje glavna eksekucijska kaspaza v znotrajceličnem okolju (slika 19). Sposobnost apoptotskih kaspaz, da obdržijo proteolitično aktivnost tudi v okolju z nižjim pH od poročanega optimalnega pH za njihovo delovanje, se sklada tudi z opažanji, da sprožitev apoptoze pogosto spremlja tudi znižanje citosolnega pH [286]. in to zakisanje znotrajceličnega okolja naj bi vplivalo tudi na samo aktivacijo kaspaz, predvsem v primerih, ko sprožitev apoptoze spremlja sproščanje citokroma c in aktivacija eksekucijskih apoptotskih kaspaz poteče preko kompleksa apoptosom [44]. Poleg vpliva na samo proteolitično aktivnost apoptotskih kaspaz pa lahko nižji pH v mikrookolju tumorja vpliva tudi na samo sproščanje apoptotskih kaspaz. Kisel pH lahko namreč privede do razpada membranskih veziklov, ki jih sproščajo

tumorske celice in posledično sprostitve vsebine teh veziklov v mikrookolje tumorja [287]. V primeru apoptotskih kaspaz, ki se lahko po sprožitvi apoptoze zapakirajo v takšne membranske vezikle ali ob napredovanju apoptoze ostanejo zapakirane v apoptotskih telescih, bi kislo mikrookolje tumorja lahko dodatno pripomoglo k njihovemu sproščanju ne zgolj iz samih apoptotičnih celic ampak tudi iz membranskih veziklov ali apoptotskih telesc.

Apoptotske kaspaze so torej zaznavne v zunajceličnem okolju tumorskih celic in naše nadaljnje raziskave kažejo, da nato lahko cepijo zunajcelične domene različnih proteinov. Dosedanje študije so se namreč osredotočile na znotrajcelične substrate in posledično identificirale predvsem proteinske substrate, ki jih apoptotske kaspaze cepijo med normalnim potekom apoptoze [272]. Potencialni zunajcelični proteinski substrati pa do sedaj še niso bili identificirani, zato smo se osredotočili na le-te oziroma natančneje na membransko-usidrane proteine, ki sodelujejo tako pri adheziji celic in vzpostavljanju celičnih stikov kot tudi pri celičnem signaliziranju, torej procesih, ki so pogosto karakteristično spremenjeni v primeru rakavih obolenj [154, 276]. Po tretiranju celic modelne celične linije raka dojke MDA-MB-231 smo z masno spektrometrijo identificirali več kot 80 potencialnih substratov apoptotskih kaspaz-3 in -7 (slika 9). Za celično linijo raka dojke smo se odločili, ker so pri dosedanjih študijah raka dojke večkrat zaznali šeding oziroma proteolitično sproščanje zunajceličnih domen membransko-usidranih proteinov [192, 288]. Posledično modelne celične linije raka dojke predstavljajo dober model za raziskave potencialnih proteolitičnih cepitev zunajceličnih domen membransko-usidranih proteinov, ki lahko spremljajo nastanek in razvoj tumorja. V našem primeru smo torej ugotovili, da apoptotske kaspaze lahko cepijo zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov, pri čemer smo kot najbolj zaznavno tarčno apoptotskih kaspaz identificirali NRP-1. Po tretiranju z obema kaspazama smo namreč v šedomih zaznali signifikantno število peptidov, ki izvirajo iz zunajcelične domene NRP-1 (tabela 5), kar smo potrdili tudi z imunodetekcijo cepljenega fragmenta zunajcelične domene NRP-1 v šedomih zbranih po tretiranju celic MDA-MB-231 z rekombinantnima apoptotskima kaspazama-3 in -7 (slika 12). S tem smo pridobili prve dokaze, da apoptotske kaspaze prav tako lahko predstavljajo del mreže proteolitičnih encimov, ki oblikujejo mikrookolje tumorja, ampak pri še nismo upoštevali potencialnega vpliv nižjega pH, ki je pogosto prisoten v mikrookolju tumorja, na to zunajcelično aktivnost.

Glede na to, da smo z analizo encimske aktivnosti rekombinantnih apoptotskih kaspaz in sproščenih kaspaz v celičnem mediju apoptotičnih celic pokazali, da lahko kaspazno aktivnost zaznamo tudi v rahlo kislem pH-okolju, smo preverili tudi ali lahko v šedomih tretiranih celic MDA-MB-231 zaznamo fragmente zunajceličnih domen izbranih tarč tudi, če tretiranje izvedemo v okolju z nižjim pH. V primeru NRP-1 kot najbolj zaznavne zunajcelične tarče apoptotskih kaspaz-3 in -7 smo cepljen fragment zunajcelične domene v šedomu zaznali neodvisno od pH-okolja, medtem ko smo prisotnost cepljene domene CSPG4 pričakovano zaznali le v primeru tretiranja celic v nevtralnem pH-okolju (slika 22), saj smo z masno spektrometrijo CSPG4 identificirali le kot potencialni substrat kaspaze-3, ki pa v kislem pH-okolju izgubi svojo proteolitično aktivnost. Dodatno smo pokazali, da lahko v določenih puferskih okoljih tako pri kislem kot nevtralnem pH, zaznamo tudi prisotnost cepljene domene CD44 (slika 22), čeprav le-tega z masno spektrometrijo nismo identificirali kot potencialni substrat apoptotskih kaspaz. Na zunajcelično aktivnost kaspaz torej ključno vpliva tudi samo okolje v katerem se nahajajo, kar dodatno otežuje razjasnitev njihovih potencialnih zunajceličnih vlog.

Dodatni faktor, ki vpliva na razjasnitev zunajceličnih vlog apoptotskih kaspaz, je prisotnost drugih cisteinskih proteaz v zunajceličnem okolju. Cisteinski katepsini, ki so prav tako prisotni v zunajceličnem okolju in za katere so pokazali, da lahko cepijo zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov, namreč cepijo podoben nabor

zunajceličnih proteinskih substratov [77]. Posledično bi cepitve, ki smo jih pripisali zunajceličnim kaspazam, lahko bile posledica delovanja zunajceličnih cisteinskih katepsinov. Z analizo cepljenih fragmentov izbranih substratov smo pokazali, da se vzorec cepitev s strani apoptotskih kaspaz precej razlikuje od vzorca cepitev s cisteinskimi katepsini (slika 23). V primeru cisteinskih katepsinov smo namreč zaznali več cepljenih fragmentov, kar nakazuje, da cisteinski katepsini najverjetneje večkrat cepijo zunajcelične domene izbranih membransko-usidranih proteinov, medtem ko apoptotski kaspazi-3 in -7 cepita zunajcelične domene le enkrat, pri čemer navidezna velikost cepljenega fragmenta ustreza predvideni velikosti celotne zunajcelične domene. Razlika v številu cepitev in posledično v številu zaznanih cepljenih fragmentov zunajceličnih domen je najverjetneje posledica različne specifičnosti cisteinskih katepsinov in apoptotskih kaspaz. Apoptotske kaspaze imajo namreč precej bolj omejeno aktivno mesto, ki omogoča vezavo manjšega nabora substratov [112, 289]. Ravno nasprotno so cisteinski katepsini precej manj zahtevni, saj imajo manj omejeno aktivno mesto in lahko posledično cepijo substrate na več različnih cepitvenih mestih [48, 290-292]. Sposobnost cisteinskih katepsinov, da svoje substrate cepijo večkrat, je lahko tudi razlog, zakaj smo v primeru CSPG4 cepitve s cisteinskimi katepsini zaznali le v nevtralnem pH-okolju. Prisotnost cepljenih fragmentov CSPG4 smo namreč zaznali le v primeru tretiranja s katepsinom L, ki je najbolj aktiven v kislem pH-okolju, medtem ko v nevtralnem pH-okolju poteče njegova ireverzibilna inaktivacija [65]. Vseeno pa katepsin L kratkotrajno obdrži proteolitično aktivnost tudi pri nevtralnem pH, zato smo lahko zaznali prisotnost cepljenih fragmentov CSPG4, ki nakazujejo, da je CSPG4 tudi tarča katepsina L. V primeru CSPG4 so torej podatki primerjave cepitev s strani cisteinskih katepsinov in apoptotskih kaspaz najmanj informativni, saj ne moremo izključiti, da cisteinski katepsini povsem razgradijo zunajcelično domeno CSPG4, kar onemogoča zaznavo cepljenih fragmentov. Primerjava cepitev s strani cisteinskih katepsinov in apoptotskih kaspaz je torej dodatno pokazala, da cepitve, ki smo jih prvotno pripisali delovanju zunajcelično prisotnih apoptotskih kaspaz, res izvajajo le-te in da ne gre za cepitve cisteinskih katepsinov. Vseeno pa primerjava delovanja obeh skupin cisteinskih proteaz kaže, da je zunajcelična proteolitična dejavnost kaspaz precej šibkejša od dejavnosti cisteinskih katepsinov, zato lahko sklepamo, da v mikrookolju tumorja apoptotske kaspaze ne delujejo povsem samostojno ampak v kombinaciji z drugimi zunajceličnimi proteazami, ki tvorijo proteolitično mrežo tumorja.

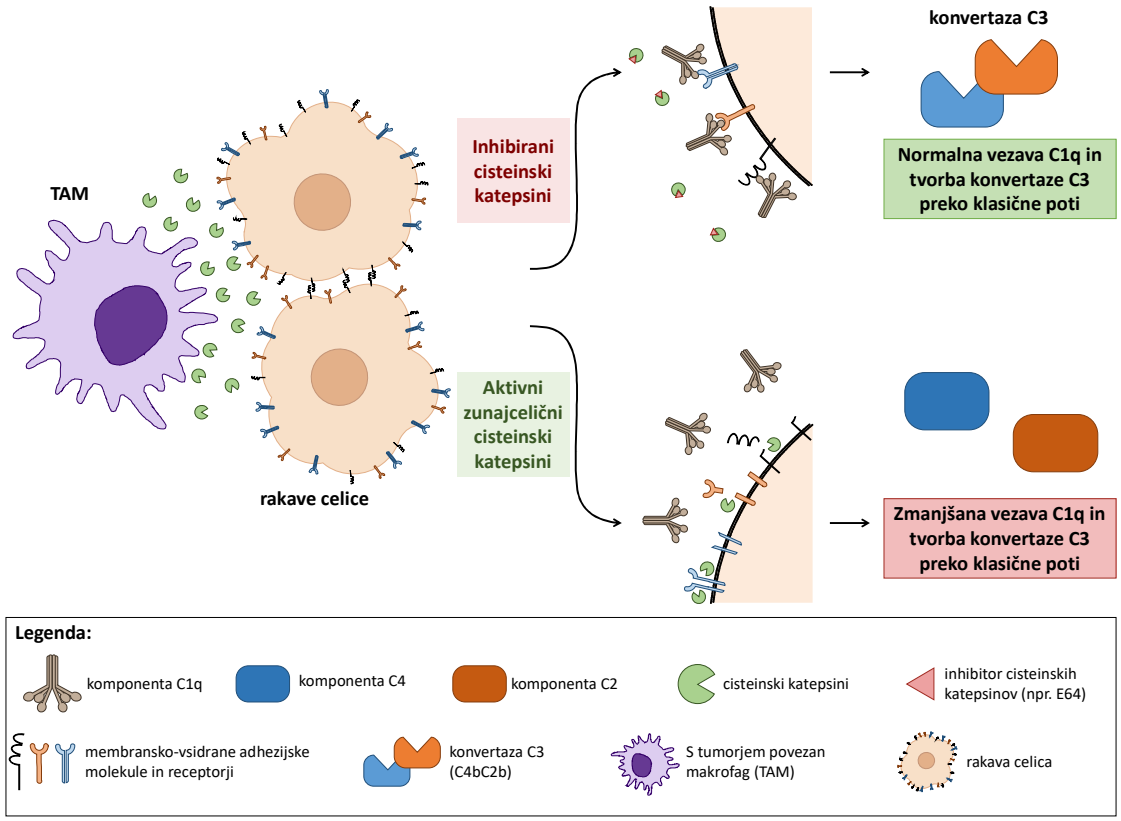
5.2 Vpliv zunajceličnih cisteinskih katepsinov na sistem komplementa

Za razliko od kaspaz, katerih potencialna zunajcelična vloga še ni povsem pojasnjena, pa so cisteinski katepsini, predvsem katepsina L in S, prepoznani kot šedaze, torej proteaze, ki lahko cepijo zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov [77]. Vseeno pa njihov vpliv na procese v zunajceličnem okolju, predvsem v primeru boleznskih stanj, ki jih spremlja vnetje, še ni povsem jasen. Ker so bolezni, ki jih spremlja vnetje, kot na primer rakava obolenja, povezane tudi s spremenjeno aktivacijo imunskega sistema [293], smo v okviru doktorske disertacije nadaljevali z raziskavami vpliva zunajceličnih cepitev s katepsinoma L in S na aktivacijo sistema komplementa (Sobotič et al., neobjavljeno, članek v pripravi), ki predstavlja eno glavnih komponent prirojene imunosti [234]. Če se osredotočimo na rakava obolenja, nas je najprej zanimalo katere celice v tumorskem mikrookolju sproščajo največ cisteinskih katepsinov v zunajcelični prostor. V skladu s predhodnimi raziskavami (Sobotič et al., neobjavljeno, članek v pripravi) smo pokazali, da cisteinske katepsine, natančneje katepsina L in S, v zunajcelični prostor sproščajo predvsem imunske celice, ki infiltrirajo mikrookolje tumorja [184, 294]. Najpogosteje gre za s

tumorjem povezane makrofage (TAMs), kar smo pokazali tudi v okviru doktorske disertacije, saj smo zaznavno katepsinsko aktivnost detektirali le v primeru s PMA-diferenciranih celic monocitne celične linije U937 (slika 24). V primerjavi z rakavimi celicami celične linije MDA-MB-231, s PMA-diferencirane celice celične linije U937 v zunajcelično okolje sproščajo tako aktivno kot pro-obliko cisteinskih katepsinov B, L in S, medtem ko lahko v sekretomu rakavih celic primarno zaznamo le pro-obliko vseh treh katepsinov (slika 25). Le-ta nima zaznavne encimske aktivnosti, zato ima zanemarljiv vpliv na zaznavno aktivnost cisteinskih katepsinov v zunajceličnem okolju, kjer se le-ti nahajajo v nM koncentraciji (slika 26).

Glede na predhodne raziskave v zvezi z zunajcelično proteolizo s strani cisteinskih katepsinov (Sobotič, 2015; Repnik, 2015) in eksopeptidazno naravo katepsina B [49], smo se osredotočili predvsem na cisteinska katepsina L in S, saj v primeru katepsina B nismo pričakovali značilnega vpliva na nadaljnje biološke procese. Pri tem smo se osredotočili na njun vpliv na aktivacijo sistema komplementa. Med membransko-usidranimi proteini, ki jih cepita katepsina L in S, je namreč tudi inhibitor aktivacije sistema komplementa CD55 oziroma faktor pospeševanja razpada komplementa [247]. Posledično smo pričakovali, da bo cepitev zunajcelične domene CD55 s strani obeh cisteinskih katepsinov privedla do manjše prisotnosti tega kofaktorja na membranah rakavih celic in povišane aktivacije sistema komplementa ter večje zaznavne depozicije komponent sistema komplementa na membranah rakavih celic. S tretiranjem celic celične linije MDA-MB-231 pa smo pokazali ravno obratno, saj smo v primeru tretiranja celic s cisteinskima katepsinoma L in S zaznali zmanjšano depozicijo komponente C3c (slika 27), kar nakazuje na zmanjšano aktivacijo sistema komplementa. Delovanje obeh katepsinov tako spremeni površino rakavih celic, da že v nM območju koncentracije skoraj popolnoma izničita depozicijo komponente C3c sistema komplementa na površino rakavih celic. V kaskadni aktivaciji sistema komplementa predstavlja komponenta C3c najbolj obstojno komponento multiproteinskega kompleksa C3, ki ga cepi konvertaza C3 [233]. Gre za točko aktivacije, ki je skupna vsem trem potem aktivacije sistema komplementa, zato smo v naslednjem koraku preverjali še depozicijo komponente C1q, ki je značilna le za klasično pot aktivacije sistema komplementa. Klasična pot aktivacije sistema komplementa je namreč tista, ki jo izkoriščamo tudi v okviru imunske terapije, saj komponenta C1q omogoča prepoznavanje s protitelesi označenih rakavih celic [233], in hkrati gre tudi za pot aktivacije, ki je v mikrookolju tumorja najmočneje aktivirana [295]. Naši rezultati kažejo, da oba cisteinska katepsina s svojim proteolitičnim delovanjem preprečita tudi depozicijo komponent C1q sistema komplementa, torej vplivata predvsem na klasično pot aktivacije sistema komplementa (slika 28, slika 29). Glede na to, da katepsina L in S, ne pa tudi katepsin B, v zunajceličnem prostoru cepita zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov [77], smo predvidevali, da pride do zmanjšanja depozicije komponente C1q sistema komplementa zaradi odstranitve njenih vezavnih partnerjev s površine celične membrane. V osnovi komponenta C1q z globularno glavo spozna konstantno Fc regijo protiteles in se veže na celice, ki jih je imunski sistem spoznal kot tujek in jih označil s protitelesi [233]. Naši rezultati pa kažejo, da na površini rakavih celic obstajajo tudi direktni vezavni partnerji komponente C1q. Z masno spektrometrijo smo namreč identificirali vezavne partnerje komponente C1q (Sobotič et al, neobjavljeno, članek v pripravi), ki so hkrati že znani zunajcelični substrati katepsinov L in S [77]. Med temi substrati smo se posebej osredotočili na CD44 in NRP-1 in z imunodetekcijo potrdili proteolizo njunih zunajceličnih domen s strani cisteinskih katepsinov L in S (slika 30). Na primeru NRP-1 smo cepitev njegove zunajcelične domene s strani katepsinov L in S kvantificirali tudi s pretočno citometrijo (slika 31) ter ugotovili, da oba skoraj popolnoma odstranita zunajcelično domeno NRP-1 s celične membrane rakavih celic. Oba transmembranska receptorja smo izbrali, ker bi, glede na njuno vlogo v mikrookolju tumorja, zunajcelična proteoliza njunih ektodomen lahko

neposredno ali posredno vplivala na aktivacijo sistema komplementa. Mehanistično gledano namreč predvidevamo nov mehanizem vpliva katepsinov L in S na aktivacijo sistema komplementa, in sicer regulacijo aktivacije preko odcepitve zunajceličnih domen vezavnih partnerjev komponente C1q s celične membrane rakavih celic (slika 36). Takšen mehanizem se razlikuje od predhodno opisanega mehanizma s katerim zunajcelični katepsin L lahko vpliva na aktivacijo sistema komplementa. Za zunajcelični katepsin L so namreč pokazali, da lahko v primeru melanoma, cepi C3 konvertazo in tako blokira nadaljnjo kaskado aktivacije sistema komplementa [296], medtem ko za katepsin S ali katepsin B takšne vloge niso pokazali.



Slika 36: Cisteinska katepsina L in S s proteolitično cepitvijo zunajceličnih domen membransko-usidranih proteinov vplivata na aktivacijo sistema komplementa v tumorskem mikrookolju. Cepitve, ki jih katalizirata cisteinska katepsina L in S, spremenijo površino rakavih celic in tako onemogočijo vezavo C1q ter aktivacijo sistema komplementa preko klasične poti.

V našem primeru gre torej za vpliv katepsinov L in S na aktivacijo sistema komplementa preko zunajcelične proteolize membransko-usidranih proteinov, ampak sam mehanizem še ni povsem jasen. Zunajcelična proteoliza ektodomen membransko-usidranih proteinov lahko namreč na več načinov vpliva na aktivacijo sistema komplementa. Glede na predhodne raziskave (Sobotič et al., neobjavljeno, članek v pripravi) lahko predvidevamo, da gre vsaj delno za direkten vpliv na depozicijo predvsem komponente C1q preko odcepljanja membransko-usidranih vezavnih partnerjev te komponente, hkrati pa ne moremo zanemariti tudi možnosti posrednega vpliva. Po cepitvi bi tudi prosti cepljeni fragmenti ektodomen membransko-usidranih vezavnih partnerjev komponente C1q lahko v mikrookolju tumorja interagirali s komponento C1q in tako privedli do zmanjšanja njene depozicije na membrane rakavih celic. V obeh primerih lahko pričakujemo, da bo

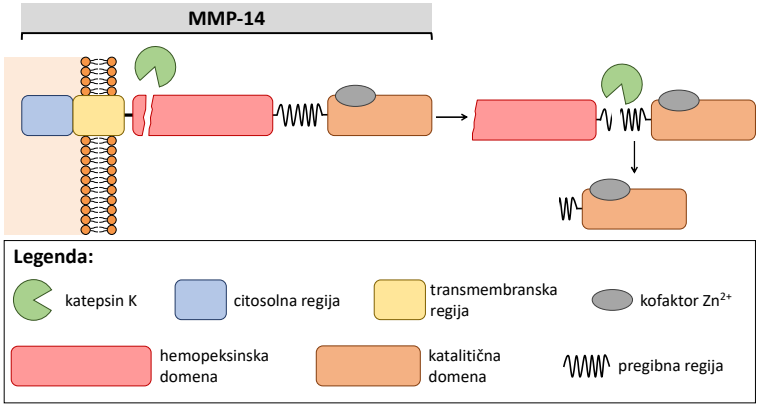
zmanjšanje depozicije komponente C1q privedlo tudi do šibkejše aktivacije sistema komplementa in s tem pripomoglo k imunosupresivni naravi mikrookolja tumorja.

Komponenta C1q je namreč del kompleksa C1 in je strukturno sestavljena iz globularne domene, ki je ključna za vezavo na konstantno regijo (Fc) protiteles IgM in IgG, in fibrilarne regije, ki je bogata z glicini in prolini ter po strukturi podobna trojni vijačnici kolagena in ključna za sestavljanje kompleksa C1 [297]. Globularna domena komponente C1q torej služi za prepoznavo antigenov in poleg osnovne vloge prepoznavanja s protitelesi označenih celic ali tujkov omogoča tudi vezavo komponente C1q direktno na molekule prisotne na celični membrani ali na membrano samo [298], kar pogosto poteče preko elektrostatične interakcije med pozitivno nabito površino globularne domene C1q in negativno nabito površino celične membrane ali komponent le-te [299]. Zaradi te strukturne narave komponente C1q, ni presenetljivo, da so predhodne raziskave med identificiranimi zunajceličnimi substrati cisteinskih katepsinov L in S identificirale tudi več vezavnih partnerjev komponente C1q (Sobotič et al., neobjavljeno, članek v pripravi). Če se mehanistično osredotočimo na CD44 in NRP-1, gre za celična receptorja, ki sta prekomerno izražena na celični membrani rakavih celic in posledično ju obravnavamo tudi kot kandidatna receptorja za tarčno zdravljenje rakavih obolenj [300, 301]. V primeru CD44 gre za receptor z več funkcijami, med katerimi je tudi vezava hialuronana, anionskega glikozaminoglikana, ki v primeru rakavih obolenj ustvarja mikrookolje z ugodnimi pogoji za angiogenezo, invazijo in metastaziranje rakavih celic [302]. Predvidevamo, da cepitev zunajcelične domene CD44 s strani katepsina L ali S zmanjša količino vezanega hialuronana na površini rakavih celic in s tem negativni naboj celične membrane, kar bi lahko pojasnilo zaznavno nižjo depozicijo komponente C1q v primeru zunajceličnega delovanja katepsinov L in S. Delovanje obeh katepsinov lahko torej v primeru cepitev zunajcelične domene CD44, tudi posredno vpliva na aktivacijo sistema komplementa preko vpliva na negativni naboj celične membrane rakavih celic. V primeru receptorja NRP-1 pa gre pri regulaciji aktivacije sistema komplementa za neposredno posledico cepitve njegove zunajcelične domene. Strukturno namreč NRP-1 vsebuje več domen CUB, ki so ključne za sestavljanje kompleksa C1, saj vežejo kolagenski trojni vijačnici podobne regije komponent C1q, C1r in C1s, ki sestavljajo ta kompleks [303]. Cepitev zunajcelične domene NRP-1 s strani katepsinov L in S najverjetneje direktno onemogoči sestavljanje kompleksa C1, kar ošibi aktivacijo sistema komplementa preko klasične poti aktivacije. Poleg vpliva na začetne stopnje aktivacije sistema komplementa pa so za NRP-1 pokazali tudi možnost vpliva na nadaljnjih stopnjah aktivacije, saj lahko deluje kot receptor za fragmente komponent sistema komplementa, ki se tekom aktivacije vežejo na površino celic in delujejo kot opsonini [304]. Šibkejša opsonizacija celic v tumorskem mikrookolju prav tako lahko privede do manjše aktivacije sistema komplementa in s tem pripomore k imunosupresivnim pogojem, ki omogočajo nastanek in napredovanje tumorja.

5.3 Vpliv zunajceličnega katepsina K na adhezijo rakavih celic

Poleg cisteinskih katepsinov L in S, za katere so že pokazali, da lahko v zunajceličnem prostoru delujeta kot šedazi, pa se v zunajceličnem prostoru lahko nahaja tudi cisteinski katepsin K. Za razliko od katepsinov L in S, ki se v zunajceličnem okolju nahajata skoraj izključno v primeru patoloških stanj, sodeluje katepsin K pri procesu resorpcije kosti, zato ga tudi v fizioloških pogojih lahko zaznamo v zunajceličnem prostoru predvsem v področju resorpcijskih lakun [305]. V patoloških pogojih pa zunajcelično aktivnost katepsina K povezujemo predvsem z nastankom in razvojem z vnetjem povezanih bolezni in bolezni za katere je značilno, da jih spremlja preoblikovanje tkiva. Primeri takšnih bolezni so

osteoporoza, revmatoidni artritis, kardiovaskularne bolezni, debelost in različne nevrološke bolezni [306]. Poleg teh bolezni, pa sta povečano izražanje in spremenjena encimska aktivnost katepsina K značilna tudi za razvoj in napredovanje rakavih obolenj, pri čemer gre najpogosteje za vpliv katepsina K na invazivnost rakavih celic. V zunajceličnem prostoru namreč katepsin K razgrajuje komponente zunajceličnega matriksa, in s tem igra eno ključnih vlog v preoblikovanju zunajceličnega matriksa v mikrookolju tumorja [307]. Poleg teh že znanih vlog katepsina K, pa smo v okviru predhodnih raziskav (Vizovišek et al., neobjavljeno, članek v pripravi) pokazali, da lahko katepsin K, podobno kot katepsina L in S, cepi tudi zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov. Med membransko-usidranimi proteini, ki smo jih identificirali kot potencialne tarče katepsina K, je tudi matriksna metaloproteaza membranskega tip MMP-14, ki je ena izmed ključnih zunajceličnih proteaz z vlogo v razgradnji komponent zunajceličnega matriksa [189, 190]. Posledično smo v okviru doktorske disertacije poskušali razjasniti ali lahko zunajcelična proteoliza ektodomene MMP-14 s strani katepsina K sproži aktivacijo MMP-14 in s tem nadaljnjo aktivacijo zunajceličnih metaloproteaz, predvsem MMP-2 in MMP-9.



Slika 37: Cisteinski katepsin K sprosti metaloproteazo matriksa MMP-14 z membrane rakavih celic. Katepsin K najverjetneje cepi MMP-14 znotraj hemopleksinske domene, kar odcepi skoraj celotno zunajcelično regijo z membrane. Nadalje poteče tudi sprostitev katalitične domene, ki je prav tako lahko posledica delovanja katepsina K.

Cepitev zunajcelične domene MMP-14 s katepsinom K smo v okviru predhodnih raziskav (Vizovišek et al., neobjavljeno, članek v pripravi) zaznali ob tretiranju rakavih celic modelne celične linije malignega melanoma HT-144 in z imunodetekcijo smo potrdili, da lahko v šedomih tretiranih celic zaznamo cepljena fragmenta zunajcelične domene MMP-14 (slika 32). Prisotnost dveh fragmentov nakazuje, da bi katepsin K lahko zunajcelično domeno MMP-14 cepil na več mestih, in sicer tik ob celični membrani znotraj hemopleksinske domene ter nato še znotraj variabilne regije, ki povezuje hemopleksinsko in katalitično domeno (slika 37). Ravno zaznavnost proste katalitične domene MMP-14 v šedomu tretiranih celic, nakazuje na potencialno aktivacijsko vlogo katepsina K v proteolitični mreži matriksnih metaloproteaz. Do sedaj so namreč že pokazali več povezav med različnimi matriksnimi metaloproteazami in delovanjem katepsina K. Med drugim so pokazali, da lahko pri različnih oblikah raka hkrati zaznamo povišano izražanje katepsina K in metaloproteaz MMP-14 ali MMP-9, pri čemer je le-to povezano z večjo invazivnostjo rakavih celic, njihovim metastaziranjem in slabšo prognozo bolezni [308, 309]. Dodatno so pokazali tudi, da lahko katepsin K direktno aktivira MMP-9 preko cepitve njene pro-oblike [310], kar pomeni, da delovanje katepsina K ni nujno omejeno na sprožanje aktivacijske kaskade preko MMP-14 ampak lahko potencialno deluje tudi direktno na zunajcelične

metaloproteaze matriksa. V skladu s temi že znanimi funkcijami katepsina K, tudi naši rezultati kažejo na potencialno povišano proteolitično aktivnost v šedomih tretiranih celic. Rezultati detekcije želatinazne aktivnosti namreč kažejo na višjo želatinazno aktivnost v šedomih tretiranih celic, ki je vsaj delno odvisna od pH-okolja in inhibicije MMP-jev (slika 33A). Zaznavanje želatinazne aktivnosti je namreč osnovna tehnika detekcije aktivnosti matriksnih metaloproteaz [311], vendar ne omogoča enoznačne identifikacije proteaz, ki so odgovorne za zaznano aktivnost. Za razjasnitev povezave med povišano želatinazno aktivnostjo v šedomih celic tretiranih s katepsinom K in aktivnostjo matriksnih metaloproteaz potrebujemo nadaljnje raziskave.

Potencialna aktivacijska zanka, ki povezuje zunajcelično aktivnost katepsina K s proteolitično mrežo MMP-jev, bi namreč lahko pojasnila opažanja, ki povezujejo izražanje katepsina K s povečano sposobnostjo metastaziranja rakavih celic [307, 312]. Za metastaziranje in invazivnost rakavih celic je ključen proces adhezije rakavih celic, pri čemer gre tako za pritrjevanje celic na podlago kot tudi za celične stike med njimi. Tako za MMP-je kot za cisteinske katepsine so tako že pokazali, da cepijo tudi adhezijske molekule in molekule medceličnih stikov ter tako spodbujajo epitelijsko-mezenhimski prehod in migracijo rakavih celic [191, 194-196] Posledično ni presenetljivo, da smo tudi v primeru tretiranja celic z rekombinantnim katepsinom K zaznali značilno zmanjšanje adhezije rakavih celic (slika 34). S spremljanjem celic s svetlobno mikroskopijo smo pokazali, da v prisotnosti katepsina K poteče odlepljanje rakavih celic od podlage, ki ga popolnoma prepreči dodatek inhibitorja katepsinov E-64, medtem ko dodatek inhibitorjev MMP-jev nima statistično značilnega vpliva. V prisotnosti inhibitorjev MMP-jev smo namreč zaznali le statistično neznačilno hitrejše odlepljanje rakavih celic, zato ne moremo enoznačno potrditi, da je zunajcelična aktivnost katepsina K vpliva na metastaziranje in invazivnost rakavih celic tako preko direktnih cepitev komponent zunajceličnega matriksa kot tudi preko nadaljnje aktivacije MMP-jev, ki so prisotni v mikrookolju tumorja. Dodatno smo odlepljanje celic primerjali tudi z nespecifičnim encimskim odlepljanjem, ki ga in vitro dosežemo z uporabo tripsina. Tripsin je serinska proteaza, ki neselektivno cepi mnoge transmembranske proteine in posledično ga najpogosteje uporabljamo za encimsko odlepljanje celic in obdelavo tkiv [313]. Pričakovano smo torej v primeru uporabe tripsina zaznali posamezne odlepljene rakave celice, saj je tripsin neselektivno vplival tako na adhezijo celic kot na medcelične stike med njimi. V primeru tretiranja s katepsinom K pa smo zaznali drugačen vzorec odlepljanja celic, sej so le-te po izgubi adhezije tvorile skupke (slika 34). Povezovanje odlepljenih rakavih celic v skupke je prva stopnja v procesu kolektivne migracije celic, ki naj bi mehanistično predstavljala osnovo obliko invazije rakavih celic [314, 315]. Zaznavanje celičnih skupkov v primeru tretiranja celic s katepsinom K odpira možnost, da vpliv katepsina K na invazivnost rakavih celic ni omejen samo na preoblikovanje zunajceličnega matriksa v mikrookolju tumorja, ampak obsega tudi direktno selektivno proteolizo membransko-usidranih proteinov s celične membrane celic, ki omogoča nastanek migracijskih celičnih skupkov značilnih za metastaziranje rakavih celic. Z nadaljnjimi raziskavami je smotrno razjasniti, ali gre za direkten vpliv proteolize adhezijskih molekul in molekul medceličnih stikov s strani katepsina K, ali pa zunajcelično prisoten katepsin K aktivira MMP-je, ki so nato odgovorni za selektvino proteolizo membransko-usidranih proteinov, ki omogoči nastanek migracijskih celičnih skupkov.

Poglavje 6

Zaključki

Raziskave predstavljene v doktorski disertaciji prinašajo nova spoznanja v povezavi z zunajcelično proteolizo v mikrookolju tumorja. V okviru disertacije smo pokazali, da lahko poleg že znanih zunajceličnih proteaz v zunajceličnem okolju zaznamo tudi aktivne apoptotske kaspaze. Njihova prisotnost v zunajceličnem okolju je sicer omejena le na posebne okoliščine, ko apoptotične rakave celice niso pravočasno odstranjene in preidejo v sekundarno nekrozo, zato gre najverjetneje za proteaze, ki v mikrookolju tumorja delujejo kot del proteolitične mreže in skupaj z ostalimi zunajceličnimi proteazami vplivajo na lastnosti tumorskih celic in signalne procese v mikrookolju tumorja. Pokazali smo namreč, da lahko apoptotski kaspazi-3 in -7, podobno kot cisteinski katepsini in metaloproteaze, cepita zunajcelične domene membransko-usidranih proteinov, vendar je njihova aktivnost v primerjavi s cisteinskimi katepsini precej šibkejša.

Poleg apoptotskih kaspaz pa smo v okviru doktorske disertacije poskušali nadalje razjasniti tudi vpliv zunajceličnih cepitev s strani cisteinskih katepsinov na različne biološke procese v mikrookolju tumorja. Pokazali smo, da cisteinska katepsina L in S v mikrookolju tumorja s cepitvami zunajceličnih domen membransko-usidranih proteinov lahko sodelujeta pri regulaciji aktivacije imunskega odziva. Po tretiranju rakavih celic z obema katepsinoma smo namreč zaznali zmanjšano depozicijo komponent sistema komplementa na površino celic, kar nakazuje na šibkejšo aktivacijo sistema komplementa in se sklada z opaženo nizko ravnjo aktivacije imunskega odziva v imunosupresivnem mikrookolju tumorja.

Raziskovali pa smo tudi zunajcelično vlogo katepsina K in pokazali, da lahko le-ta, poleg že znanih zunajceličnih substratov cisteinskih katepsinov, cepi tudi zunajcelično domeno metaloproteaze MMP-14. Nadalje smo v šedomih celic tretiranih s katepsinom K zaznali tudi povišano želatinazno aktivnost, kar bi lahko nakazovalo, da lahko katepsin K s cepitvijo zunajcelične domene metaloproteaze MMP-14 sproži nadaljnjo kaskadno aktivacijo zunajceličnih metaloproteaz, ampak le-tega nismo uspeli pokazati. Prav tako nismo uspeli nedvoumno razjasniti, ali je izguba adhezije, ki jo opazimo po tretiranju rakavih celic s katepsinom K, posledica zgolj direktnih proteolitičnih cepitev s katepsinom K ali pa gre potencialno tudi za vpliv katepsina K na aktivacijo metaloproteaz v mikrookolju tumorja.

Predstavljene raziskave torej hkrati dodatno razjasnjujejo zunajcelične vloge cisteinskih proteaz, apoptotskih kaspaz in cisteinskih katepsinov, v mikrookolju tumorja in odpirajo nova vprašanja na področju atipične zunajcelične proteolize, ki spremlja rakava obolenja.

Dodatek A

Zunajcelična vloga apoptotskih kaspaz-3 in -7

A.1 Identificirani substrati apoptotske kaspaze-3

Tabela 7: Seznam vseh identificiranih zunajceličnih substratov apoptotske kaspaze-3 s celične linije MDA-MB-231. V tabeli so predstavljena pripadajoča števila identifikacijskih spektrov MS/MS za vse eksperimentalne pogoje in izračunano razmerje SCR.

			Število identifikacijskih spektrov MS/MS				
Ime proteina	**Ime gena**	**UniProt KB ID**	**zVAD-FMK ctrl**	**zVAD-FMK E-64 ctrl**	**0,2 µM casp3**	**1 µM casp3**	**SCR**
Protokadherin Fat 1	FAT1	Q14517	2	0	18	20	21,0
Receptorska protein-tirozin fosfataza gama	PTPRG	P23470	0	0	5	22	23,0
Nesprin 2	SYNE2	Q8WXH0	0	0	13	20	21,0
Protein 1 jedrnega mitotskega aparata	NUMA1	Q14980	6	4	27	68	13,8
Proteinska disulfidna izomeraza	P4HB	P07237	8	2	25	39	13,3
Receptor za hepatocitni rastni faktor	MET	P08581	1	0	4	10	11,0
Integrin alfa 6	ITGA6	P23229	1	0	4	10	11,0
Nevropilin 1	NRP1	O14786	7	4	26	51	10,4
Faktor pospeševanja razpada komplementa	CD55	P08174	2	0	4	9	10,0
Dezmoplakin	DSP	P15924	0	0	0	7	8,0
Poglavitni prionski protein	PRNP	P04156	1	0	4	7	8,0
Glikoprotein CD59	CD59	P13987	2	0	7	6	7,0
Receptor za LDL	LDLR	P01130	2	0	4	6	7,0
Topen NSF vezavni protein alfa	NAPA	P54920	1	0	2	6	7,0
Efrinski receptor 2 tip B	EPHB2	P29323	0	0	3	6	7,0

Antigen CD151	CD151	P48509	0	0	2	6	7,0
Copine 3	CPNE3	O75131	1	2	9	18	6,3
Protein SUMO 1	SUMO1	P63165	0	0	3	5	6,0
Beta-1 podenota Na+/K+-prenašalne ATPaze	ATP1B1	P05026	1	0	4	5	6,0
Nevronska celična adhezijska molekula L1	L1CAM	P32004	4	1	4	11	6,0
Integrin alfa 3	ITGA3	P26006	7	3	22	22	5,8
Semaforin 4B	SEMA4B	Q9NPR2	0	0	2	4	5,0
Beta 2 sintrofin	SNTB2	Q13425	0	0	3	4	5,0
Regulatorni kofaktor 1 za izmenjavo Na^+/H^+ NHE-RF1	NHERF1	O14745	1	0	3	4	5,0
Trombomodulin	THBD	P07204	0	0	1	4	5,0
Možganski kislinsko topen protein 1	BASP1	P80723	0	0	0	4	5,0
Tip C manoznega receptorja 2	MRC2	Q9UBG0	0	0	2	4	5,0
Znotrajcelična adhezijska molekula 1	ICAM1	P05362	0	0	1	4	5,0
Regulatorni kofaktor 2 za izmenjavo Na+/H+ NHE-RF2	NHERF2	Q15599	0	0	1	4	5,0
Bazalna celična adhezijska molekula	BCAM	P50895	3	2	4	13	4,7
Semaforin 4D	SEMA4D	Q92854	2	1	5	8	4,5
Celični površinski glikoprotein MUC18	MCAM	P43121	2	1	6	8	4,5
Teneurin 3	TENM3	Q9P273	0	2	7	12	4,3
Drebrinu-podoben protein	DBNL	Q9UJU6	2	3	6	16	4,3
LDL receptorju soroden protein 5	LRP5	O75197	2	4	15	19	4,0
Protein motoričnega nevrona 1, bogat s cisteinom	CRIM1	Q9NZV1	0	0	2	3	4,0
Protein lin-7 homolog C	LIN7C	Q9NUP9	8	1	2	7	4,0
Receptorska protein-tirozin fosfataza mi	PTPRM	P28827	0	0	3	3	4,0
GTPaza HRas	HRAS	P01112	4	1	8	7	4,0
Proteinska disulfidna izomeraza A6	PDIA6	Q15084	8	3	14	15	4,0
Sintenin 1	SDCBP	O00560	1	1	2	7	4,0
Ras-u soroden protein Ral-A	RALA	P11233	2	1	4	7	4,0
Z lizosomalno membrano povezan glikoprotein 1	LAMP1	P11279	0	0	1	3	4,0
Ras-u soroden protein Rab-13	RAB13	P51153	1	0	2	3	4,0
Notch homolog protein nevrogenega lokusa 2	NOTCH2	Q04721	0	0	2	3	4,0
Proteazni inhibitor Kunitzovega tipa 1	SPINT1	O43278	0	0	1	3	4,0

Nektin 2	NECTIN2	Q92692	0	0	0	3	4,0
Alfa regulatorna podenota od cAMP-odvisne protein-tirozin kinaze tipa I	PRKAR1A	P10644	9	4	17	18	3,8
Antigen CD166	ALCAM	Q13740	15	9	26	36	3,7
LDL receptorju soroden protein 6	LRP6	O75581	1	1	0	6	3,5
Katalitična podenota alfa proteinske fosfataze 3	PPP3CA	Q08209	2	3	16	13	3,5
Semaforin 7A	SEMA7A	O75326	1	1	2	6	3,5
Prekurzorski protein amiloida beta	APP	P05067	2	1	4	6	3,5
S tumorjem povezan pretvornik kalcijevega signala 2	TACSTD2	P09758	0	1	2	6	3,5
Sortilin	SORT1	Q99523	0	1	4	6	3,5
S caveolao povezan protein 1	CAVIN1	Q6NZI2	22	17	53	58	3,3
Protein-kinaza C in protein 2, substrat kazein-kinase v nevronih	PACSIN2	Q9UNF0	2	4	5	15	3,2
Makrofagne kolonije stimulirajoči factor 1	CSF1	P09603	13	10	18	33	3,1
Ras-u soroden protein Rab-27B	RAB27B	O00194	0	0	1	2	3,0
Član 15 naddružine ligandov tumorja nekrotizirajočih faktorjev	TNFSF15	O95150	2	0	3	2	3,0
Antigen CD9	CD9	P21926	1	0	2	2	3,0
Mezotelin	MSLN	Q13421	6	3	10	11	3,0
Hondroitin sulfat proteoglikan 4	CSPG4	Q6UVK1	67	52	110	158	3,0
Protein S100-A8	S100A8	P05109	0	0	4	2	3,0
Antigen CD81	CD81	P60033	1	0	2	2	3,0
Homolog s sortiranjem proteinov v vakuole povezaneg proteina 28	VPS28	Q9UK41	4	2	7	8	3,0
Podenota alfa gvanin nukleotid-vezavnga proteina G(q)	GNAQ	P50148	0	0	0	2	3,0
Protein 57, ki vsebuje z levcini bogato ponovitev	LRRC57	Q8N9N7	0	0	0	2	3,0
Semaforin 6B	SEMA6B	Q9H3T3	0	0	0	2	3,0
Aducin gama	ADD3	Q9UEY8	0	0	0	2	3,0

A.2 Identificirani substrati apoptotske kaspaze-7

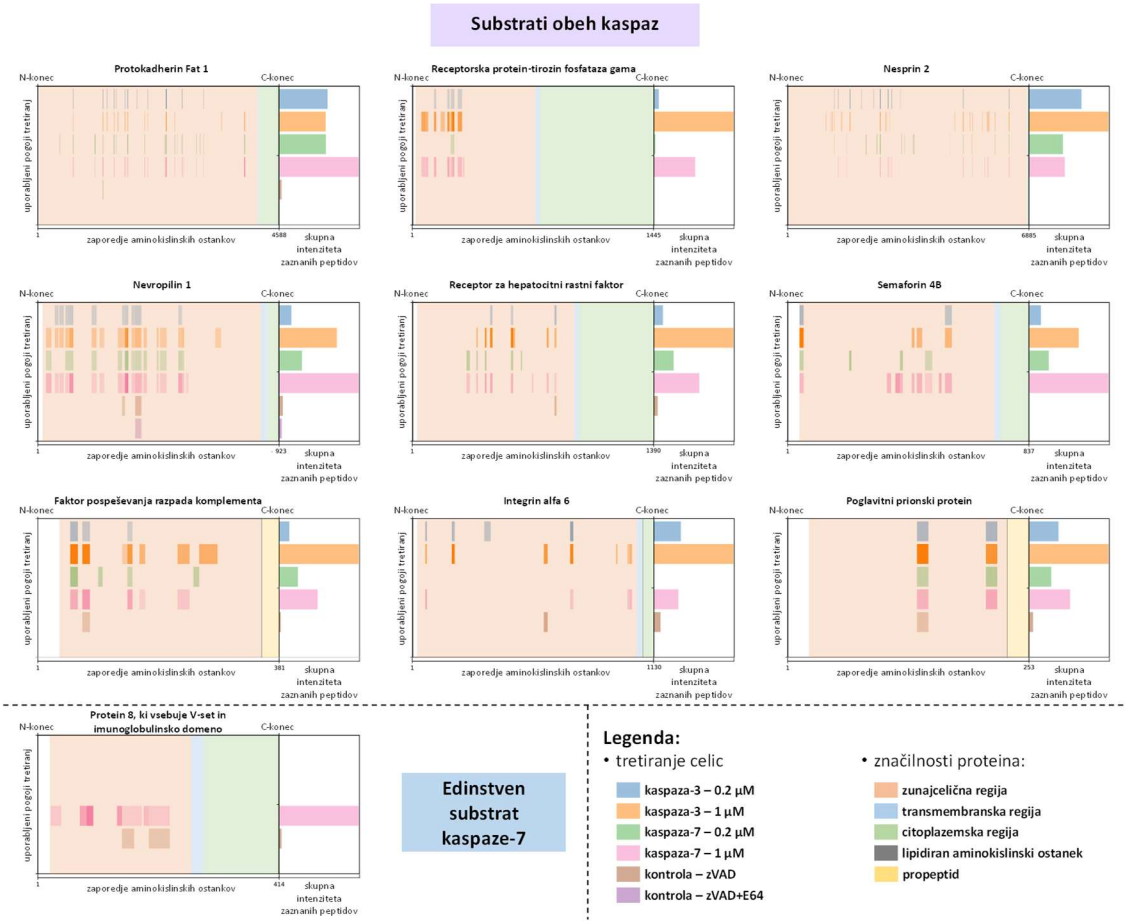
Tabela 8: Seznam vseh identificiranih zunajceličnih substratov apoptotske kaspaze-7 s celične linije MDA-MB-231. V tabeli so predstavljena pripadajoča števila identifikacijskih spektrov MS/MS za vse eksperimentalne pogoje in izračunano razmerje SCR.

			Število identifikacijskih spektrov MS/MS				
Ime proteina	**Ime gena**	**UniProt KB ID**	**zVAD-FMK ctrl**	**zVAD-FMK E-64 ctrl**	**0,2 µM casp7**	**1 µM casp7**	**SCR**
Protokadherin Fat 1	FAT1	Q14517	2	0	25	31	32,0
Dezmoplakin	DSP	P15924	0	0	3	24	25,0
Receptorska protein-tirozin fosfataza gama	PTPRG	P23470	0	0	2	21	22,0
Protein 1 jedrnega mitotskega aparata	NUMA1	Q14980	6	4	90	102	20,6
Protein 8, ki vsebuje V-set in imunoglobulinsko domeno	VSIG8	P0DPA2	4	0	0	17	18,0
Proteinska disulfidna izomeraza	P4HB	P07237	8	2	38	36	12,3
Semaforin 4B	SEMA4B	Q9NPR2	0	0	4	11	12,0
Nevropilin 1	NRP1	O14786	7	4	37	57	11,6
Nesprin 2	SYNE2	Q8WXH0	0	0	14	10	11,0
Receptor za hepatocitni rastni faktor	MET	P08581	1	0	5	8	9,0
Protein 15, ki vsebuje z levcini bogato ponovitev	LRRC15	Q8TF66	0	0	0	8	9,0
Ras-u soroden protein Rab-27B	RAB27B	O00194	0	0	2	7	8,0
Faktor pospeševanja razpada komplementa	CD55	P08174	2	0	5	6	7,0
Protein SUMO 1	SUMO1	P63165	0	0	5	6	7,0
Beta 2 sintrofin	SNTB2	Q13425	0	0	1	6	7,0
Regulatorni kofaktor 1 za izmenjavo Na^+/H^+ NHE-RF1	NHERF1	O14745	1	0	4	6	7,0
Poglavitni prionski protein	PRNP	P04156	1	0	3	5	6,0
Glikoprotein CD59	CD59	P13987	2	0	8	5	6,0
LDL receptorju soroden protein 5	LRP5	O75197	2	4	21	27	5,6
LDL receptorju soroden protein 6	LRP6	O75581	1	1	8	10	5,5
Integrin alfa 6	ITGA6	P23229	1	0	0	4	5,0
Beta-1 podenota Na+/K+-prenašalne ATPaze	ATP1B1	P05026	1	0	4	4	5,0
Trombomodulin	THBD	P07204	0	0	1	4	5,0

Protein motoričnega nevrona 1, bogat s cisteinom	CRIM1	Q9NZV1	0	0	7	4	5,0
Protein lin-7 homolog C	LIN7C	Q9NUP9	8	1	11	9	5,0
Veliki z Disk-om povezan protein 4	DLGAP4	Q9Y2H0	0	0	4	4	5,0
Integrin alfa 3	ITGA3	P26006	7	3	16	18	4,8
Alfa regulatorna podenota od cAMP-odvisne protein-tirozin kinaze tipa I	PRKAR1A	P10644	9	4	18	22	4,6
Receptor za LDL	LDLR	P01130	2	0	1	3	4,0
Topen NSF vezavni protein alfa	NAPA	P54920	1	0	4	3	4,0
Receptorska protein-tirozin fosfataza mi	PTPRM	P28827	0	0	2	3	4,0
GTPaza HRas	HRAS	P01112	4	1	8	7	4,0
Član 15 naddružine ligandov tumorja nekrotizirajočih faktorjev	TNFSF15	O95150	2	0	0	3	4,0
Potein KCTD12, ki vsebuje domeno BTB/POZ	KCTD12	Q96CX2	1	1	6	7	4,0
Stromalni z membrano povezan protein 1	SMAP1	Q8IYB5	0	0	1	3	4,0
Katalitična podenota alfa proteinske fosfataze 3	PPP3CA	Q08209	2	3	21	14	3,8
RuvB-u podoben protein 2	RUVBL2	Q9Y230	5	6	26	25	3,7
Copine 3	CPNE3	O75131	1	2	7	10	3,7
Semaforin 4D	SEMA4D	Q92854	2	1	6	6	3,5
Povezovalni dejavnik mikrotubul in aktina 1, izoforme 1/2/3/4/5	MACF1	Q9UPN3	161	67	227	224	3,3
Proteinska disulfidna izomeraza A6	PDIA6	Q15084	8	3	8	12	3,3
Podenota alfa 11 gvanin nukleotid-vezavnega proteina	GNA11	P29992	4	4	5	15	3,2
Vimentin	VIM	P08670	111	106	263	328	3,1
Efrinski receptor 2 tip B	EPHB2	P29323	0	0	1	2	3,0
Možganski kislinsko topen protein 1	BASP1	P80723	0	0	0	2	3,0
Celični površinski glikoprotein MUC18	MCAM	P43121	2	1	3	5	3,0
Teneurin 3	TENM3	Q9P273	0	2	7	8	3,0
Sintenin 1	SDCBP	O00560	1	1	4	5	3,0
Ras-u soroden protein Ral-A	RALA	P11233	2	1	6	5	3,0
Z lizosomalno membrano povezan glikoprotein 1	LAMP1	P11279	0	0	2	2	3,0

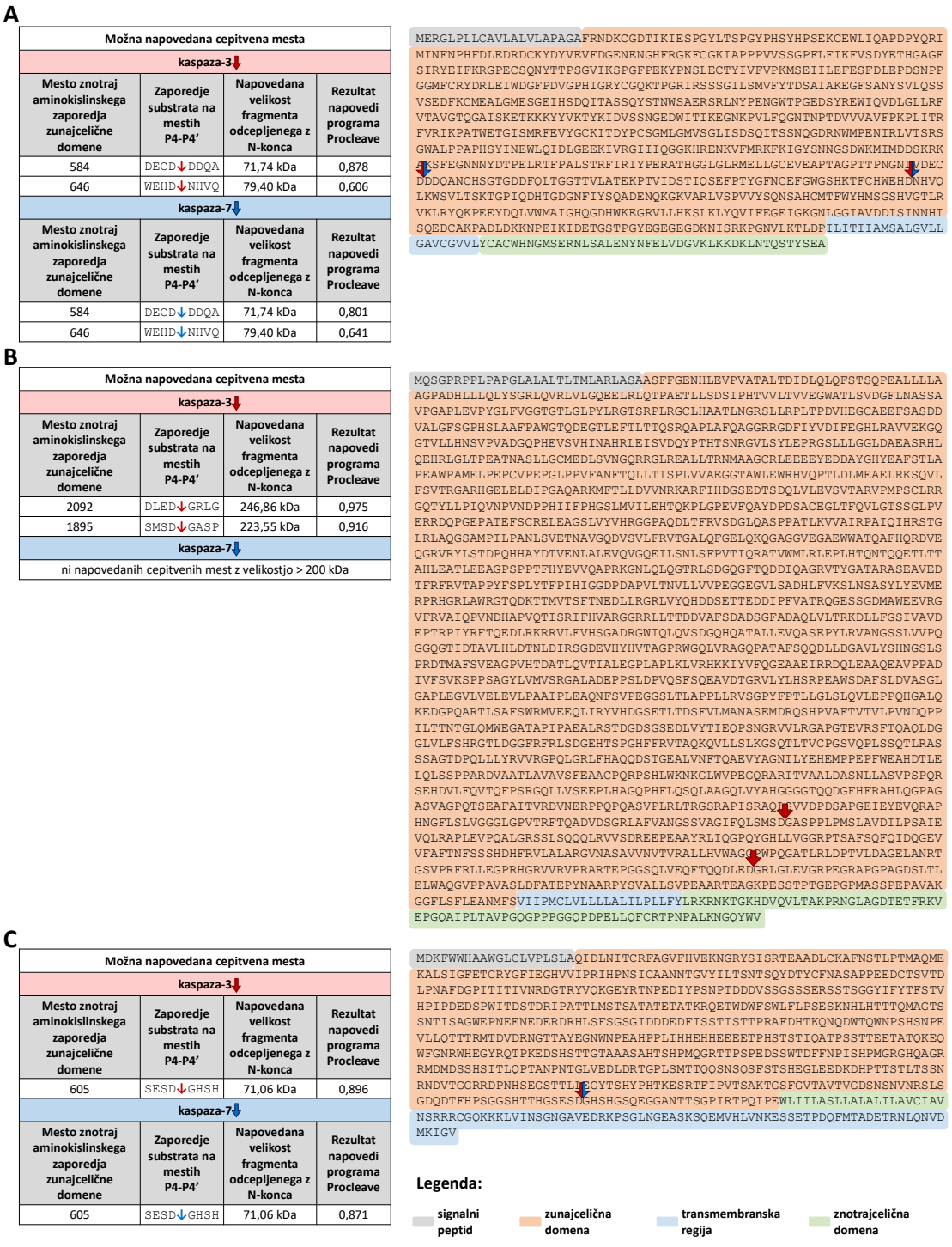
Ras-u soroden protein Rab-13	RAB13	P51153	1	0	2	2	3,0
Semaforin 7A	SEMA7A	O75326	1	1	4	5	3,0
Antigen CD9	CD9	P21926	1	0	4	2	3,0
Ras-u soroden protein Ral-B	RALB	P11234	0	0	0	2	3,0
Matriksna metaloproteinaza 14	MMP14	P50281	0	0	2	2	3,0
Ras-u soroden protein Rab-18	RAB18	Q9NP72	7	2	10	8	3,0

A.3 Pokritost 10-ih identificiranih substratov z najvišjimi povprečji razmerij SCR z identifikacijskimi peptide



Slika 38: Pokritost aminokislinskih zaporedij izbranih 10-ih identificiranih potencialnih zunajceličnih substratov kaspaz-3 in -7 z identifikacijskimi peptidi. Kot izbrane substrate smo upoštevali proteine z znano asociacijo s plazemsko membrano, torej proteine, ki vsebujejo transmembransko regijo, lipidno sidro ali oboje. Poleg te omejitve smo upoštevali še povprečje SCR in izbranih 10 proteinov predstavlja identificirane proteine z najvišjimi povprečji SCR.

A.4 Rezultati bioinformatske napovedi cepitvenih mest za NRP1, CSPG4 in CD44



Slika 39: Bioinformatska napoved potencialnih cepitvenih mest se sklada z rezultati imunološke detekcije v primeru izbranih substratov. Zaradi pomanjkanja strukturnih podatkov smo napoved pripravili z uporabo aminokislinskega zaporedja izbranih substratov. Prikazani so rezultati za NRP1 (A), CSPG4 (B) in CD44 (C) pri čemer so napovedana mesta tudi označena znotraj aminokislinskih zaporedij.

A.5 Vpliv dodatka koncentriranih pufrov HEPES in MES na pH koncentriranih celičnih gojišč

Tabela 9: Izmerjene vrednosti pH v koncentriranih celičnih gojiščih celic Jurkat E6-1. Za meritev pH smo združili koncentrirana celična gojišča iz več poskusov in nato določili pH gojiščem glede na dodane komponente pred in po enourni inkubaciji. Vzorce gojišč smo eno uro inkubirali, saj smo s tem omogočili inhibicijo kaspaz v vzorcih, ki so vsebovali pankaspazni inhibitor zVAD-FMK.

Čas izpostavljenosti	**Začetna vrednost pH**	**Vrednost pH po inkubaciji (1h, 37 °C)**
Koncentirano celično gojišče brez dodatkov		
0 h STS	7,65	7,55
20 h STS	7,81	7,68
Standardni pogiji tretiranja (PMSF, EDTA, E-64, DTT)		
0h STS	7,63	7,57
0h STS + zVAD	7,59	7,56
20h STS	7,75	7,85
20h STS + zVAD	7,73	7,77
10×pufer MES, pH 6.0		
0 h STS	6,28	6,37
0 h STS + zVAD	6,45	6,46
20 h STS	6,62	6,57
20 h STS + zVAD	6,46	6,57
10×pufer HEPES buffer, pH 7.4		
0 h STS	7,28	7,32
0 h STS + zVAD	7,32	7,34
20 h STS	7,37	7,40
20 h STS + zVAD	7,49	7,50

Literatura

[1] H. A. Chapman, R. J. Riese, and G. P. Shi, "Emerging roles for cysteine proteases in human biology," *Annu Rev Physiol,* vol. 59, pp. 63-88, 1997.

[2] A. J. Barrett and N. D. Rawlings, "Evolutionary lines of cysteine peptidases," *Biol Chem,* vol. 382, no. 5, pp. 727-33, May 2001.

[3] H. C. Castro *et al.*, "Looking at the proteases from a simple perspective," *J Mol Recognit,* vol. 24, no. 2, pp. 165-81, Mar-Apr 2011.

[4] P. R. Mittl and M. G. Grutter, "Opportunities for structure-based design of protease-directed drugs," *Curr Opin Struct Biol,* vol. 16, no. 6, pp. 769-75, Dec 2006.

[5] N. D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett, and A. Bateman, "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors," *Nucleic Acids Res,* vol. 42, no. Database issue, pp. D503-9, Jan 2014.

[6] I. Schechter and A. Berger, "On the size of the active site in proteases. I. Papain," *Biochem Biophys Res Commun,* vol. 27, no. 2, pp. 157-62, Apr 20 1967.

[7] P. J. Berti and A. C. Storer, "Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases," *J Mol Biol,* vol. 246, no. 2, pp. 273-83, Feb 17 1995.

[8] H. H. Otto and T. Schirmeister, "Cysteine Proteases and Their Inhibitors," *Chem Rev,* vol. 97, no. 1, pp. 133-172, Feb 5 1997.

[9] P. A. Henkart, "ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death?," *Immunity,* vol. 4, no. 3, pp. 195-201, Mar 1996.

[10] D. R. McIlwain, T. Berger, and T. W. Mak, "Caspase functions in cell death and disease," *Cold Spring Harb Perspect Biol,* vol. 5, no. 4, p. a008656, Apr 1 2013.

[11] K. McLuskey and J. C. Mottram, "Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases," *Biochem J,* vol. 466, no. 2, pp. 219-32, Mar 1 2015.

[12] L. Eckhart *et al.*, "Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire," *Mol Biol Evol,* vol. 25, no. 5, pp. 831-41, May 2008.

[13] S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, and S. Kumar, "Old, new and emerging functions of caspases," *Cell Death Differ,* vol. 22, no. 4, pp. 526-39, Apr 2015.

[14] G. Denecker *et al.*, "Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss," *Nat Cell Biol,* vol. 9, no. 6, pp. 666-74, Jun 2007.

[15] C. Pop and G. S. Salvesen, "Human caspases: activation, specificity, and regulation," *J Biol Chem,* vol. 284, no. 33, pp. 21777-21781, Aug 14 2009.

[16] C. H. Yi and J. Yuan, "The Jekyll and Hyde functions of caspases," *Dev Cell,* vol. 16, no. 1, pp. 21-34, Jan 2009.

[17] K. Kuida *et al.*, "Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice," *Nature,* vol. 384, no. 6607, pp. 368-72, Nov 28 1996.

[18] M. Woo *et al.*, "Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes," *Genes Dev,* vol. 12, no. 6, pp. 806-19, Mar 15 1998.

[19] K. Kuida *et al.*, "Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9," *Cell,* vol. 94, no. 3, pp. 325-37, Aug 7 1998.

[20] R. Hakem *et al.*, "Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo," *Cell,* vol. 94, no. 3, pp. 339-52, Aug 7 1998.

[21] E. E. Varfolomeev *et al.*, "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally," *Immunity,* vol. 9, no. 2, pp. 267-76, Aug 1998.

[22] K. McArthur and B. T. Kile, "Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities?," *Trends Cell Biol,* vol. 28, no. 6, pp. 475-493, Jun 2018.

[23] M. Muzio, B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, and V. M. Dixit, "An induced proximity model for caspase-8 activation," *J Biol Chem,* vol. 273, no. 5, pp. 2926-30, Jan 30 1998.

[24] M. R. Sprick, E. Rieser, H. Stahl, A. Grosse-Wilde, M. A. Weigand, and H. Walczak, "Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8," *EMBO J,* vol. 21, no. 17, pp. 4520-30, Sep 2 2002.

[25] M. Renatus, H. R. Stennicke, F. L. Scott, R. C. Liddington, and G. S. Salvesen, "Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 98, no. 25, pp. 14250-5, Dec 4 2001.

[26] A. Tinel and J. Tschopp, "The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress," *Science,* vol. 304, no. 5672, pp. 843-6, May 7 2004.

[27] P. Li *et al.*, "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade," *Cell,* vol. 91, no. 4, pp. 479-89, Nov 14 1997.

[28] Y. Tang, J. A. Wells, and M. R. Arkin, "Structural and enzymatic insights into caspase-2 protein substrate recognition and catalysis," *J Biol Chem,* vol. 286, no. 39, pp. 34147-54, Sep 30 2011.

[29] J. Wang, H. J. Chun, W. Wong, D. M. Spencer, and M. J. Lenardo, "Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 98, no. 24, pp. 13884-8, Nov 20 2001.

[30] A. B. Parrish, C. D. Freel, and S. Kornbluth, "Cellular mechanisms controlling caspase activation and function," *Cold Spring Harb Perspect Biol,* vol. 5, no. 6, Jun 1 2013.

[31] S. J. Riedl *et al.*, "Structural basis for the activation of human procaspase-7," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 98, no. 26, pp. 14790-5, Dec 18 2001.

[32] A. Philchenkov, M. Zavelevich, T. J. Kroczak, and M. Los, "Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities," *Exp Oncol,* vol. 26, no. 2, pp. 82-97, Jun 2004.

[33] A. Fleischer *et al.*, "Modulating apoptosis as a target for effective therapy," *Mol Immunol,* vol. 43, no. 8, pp. 1065-79, Mar 2006.

[34] B. A. Callus and D. L. Vaux, "Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical," *Cell Death Differ,* vol. 14, no. 1, pp. 73-8, Jan 2007.

[35] J. B. Mannick *et al.*, "Fas-induced caspase denitrosylation," *Science,* vol. 284, no. 5414, pp. 651-4, Apr 23 1999.

[36] H. Y. Chang and X. Yang, "Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases," *Microbiol Mol Biol Rev,* vol. 64, no. 4, pp. 821-46, Dec 2000.

[37] B. P. Eckelman, G. S. Salvesen, and F. L. Scott, "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family," *EMBO Rep,* vol. 7, no. 10, pp. 988-94, Oct 2006.

[38] H. H. Cheung, S. Plenchette, C. J. Kern, D. J. Mahoney, and R. G. Korneluk, "The RING domain of cIAP1 mediates the degradation of RING-bearing inhibitor of apoptosis proteins by distinct pathways," *Mol Biol Cell,* vol. 19, no. 7, pp. 2729-40, Jul 2008.

[39] M. Thome *et al.*, "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors," *Nature,* vol. 386, no. 6624, pp. 517-21, Apr 3 1997.

[40] A. R. Safa, "Roles of c-FLIP in Apoptosis, Necroptosis, and Autophagy," *J Carcinog Mutagen,* vol. Suppl 6, 2013.

[41] Y. Tsuchiya, O. Nakabayashi, and H. Nakano, "FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP," *Int J Mol Sci,* vol. 16, no. 12, pp. 30321-41, Dec 18 2015.

[42] H. R. Stennicke and G. S. Salvesan, "Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8," (in English), *Journal of Biological Chemistry,* vol. 272, no. 41, pp. 25719-25723, Oct 10 1997.

[43] H. J. Park, J. C. Lyons, T. Ohtsubo, and C. W. Song, "Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity," *Br J Cancer,* vol. 80, no. 12, pp. 1892-7, Aug 1999.

[44] S. Matsuyama, J. Llopis, Q. L. Deveraux, R. Y. Tsien, and J. C. Reed, "Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis," *Nat Cell Biol,* vol. 2, no. 6, pp. 318-25, Jun 2000.

[45] P. Karki, G. R. Dahal, S. Y. Shin, J. S. Lee, B. Cho, and I. S. Park, "Efficient cleavage of Bid and procaspase-7 by caspase-2 at lower pH," *Protein Pept Lett,* vol. 15, no. 10, pp. 1044-9, 2008.

[46] O. Julien and J. A. Wells, "Caspases and their substrates," *Cell Death Differ,* vol. 24, no. 8, pp. 1380-1389, Aug 2017.

[47] D. Turk, G. Guncar, M. Podobnik, and B. Turk, "Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases," *Biol Chem,* vol. 379, no. 2, pp. 137-47, Feb 1998.

[48] V. Turk *et al.*, "Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers," *Biochim Biophys Acta,* vol. 1824, no. 1, pp. 68-88, Jan 2012.

[49] V. Turk, B. Turk, and D. Turk, "Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities," *EMBO J,* vol. 20, no. 17, pp. 4629-33, Sep 3 2001.

[50] A. Rossi, Q. Deveraux, B. Turk, and A. Sali, "Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome," *Biol Chem,* vol. 385, no. 5, pp. 363-72, May 2004.

[51] B. Turk, D. Turk, and V. Turk, "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers," *Biochim Biophys Acta,* vol. 1477, no. 1-2, pp. 98-111, Mar 7 2000.

[52] V. Turk, B. Turk, G. Guncar, D. Turk, and J. Kos, "Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer," *Adv Enzyme Regul,* vol. 42, pp. 285-303, 2002.

[53] O. Vasiljeva, T. Reinheckel, C. Peters, D. Turk, V. Turk, and B. Turk, "Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets," *Curr Pharm Des,* vol. 13, no. 4, pp. 387-403, 2007.

[54] F. H. Drake *et al.*, "Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts," *J Biol Chem,* vol. 271, no. 21, pp. 12511-6, May 24 1996.

[55] R. J. Riese *et al.*, "Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity," *J Clin Invest,* vol. 101, no. 11, pp. 2351-63, Jun 1 1998.

[56] T. Y. Nakagawa *et al.*, "Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice," *Immunity,* vol. 10, no. 2, pp. 207-17, Feb 1999.

[57] G. P. Shi *et al.*, "Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development," *Immunity,* vol. 10, no. 2, pp. 197-206, Feb 1999.

[58] D. Bromme, Z. Li, M. Barnes, and E. Mehler, "Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization," *Biochemistry,* vol. 38, no. 8, pp. 2377-85, Feb 23 1999.

[59] T. Wex *et al.*, "Human cathepsin W, a cysteine protease predominantly expressed in NK cells, is mainly localized in the endoplasmic reticulum," *J Immunol,* vol. 167, no. 4, pp. 2172-8, Aug 15 2001.

[60] V. Turk, V. Stoka, and D. Turk, "Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance," *Front Biosci,* vol. 13, pp. 5406-20, May 1 2008.

[61] B. Turk, D. Turk, and G. S. Salvesen, "Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators," *Curr Pharm Des,* vol. 8, no. 18, pp. 1623-37, 2002.

[62] M. Biasizzo, U. Javorsek, E. Vidak, M. Zaric, and B. Turk, "Cysteine cathepsins: A long and winding road towards clinics," *Mol Aspects Med,* vol. 88, p. 101150, Dec 2022.

[63] T. Braulke and J. S. Bonifacino, "Sorting of lysosomal proteins," *Biochim Biophys Acta,* vol. 1793, no. 4, pp. 605-14, Apr 2009.

[64] E. Vidak, U. Javorsek, M. Vizovisek, and B. Turk, "Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment," *Cells,* vol. 8, no. 3, Mar 20 2019.

[65] B. Turk, I. Dolenc, V. Turk, and J. G. Bieth, "Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L," *Biochemistry,* vol. 32, no. 1, pp. 375-80, Jan 12 1993.

[66] B. Turk *et al.*, "Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins," *Biol Chem Hoppe Seyler,* vol. 376, no. 4, pp. 225-30, Apr 1995.

[67] D. Bromme, K. Okamoto, B. B. Wang, and S. Biroc, "Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in Spodoptera frugiperda and characterization of the enzyme," *J Biol Chem,* vol. 271, no. 4, pp. 2126-32, Jan 26 1996.

[68] H. Kirschke, B. Wiederanders, D. Bromme, and A. Rinne, "Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins," *Biochem J,* vol. 264, no. 2, pp. 467-73, Dec 1 1989.

[69] K. Brix, M. Linke, C. Tepel, and V. Herzog, "Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid," *Biol Chem,* vol. 382, no. 5, pp. 717-25, May 2001.

[70] K. Brix, A. Dunkhorst, K. Mayer, and S. Jordans, "Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions," *Biochimie,* vol. 90, no. 2, pp. 194-207, Feb 2008.

[71] P. C. Almeida *et al.*, "Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminogylcans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation," *J Biol Chem,* vol. 276, no. 2, pp. 944-51, Jan 12 2001.

[72] C. Y. Li *et al.*, "Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass," *J Bone Miner Res,* vol. 21, no. 6, pp. 865-75, Jun 2006.

[73] J. Rozhin, M. Sameni, G. Ziegler, and B. F. Sloane, "Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells," *Cancer Res,* vol. 54, no. 24, pp. 6517-25, Dec 15 1994.

[74] S. Jordans *et al.*, "Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions," *BMC Biochem,* vol. 10, p. 23, Sep 22 2009.

[75] E. Godat *et al.*, "Regulation of cathepsin K activity by hydrogen peroxide," *Biol Chem,* vol. 389, no. 8, pp. 1123-6, Aug 2008.

[76] O. C. Olson and J. A. Joyce, "Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response," *Nat Rev Cancer,* vol. 15, no. 12, pp. 712-29, Dec 2015.

[77] B. Sobotic *et al.*, "Proteomic Identification of Cysteine Cathepsin Substrates Shed from the Surface of Cancer Cells," *Mol Cell Proteomics,* vol. 14, no. 8, pp. 2213-28, Aug 2015.

[78] L. Kramer, D. Turk, and B. Turk, "The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management," *Trends Pharmacol Sci,* vol. 38, no. 10, pp. 873-898, Oct 2017.

[79] M. Naghavi *et al.*, "pH Heterogeneity of human and rabbit atherosclerotic plaques; a new insight into detection of vulnerable plaque," *Atherosclerosis,* vol. 164, no. 1, pp. 27-35, Sep 2002.

[80] Y. T. Konttinen *et al.*, "Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis," *Arthritis Rheum,* vol. 46, no. 4, pp. 953-60, Apr 2002.

[81] E. K. Rofstad, B. Mathiesen, K. Kindem, and K. Galappathi, "Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice," *Cancer Res,* vol. 66, no. 13, pp. 6699-707, Jul 1 2006.

[82] E. Boedtkjer and S. F. Pedersen, "The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer," *Annu Rev Physiol,* vol. 82, pp. 103-126, Feb 10 2020.

[83] J.-C. Lafarge, K. Clément, and M. Guerre-Millo, "Cathepsins S, L, and K and Their Pathophysiological Relevance in Obesity," *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism,* vol. 9, no. 2, pp. 133-137, 2011/06/01 2011.

[84] S. Ketterer, A. Gomez-Auli, L. E. Hillebrand, A. Petrera, A. Ketscher, and T. Reinheckel, "Inherited diseases caused by mutations in cathepsin protease genes," *FEBS J,* vol. 284, no. 10, pp. 1437-1454, May 2017.

[85] C. Rogers and E. S. Alnemri, "Gasdermins in Apoptosis: New players in an Old Game," *Yale J Biol Med,* vol. 92, no. 4, pp. 603-617, Dec 2019.

[86] S. Bedoui, M. J. Herold, and A. Strasser, "Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications," *Nat Rev Mol Cell Biol,* vol. 21, no. 11, pp. 678-695, Nov 2020.

[87] I. Khan, A. Yousif, M. Chesnokov, L. Hong, and I. Chefetz, "A decade of cell death studies: Breathing new life into necroptosis," *Pharmacol Ther,* vol. 220, p. 107717, Apr 2021.

[88] K. L. Rock and H. Kono, "The inflammatory response to cell death," *Annu Rev Pathol,* vol. 3, pp. 99-126, 2008.

[89] N. Van Opdenbosch and M. Lamkanfi, "Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease," *Immunity,* vol. 50, no. 6, pp. 1352-1364, Jun 18 2019.

[90] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics," *Br J Cancer,* vol. 26, no. 4, pp. 239-57, Aug 1972.

[91] K. Segawa, S. Kurata, Y. Yanagihashi, T. R. Brummelkamp, F. Matsuda, and S. Nagata, "Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure," *Science,* vol. 344, no. 6188, pp. 1164-8, Jun 6 2014.

[92] R. Kumar, P. E. Herbert, and A. N. Warrens, "An introduction to death receptors in apoptosis," *Int J Surg,* vol. 3, no. 4, pp. 268-77, 2005.

[93] W. P. Roos, A. D. Thomas, and B. Kaina, "DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology," *Nat Rev Cancer,* vol. 16, no. 1, pp. 20-33, Jan 2016.

[94] I. Vitale, G. Manic, R. De Maria, G. Kroemer, and L. Galluzzi, "DNA Damage in Stem Cells," *Mol Cell,* vol. 66, no. 3, pp. 306-319, May 4 2017.

[95] S. Neumann *et al.*, "How do viruses control mitochondria-mediated apoptosis?," *Virus Res,* vol. 209, pp. 45-55, Nov 2 2015.

[96] G. Nunez, L. London, D. Hockenbery, M. Alexander, J. P. McKearn, and S. J. Korsmeyer, "Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of

growth factor-deprived hemopoietic cell lines," *J Immunol,* vol. 144, no. 9, pp. 3602-10, May 1 1990.

[97] M. J. Herold, K. G. McPherson, and H. M. Reichardt, "Glucocorticoids in T cell apoptosis and function," *Cell Mol Life Sci,* vol. 63, no. 1, pp. 60-72, Jan 2006.

[98] C. C. Wu and S. B. Bratton, "Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species," *Antioxid Redox Signal,* vol. 19, no. 6, pp. 546-58, Aug 20 2013.

[99] A. Sendoel and M. O. Hengartner, "Apoptotic cell death under hypoxia," *Physiology (Bethesda),* vol. 29, no. 3, pp. 168-76, May 2014.

[100] P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, and J. M. Adams, "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy," *Nat Rev Mol Cell Biol,* vol. 15, no. 1, pp. 49-63, Jan 2014.

[101] R. Singh, A. Letai, and K. Sarosiek, "Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins," *Nat Rev Mol Cell Biol,* vol. 20, no. 3, pp. 175-193, Mar 2019.

[102] L. Galluzzi *et al.*, "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018," *Cell Death Differ,* vol. 25, no. 3, pp. 486-541, Mar 2018.

[103] K. L. O'Neill, K. Huang, J. Zhang, Y. Chen, and X. Luo, "Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane," *Genes Dev,* vol. 30, no. 8, pp. 973-88, Apr 15 2016.

[104] K. Cosentino and A. J. Garcia-Saez, "Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle?," *Trends Cell Biol,* vol. 27, no. 4, pp. 266-275, Apr 2017.

[105] S. J. Riedl and G. S. Salvesen, "The apoptosome: signalling platform of cell death," *Nat Rev Mol Cell Biol,* vol. 8, no. 5, pp. 405-13, May 2007.

[106] Q. Hu *et al.*, "Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 111, no. 46, pp. 16254-61, Nov 18 2014.

[107] S. A. Lakhani *et al.*, "Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis," *Science,* vol. 311, no. 5762, pp. 847-51, Feb 10 2006.

[108] S. M. Kallenberger *et al.*, "Intra- and interdimeric caspase-8 self-cleavage controls strength and timing of CD95-induced apoptosis," *Sci Signal,* vol. 7, no. 316, p. ra23, Mar 11 2014.

[109] L. S. Dickens, I. R. Powley, M. A. Hughes, and M. MacFarlane, "The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms," *Exp Cell Res,* vol. 318, no. 11, pp. 1269-77, Jul 1 2012.

[110] T. M. Fu *et al.*, "Cryo-EM Structure of Caspase-8 Tandem DED Filament Reveals Assembly and Regulation Mechanisms of the Death-Inducing Signaling Complex," *Mol Cell,* vol. 64, no. 2, pp. 236-250, Oct 20 2016.

[111] L. P. Billen, A. Shamas-Din, and D. W. Andrews, "Bid: a Bax-like BH3 protein," *Oncogene,* vol. 27 Suppl 1, pp. S93-104, Dec 2008.

[112] O. Julien *et al.*, "Quantitative MS-based enzymology of caspases reveals distinct protein substrate specificities, hierarchies, and cellular roles," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 113, no. 14, pp. E2001-10, Apr 5 2016.

[113] D. C. Gray, S. Mahrus, and J. A. Wells, "Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease," *Cell,* vol. 142, no. 4, pp. 637-46, Aug 20 2010.

[114] S. Nagata, "DNA degradation in development and programmed cell death," *Annu Rev Immunol,* vol. 23, pp. 853-75, 2005.

[115] S. J. Martin, D. M. Finucane, G. P. Amarante-Mendes, G. A. O'Brien, and D. R. Green, "Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity," *J Biol Chem,* vol. 271, no. 46, pp. 28753-6, Nov 15 1996.

[116] M. Naito, K. Nagashima, T. Mashima, and T. Tsuruo, "Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1 beta-converting enzyme family protease activation during apoptosis," *Blood,* vol. 89, no. 6, pp. 2060-6, Mar 15 1997.

[117] M. L. Coleman, E. A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar, and M. F. Olson, "Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I," *Nat Cell Biol,* vol. 3, no. 4, pp. 339-45, Apr 2001.

[118] M. Sebbagh, C. Renvoize, J. Hamelin, N. Riche, J. Bertoglio, and J. Breard, "Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing," *Nat Cell Biol,* vol. 3, no. 4, pp. 346-52, Apr 2001.

[119] H. Sakahira, M. Enari, and S. Nagata, "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis," *Nature,* vol. 391, no. 6662, pp. 96-9, Jan 1 1998.

[120] J. Suzuki, E. Imanishi, and S. Nagata, "Xkr8 phospholipid scrambling complex in apoptotic phosphatidylserine exposure," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 113, no. 34, pp. 9509-14, Aug 23 2016.

[121] V. S. Marsden *et al.*, "Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome," *Nature,* vol. 419, no. 6907, pp. 634-7, Oct 10 2002.

[122] G. Ichim *et al.*, "Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death," *Mol Cell,* vol. 57, no. 5, pp. 860-872, Mar 5 2015.

[123] Y. Zhang, X. Chen, C. Gueydan, and J. Han, "Plasma membrane changes during programmed cell deaths," *Cell Res,* vol. 28, no. 1, pp. 9-21, Jan 2018.

[124] T. Vanden Berghe *et al.*, "Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features," *Cell Death Differ,* vol. 17, no. 6, pp. 922-30, Jun 2010.

[125] P. Vandenabeele, K. Vandecasteele, C. Bachert, O. Krysko, and D. V. Krysko, "Immunogenic Apoptotic Cell Death and Anticancer Immunity," *Adv Exp Med Biol,* vol. 930, pp. 133-49, 2016.

[126] L. Galluzzi, A. Buque, O. Kepp, L. Zitvogel, and G. Kroemer, "Immunogenic cell death in cancer and infectious disease," *Nat Rev Immunol,* vol. 17, no. 2, pp. 97-111, Feb 2017.

[127] R. D. Berg *et al.*, "Lysosomal Disorders Drive Susceptibility to Tuberculosis by Compromising Macrophage Migration," *Cell,* vol. 165, no. 1, pp. 139-152, Mar 24 2016.

[128] C. Rogers, T. Fernandes-Alnemri, L. Mayes, D. Alnemri, G. Cingolani, and E. S. Alnemri, "Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death," *Nat Commun,* vol. 8, p. 14128, Jan 3 2017.

[129] M. T. Silva, A. do Vale, and N. M. dos Santos, "Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications," *Apoptosis,* vol. 13, no. 4, pp. 463-82, Apr 2008.

[130] Y. Q. Li, J. J. Peng, J. Peng, and X. J. Luo, "The deafness gene GSDME: its involvement in cell apoptosis, secondary necrosis, and cancers," *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,* vol. 392, no. 9, pp. 1043-1048, Sep 2019.

[131] S. Van Rossom *et al.*, "The splicing mutant of the human tumor suppressor protein DFNA5 induces programmed cell death when expressed in the yeast Saccharomyces cerevisiae," *Front Oncol,* vol. 2, p. 77, 2012.

[132] Y. Wang *et al.*, "Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin," *Nature,* vol. 547, no. 7661, pp. 99-103, Jul 6 2017.

[133] C. Rogers, D. A. Erkes, A. Nardone, A. E. Aplin, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri, "Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation," *Nat Commun,* vol. 10, no. 1, p. 1689, Apr 11 2019.

[134] R. Tixeira *et al.*, "Gasdermin E Does Not Limit Apoptotic Cell Disassembly by Promoting Early Onset of Secondary Necrosis in Jurkat T Cells and THP-1 Monocytes," *Front Immunol,* vol. 9, p. 2842, 2018.

[135] B. L. Lee *et al.*, "ASC- and caspase-8-dependent apoptotic pathway diverges from the NLRC4 inflammasome in macrophages," *Sci Rep,* vol. 8, no. 1, p. 3788, Feb 28 2018.

[136] G. Stoll, Y. Ma, H. Yang, O. Kepp, L. Zitvogel, and G. Kroemer, "Pro-necrotic molecules impact local immunosurveillance in human breast cancer," *Oncoimmunology,* vol. 6, no. 4, p. e1299302, 2017.

[137] D. Wallach, T. B. Kang, C. P. Dillon, and D. R. Green, "Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules," *Science,* vol. 352, no. 6281, p. aaf2154, Apr 1 2016.

[138] U. S. Gaipl *et al.*, "Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE)," *J Autoimmun,* vol. 28, no. 2-3, pp. 114-21, Mar-May 2007.

[139] V. R. Mukaro and S. Hodge, "Airway clearance of apoptotic cells in COPD," *Curr Drug Targets,* vol. 12, no. 4, pp. 460-8, Apr 2011.

[140] A. V. Finn, F. D. Kolodgie, and R. Virmani, "Correlation between carotid intimal/medial thickness and atherosclerosis: a point of view from pathology," *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* vol. 30, no. 2, pp. 177-81, Feb 2010.

[141] S. M. Bianchi *et al.*, "Impairment of apoptotic cell engulfment by pyocyanin, a toxic metabolite of Pseudomonas aeruginosa," *Am J Respir Crit Care Med,* vol. 177, no. 1, pp. 35-43, Jan 1 2008.

[142] L. Uller, C. G. Persson, and J. S. Erjefalt, "Resolution of airway disease: removal of inflammatory cells through apoptosis, egression or both?," *Trends Pharmacol Sci,* vol. 27, no. 9, pp. 461-6, Sep 2006.

[143] A. P. Watt *et al.*, "Neutrophil apoptosis, proinflammatory mediators and cell counts in bronchiectasis," *Thorax,* vol. 59, no. 3, pp. 231-6, Mar 2004.

[144] S. H. Hassanpour and M. Dehghani, "Review of cancer from perspective of molecular," *Journal of Cancer Research and Practice,* vol. 4, no. 4, pp. 127-129, 2017/12/01/ 2017.

[145] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin,* vol. 71, no. 3, pp. 209-249, May 2021.

[146] A. Jassim, E. P. Rahrmann, B. D. Simons, and R. J. Gilbertson, "Cancers make their own luck: theories of cancer origins," *Nat Rev Cancer,* vol. 23, no. 10, pp. 710-724, Oct 2023.

[147] P. Armitage and R. Doll, "The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis," *Br J Cancer,* vol. 8, no. 1, pp. 1-12, Mar 1954.

[148] C. Huggins, "Endocrine-induced regression of cancers," *Cancer Res,* vol. 27, no. 11, pp. 1925-30, Nov 1967.

[149] D. Haas, A. R. Ablin, C. Miller, S. Zoger, and K. K. Matthay, "Complete pathologic maturation and regression of stage IVS neuroblastoma without treatment," *Cancer,* vol. 62, no. 4, pp. 818-25, Aug 15 1988.

[150] B. Mintz and K. Illmensee, "Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 72, no. 9, pp. 3585-9, Sep 1975.

[151] L. Riva *et al.*, "The mutational signature profile of known and suspected human carcinogens in mice," *Nat Genet,* vol. 52, no. 11, pp. 1189-1197, Nov 2020.

[152] C. Tomasetti and B. Vogelstein, "Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions," *Science,* vol. 347, no. 6217, pp. 78-81, Jan 2 2015.

[153] L. Zhu *et al.*, "Multi-organ Mapping of Cancer Risk," *Cell,* vol. 166, no. 5, pp. 1132-1146 e7, Aug 25 2016.

[154] D. Hanahan, "Hallmarks of Cancer: New Dimensions," *Cancer Discov,* vol. 12, no. 1, pp. 31-46, Jan 2022.

[155] M. Vizovisek, D. Ristanovic, S. Menghini, M. G. Christiansen, and S. Schuerle, "The Tumor Proteolytic Landscape: A Challenging Frontier in Cancer Diagnosis and Therapy," *Int J Mol Sci,* vol. 22, no. 5, Mar 3 2021.

[156] B. Turk, D. Turk, and V. Turk, "Protease signalling: the cutting edge," *EMBO J,* vol. 31, no. 7, pp. 1630-43, Apr 4 2012.

[157] J. Winkler, A. Abisoye-Ogunniyan, K. J. Metcalf, and Z. Werb, "Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis," *Nat Commun,* vol. 11, no. 1, p. 5120, Oct 9 2020.

[158] J. Mitschke, U. C. Burk, and T. Reinheckel, "The role of proteases in epithelial-to-mesenchymal cell transitions in cancer," *Cancer Metastasis Rev,* vol. 38, no. 3, pp. 431-444, Sep 2019.

[159] S. Muenst, H. Laubli, S. D. Soysal, A. Zippelius, A. Tzankov, and S. Hoeller, "The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts," *J Intern Med,* vol. 279, no. 6, pp. 541-62, Jun 2016.

[160] M. Olsson and B. Zhivotovsky, "Caspases and cancer," *Cell Death Differ,* vol. 18, no. 9, pp. 1441-9, Sep 2011.

[161] D. F. Quail and J. A. Joyce, "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis," *Nat Med,* vol. 19, no. 11, pp. 1423-37, Nov 2013.

[162] P. Pandya, J. L. Orgaz, and V. Sanz-Moreno, "Modes of invasion during tumour dissemination," *Mol Oncol,* vol. 11, no. 1, pp. 5-27, Jan 2017.

[163] J. Fan, B. Ning, C. J. Lyon, and T. Y. Hu, "Circulating Peptidome and Tumor-Resident Proteolysis," *Enzymes,* vol. 42, pp. 1-25, 2017.

[164] D. Hoeller, C. M. Hecker, and I. Dikic, "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis," *Nat Rev Cancer,* vol. 6, no. 10, pp. 776-88, Oct 2006.

[165] Y. Fu *et al.*, "Targeting ATG4 in Cancer Therapy," *Cancers (Basel),* vol. 11, no. 5, May 10 2019.

[166] Y. P. Liao *et al.*, "Hypomethylation signature of tumor-initiating cells predicts poor prognosis of ovarian cancer patients," *Hum Mol Genet,* vol. 23, no. 7, pp. 1894-906, Apr 1 2014.

[167] K. Rothe *et al.*, "The core autophagy protein ATG4B is a potential biomarker and therapeutic target in CML stem/progenitor cells," *Blood,* vol. 123, no. 23, pp. 3622-34, Jun 5 2014.

[168] S. Bortnik *et al.*, "Identification of breast cancer cell subtypes sensitive to ATG4B inhibition," *Oncotarget,* vol. 7, no. 41, pp. 66970-66988, Oct 11 2016.

[169] A. Eatemadi *et al.*, "Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment," *Biomed Pharmacother,* vol. 86, pp. 221-231, Feb 2017.

[170] Y. Itoh, "Proteolytic modulation of tumor microenvironment signals during cancer progression," *Front Oncol,* vol. 12, p. 935231, 2022.

[171] L. Sevenich and J. A. Joyce, "Pericellular proteolysis in cancer," *Genes Dev,* vol. 28, no. 21, pp. 2331-47, Nov 1 2014.

[172] M. Vizovisek, M. Fonovic, and B. Turk, "Cysteine cathepsins in extracellular matrix remodeling: Extracellular matrix degradation and beyond," *Matrix Biol,* vol. 75-76, pp. 141-159, Jan 2019.

[173] L. Sevenich *et al.*, "Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S," *Nat Cell Biol,* vol. 16, no. 9, pp. 876-88, Sep 2014.

[174] U. Repnik, A. E. Starr, C. M. Overall, and B. Turk, "Cysteine Cathepsins Activate ELR Chemokines and Inactivate Non-ELR Chemokines," *J Biol Chem,* vol. 290, no. 22, pp. 13800-11, May 29 2015.

[175] A. M. Sieuwerts *et al.*, "Urokinase-type-plasminogen-activator (uPA) production by human breast (myo) fibroblasts in vitro: influence of transforming growth factor-beta(1) (TGF beta(1)) compared with factor(s) released by human epithelial-carcinoma cells," *Int J Cancer,* vol. 76, no. 6, pp. 829-35, Jun 10 1998.

[176] C. H. Stuelten, S. DaCosta Byfield, P. R. Arany, T. S. Karpova, W. G. Stetler-Stevenson, and A. B. Roberts, "Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to

express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta," *J Cell Sci,* vol. 118, no. Pt 10, pp. 2143-53, May 15 2005.

[177] A. Calon *et al.*, "Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation," *Cancer Cell,* vol. 22, no. 5, pp. 571-84, Nov 13 2012.

[178] L. J. Hawinkels *et al.*, "Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF-beta signaling in cancer-associated fibroblasts," *Oncogene,* vol. 33, no. 1, pp. 97-107, Jan 2 2014.

[179] V. Noskova, S. Ahmadi, E. Asander, and B. Casslen, "Ovarian cancer cells stimulate uPA gene expression in fibroblastic stromal cells via multiple paracrine and autocrine mechanisms," *Gynecol Oncol,* vol. 115, no. 1, pp. 121-126, Oct 2009.

[180] A. Kaminski, J. C. Hahne, M. Haddouti el, A. Florin, A. Wellmann, and N. Wernert, "Tumour-stroma interactions between metastatic prostate cancer cells and fibroblasts," *Int J Mol Med,* vol. 18, no. 5, pp. 941-50, Nov 2006.

[181] O. Prokopchuk, Y. Liu, D. Henne-Bruns, and M. Kornmann, "Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions," *Br J Cancer,* vol. 92, no. 5, pp. 921-8, Mar 14 2005.

[182] M. Todaro *et al.*, "Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4," *Cell Death Differ,* vol. 15, no. 4, pp. 762-72, Apr 2008.

[183] M. M. Mohamed, D. Cavallo-Medved, D. Rudy, A. Anbalagan, K. Moin, and B. F. Sloane, "Interleukin-6 increases expression and secretion of cathepsin B by breast tumor-associated monocytes," *Cell Physiol Biochem,* vol. 25, no. 2-3, pp. 315-24, 2010.

[184] V. Gocheva *et al.*, "IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion," *Genes Dev,* vol. 24, no. 3, pp. 241-55, Feb 1 2010.

[185] P. Kothari *et al.*, "IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages," *J Immunol,* vol. 192, no. 1, pp. 349-57, Jan 1 2014.

[186] S. Kenig, M. B. Alonso, M. M. Mueller, and T. T. Lah, "Glioblastoma and endothelial cells cross-talk, mediated by SDF-1, enhances tumour invasion and endothelial proliferation by increasing expression of cathepsins B, S, and MMP-9," *Cancer Lett,* vol. 289, no. 1, pp. 53-61, Mar 1 2010.

[187] Y. H. Wang *et al.*, "Vascular endothelial cells facilitated HCC invasion and metastasis through the Akt and NF-kappaB pathways induced by paracrine cytokines," *J Exp Clin Cancer Res,* vol. 32, no. 1, p. 51, Aug 13 2013.

[188] K. Taniwaki *et al.*, "Stroma-derived matrix metalloproteinase (MMP)-2 promotes membrane type 1-MMP-dependent tumor growth in mice," *Cancer Res,* vol. 67, no. 9, pp. 4311-9, May 1 2007.

[189] Y. Itoh, "Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations," *Matrix Biol,* vol. 44-46, pp. 207-23, May-Jul 2015.

[190] Z. Piperigkou, K. Kyriakopoulou, C. Koutsakis, S. Mastronikolis, and N. K. Karamanos, "Key Matrix Remodeling Enzymes: Functions and Targeting in Cancer," *Cancers (Basel),* vol. 13, no. 6, Mar 22 2021.

[191] V. Noe *et al.*, "Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1," *J Cell Sci,* vol. 114, no. Pt 1, pp. 111-118, Jan 2001.

[192] A. J. Najy, K. C. Day, and M. L. Day, "The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation," *J Biol Chem,* vol. 283, no. 26, pp. 18393-401, Jun 27 2008.

[193] M. M. Grabowska, B. Sandhu, and M. L. Day, "EGF promotes the shedding of soluble E-cadherin in an ADAM10-dependent manner in prostate epithelial cells," *Cell Signal,* vol. 24, no. 2, pp. 532-538, Feb 2012.

[194] V. Gocheva *et al.*, "Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis," *Genes Dev,* vol. 20, no. 5, pp. 543-56, Mar 1 2006.

[195] A. Lochter, S. Galosy, J. Muschler, N. Freedman, Z. Werb, and M. J. Bissell, "Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells," *J Cell Biol,* vol. 139, no. 7, pp. 1861-72, Dec 29 1997.

[196] S. M. Brouxhon *et al.*, "Soluble E-cadherin: a critical oncogene modulating receptor tyrosine kinases, MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling," *Oncogene,* vol. 33, no. 2, pp. 225-35, Jan 9 2014.

[197] F. X. Maquart, S. Pasco, L. Ramont, W. Hornebeck, and J. C. Monboisse, "An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion," *Crit Rev Oncol Hematol,* vol. 49, no. 3, pp. 199-202, Mar 2004.

[198] U. Felbor, L. Dreier, R. A. Bryant, H. L. Ploegh, B. R. Olsen, and W. Mothes, "Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII," *EMBO J,* vol. 19, no. 6, pp. 1187-94, Mar 15 2000.

[199] Y. Hamano *et al.*, "Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin," *Cancer Cell,* vol. 3, no. 6, pp. 589-601, Jun 2003.

[200] D. H. Ma *et al.*, "Generation of endostatin by matrix metalloproteinase and cathepsin from human limbocorneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane," *Invest Ophthalmol Vis Sci,* vol. 48, no. 2, pp. 644-51, Feb 2007.

[201] F. Veillard *et al.*, "Cysteine cathepsins S and L modulate anti-angiogenic activities of human endostatin," *J Biol Chem,* vol. 286, no. 43, pp. 37158-67, Oct 28 2011.

[202] A. Juncker-Jensen *et al.*, "Tumor MMP-1 activates endothelial PAR1 to facilitate vascular intravasation and metastatic dissemination," *Cancer Res,* vol. 73, no. 14, pp. 4196-211, Jul 15 2013.

[203] R. C. Baxter, "IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights," *Nat Rev Cancer,* vol. 14, no. 5, pp. 329-41, May 2014.

[204] Q. Yu and I. Stamenkovic, "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis," *Genes Dev,* vol. 14, no. 2, pp. 163-76, Jan 15 2000.

[205] M. Yin, J. Soikkeli, T. Jahkola, S. Virolainen, O. Saksela, and E. Holtta, "TGF-beta signaling, activated stromal fibroblasts, and cysteine cathepsins B and L drive

the invasive growth of human melanoma cells," *Am J Pathol,* vol. 181, no. 6, pp. 2202-16, Dec 2012.

[206] T. Vargo-Gogola, H. C. Crawford, B. Fingleton, and L. M. Matrisian, "Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand," *Arch Biochem Biophys,* vol. 408, no. 2, pp. 155-61, Dec 15 2002.

[207] N. Mitsiades, W. H. Yu, V. Poulaki, M. Tsokos, and I. Stamenkovic, "Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity," *Cancer Res,* vol. 61, no. 2, pp. 577-81, Jan 15 2001.

[208] B. Moser, M. Wolf, A. Walz, and P. Loetscher, "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control," *Trends Immunol,* vol. 25, no. 2, pp. 75-84, Feb 2004.

[209] S. F. Lichtenthaler, M. K. Lemberg, and R. Fluhrer, "Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals-hardware, concepts, and recent developments," *EMBO J,* vol. 37, no. 15, Aug 1 2018.

[210] H. Nakamura *et al.*, "Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase," *Cancer Res,* vol. 64, no. 3, pp. 876-82, Feb 1 2004.

[211] E. Fiore, C. Fusco, P. Romero, and I. Stamenkovic, "Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity," *Oncogene,* vol. 21, no. 34, pp. 5213-23, Aug 8 2002.

[212] N. L. Tsakadze, S. D. Sithu, U. Sen, W. R. English, G. Murphy, and S. E. D'Souza, "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)," *J Biol Chem,* vol. 281, no. 6, pp. 3157-64, Feb 10 2006.

[213] S. D. Sithu *et al.*, "Membrane-type 1-matrix metalloproteinase regulates intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-mediated monocyte transmigration," *J Biol Chem,* vol. 282, no. 34, pp. 25010-9, Aug 24 2007.

[214] E. Essick, S. Sithu, W. Dean, and S. D'Souza, "Pervanadate-induced shedding of the intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 ectodomain is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)," *Mol Cell Biochem,* vol. 314, no. 1-2, pp. 151-9, Jul 2008.

[215] N. Sugiyama *et al.*, "EphA2 cleavage by MT1-MMP triggers single cancer cell invasion via homotypic cell repulsion," *J Cell Biol,* vol. 201, no. 3, pp. 467-84, Apr 29 2013.

[216] M. Grozdanic *et al.*, "Cathepsin L-mediated EGFR cleavage affects intracellular signalling pathways in cancer," *Biol Chem,* vol. 405, no. 4, pp. 283-296, Apr 25 2024.

[217] "Chapter 1 - Introduction to the Immune Response," in *Primer to the Immune Response (Second Edition)*, T. W. Mak, M. E. Saunders, and B. D. Jett, Eds. Boston: Academic Cell, 2014, pp. 3-20.

[218] K. L. Medina, "Overview of the immune system," *Handb Clin Neurol,* vol. 133, pp. 61-76, 2016.

[219] E. J. Askeland, M. R. Newton, M. A. O'Donnell, and Y. Luo, "Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond," *Adv Urol,* vol. 2012, p. 181987, 2012.

[220] H. Gonzalez, C. Hagerling, and Z. Werb, "Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression," *Genes Dev,* vol. 32, no. 19-20, pp. 1267-1284, Oct 1 2018.

[221] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell,* vol. 144, no. 5, pp. 646-74, Mar 4 2011.

[222] M. W. Teng, J. Galon, W. H. Fridman, and M. J. Smyth, "From mice to humans: developments in cancer immunoediting," *J Clin Invest,* vol. 125, no. 9, pp. 3338-46, Sep 2015.

[223] B. Ruffell *et al.*, "Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells," *Cancer Cell,* vol. 26, no. 5, pp. 623-37, Nov 10 2014.

[224] A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi, and P. Allavena, "Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology," *Nat Rev Clin Oncol,* vol. 14, no. 7, pp. 399-416, Jul 2017.

[225] D. V. F. Tauriello *et al.*, "TGFbeta drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis," *Nature,* vol. 554, no. 7693, pp. 538-543, Feb 22 2018.

[226] D. E. Speiser, P. C. Ho, and G. Verdeil, "Regulatory circuits of T cell function in cancer," *Nat Rev Immunol,* vol. 16, no. 10, pp. 599-611, Oct 2016.

[227] C. Boger, H. M. Behrens, S. Kruger, and C. Rocken, "The novel negative checkpoint regulator VISTA is expressed in gastric carcinoma and associated with PD-L1/PD-1: A future perspective for a combined gastric cancer therapy?," *Oncoimmunology,* vol. 6, no. 4, p. e1293215, 2017.

[228] S. L. Topalian *et al.*, "Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer," *N Engl J Med,* vol. 366, no. 26, pp. 2443-54, Jun 28 2012.

[229] A. Snyder *et al.*, "Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma," *N Engl J Med,* vol. 371, no. 23, pp. 2189-2199, Dec 4 2014.

[230] M. Revel, M. V. Daugan, C. Sautes-Fridman, W. H. Fridman, and L. T. Roumenina, "Complement System: Promoter or Suppressor of Cancer Progression?," *Antibodies (Basel),* vol. 9, no. 4, Oct 25 2020.

[231] E. S. Reis, D. C. Mastellos, D. Ricklin, A. Mantovani, and J. D. Lambris, "Complement in cancer: untangling an intricate relationship," *Nat Rev Immunol,* vol. 18, no. 1, pp. 5-18, Jan 2018.

[232] N. S. Merle, S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi, and L. T. Roumenina, "Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation," *Front Immunol,* vol. 6, p. 262, 2015.

[233] J. R. Dunkelberger and W. C. Song, "Complement and its role in innate and adaptive immune responses," *Cell Res,* vol. 20, no. 1, pp. 34-50, Jan 2010.

[234] R. Medzhitov and C. Janeway, Jr., "Innate immunity," *N Engl J Med,* vol. 343, no. 5, pp. 338-44, Aug 3 2000.

[235] J. Dobo, V. Harmat, L. Beinrohr, E. Sebestyen, P. Zavodszky, and P. Gal, "MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity," *J Immunol,* vol. 183, no. 2, pp. 1207-14, Jul 15 2009.

[236] M. Takahashi *et al.*, "Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway," *J Immunol,* vol. 180, no. 9, pp. 6132-8, May 1 2008.

[237] M. K. Pangburn, R. D. Schreiber, and H. J. Muller-Eberhard, "Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3," *J Exp Med,* vol. 154, no. 3, pp. 856-67, Sep 1 1981.

[238] M. J. Walport, "Complement. Second of two parts," *N Engl J Med,* vol. 344, no. 15, pp. 1140-4, Apr 12 2001.

[239] M. A. Hadders *et al.*, "Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9," *Cell Rep,* vol. 1, no. 3, pp. 200-7, Mar 29 2012.

[240] O. Middleton, H. Wheadon, and A. M. Michie, "Classical Complement Pathway," in *Encyclopedia of Immunobiology*, M. J. H. Ratcliffe, Ed. Oxford: Academic Press, 2016, pp. 318-324.

[241] A. F. Sonnen and P. Henneke, "Structural biology of the membrane attack complex," *Subcell Biochem,* vol. 80, pp. 83-116, 2014.

[242] R. Zhang, Q. Liu, T. Li, Q. Liao, and Y. Zhao, "Role of the complement system in the tumor microenvironment," *Cancer Cell Int,* vol. 19, p. 300, 2019.

[243] V. Afshar-Kharghan, "The role of the complement system in cancer," *J Clin Invest,* vol. 127, no. 3, pp. 780-789, Mar 1 2017.

[244] D. Ajona *et al.*, "Investigation of complement activation product c4d as a diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer," *J Natl Cancer Inst,* vol. 105, no. 18, pp. 1385-93, Sep 18 2013.

[245] L. Bjorge *et al.*, "Ascitic complement system in ovarian cancer," *Br J Cancer,* vol. 92, no. 5, pp. 895-905, Mar 14 2005.

[246] S. Bandini *et al.*, "The non-inflammatory role of C1q during Her2/neu-driven mammary carcinogenesis," *Oncoimmunology,* vol. 5, no. 12, p. e1253653, 2016.

[247] J. Yan, D. J. Allendorf, B. Li, R. Yan, R. Hansen, and R. Donev, "The role of membrane complement regulatory proteins in cancer immunotherapy," *Adv Exp Med Biol,* vol. 632, pp. 159-74, 2008.

[248] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nat Methods,* vol. 9, no. 7, pp. 671-5, Jul 2012.

[249] J. Cox and M. Mann, "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification," *Nat Biotechnol,* vol. 26, no. 12, pp. 1367-72, Dec 2008.

[250] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, R. A. Scheltema, J. V. Olsen, and M. Mann, "Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment," *J Proteome Res,* vol. 10, no. 4, pp. 1794-805, Apr 1 2011.

[251] M. Mihelic, A. Dobersek, G. Guncar, and D. Turk, "Inhibitory fragment from the p41 form of invariant chain can regulate activity of cysteine cathepsins in antigen presentation," *J Biol Chem,* vol. 283, no. 21, pp. 14453-60, May 23 2008.

[252] H. Roschitzki-Voser *et al.*, "Human caspases in vitro: expression, purification and kinetic characterization," *Protein Expr Purif,* vol. 84, no. 2, pp. 236-46, Aug 2012.

[253] D. Bromme, F. S. Nallaseth, and B. Turk, "Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases," *Methods,* vol. 32, no. 2, pp. 199-206, Feb 2004.

[254] H. M. Berman *et al.*, "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Res,* vol. 28, no. 1, pp. 235-42, Jan 1 2000.

[255] Y. Perez-Riverol *et al.*, "The PRIDE database at 20 years: 2025 update," *Nucleic Acids Res,* vol. 53, no. D1, pp. D543-D553, Jan 6 2025.

[256] E. W. Deutsch *et al.*, "The ProteomeXchange consortium at 10 years: 2023 update," *Nucleic Acids Res,* vol. 51, no. D1, pp. D1539-D1548, Jan 6 2023.

[257] F. Li *et al.*, "Procleave: Predicting Protease-specific Substrate Cleavage Sites by Combining Sequence and Structural Information," *Genomics Proteomics Bioinformatics,* vol. 18, no. 1, pp. 52-64, Feb 2020.

[258] D. Botelho, M. J. Wall, D. B. Vieira, S. Fitzsimmons, F. Liu, and A. Doucette, "Top-down and bottom-up proteomics of SDS-containing solutions following mass-based separation," *J Proteome Res,* vol. 9, no. 6, pp. 2863-70, Jun 4 2010.

[259] W. S. Tien, J. H. Chen, and K. P. Wu, "SheddomeDB: the ectodomain shedding database for membrane-bound shed markers," *BMC Bioinformatics,* vol. 18, no. Suppl 3, p. 42, Mar 14 2017.

[260] C. Lindskog, "The Human Protein Atlas - an important resource for basic and clinical research," *Expert Rev Proteomics,* vol. 13, no. 7, pp. 627-9, Jul 2016.

[261] P. Vaupel, F. Kallinowski, and P. Okunieff, "Blood-Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human-Tumors - a Review," (in English), *Cancer Research,* vol. 49, no. 23, pp. 6449-6465, Dec 1 1989.

[262] I. M. Berquin and B. F. Sloane, "Cathepsin B expression in human tumors," *Adv Exp Med Biol,* vol. 389, pp. 281-94, 1996.

[263] B. A. Frosch, I. Berquin, M. R. Emmert-Buck, K. Moin, and B. F. Sloane, "Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B," *APMIS,* vol. 107, no. 1, pp. 28-37, Jan 1999.

[264] M. M. Mohamed and B. F. Sloane, "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer," *Nat Rev Cancer,* vol. 6, no. 10, pp. 764-75, Oct 2006.

[265] S. D. Mason and J. A. Joyce, "Proteolytic networks in cancer," *Trends Cell Biol,* vol. 21, no. 4, pp. 228-37, Apr 2011.

[266] D. Ricklin, E. S. Reis, D. C. Mastellos, P. Gros, and J. D. Lambris, "Complement component C3 - The "Swiss Army Knife" of innate immunity and host defense," *Immunol Rev,* vol. 274, no. 1, pp. 33-58, Nov 2016.

[267] P. Berraondo, L. Minute, D. Ajona, L. Corrales, I. Melero, and R. Pio, "Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance," *Immunol Rev,* vol. 274, no. 1, pp. 290-306, Nov 2016.

[268] A. Haage, D. H. Nam, X. Ge, and I. C. Schneider, "Matrix metalloproteinase-14 is a mechanically regulated activator of secreted MMPs and invasion," *Biochem Biophys Res Commun,* vol. 450, no. 1, pp. 213-8, Jul 18 2014.

[269] M. Rudzinska *et al.*, "The Role of Cysteine Cathepsins in Cancer Progression and Drug Resistance," *Int J Mol Sci,* vol. 20, no. 14, Jul 23 2019.

[270] A. Boice and L. Bouchier-Hayes, "Targeting apoptotic caspases in cancer," *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res,* vol. 1867, no. 6, p. 118688, Jun 2020.

[271] V. Mohan, A. Das, and I. Sagi, "Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer," *Semin Cancer Biol,* vol. 62, pp. 192-200, May 2020.

[272] E. D. Crawford *et al.*, "The DegraBase: a database of proteolysis in healthy and apoptotic human cells," *Mol Cell Proteomics,* vol. 12, no. 3, pp. 813-24, Mar 2013.

[273] M. A. Miller, R. J. Sullivan, and D. A. Lauffenburger, "Molecular Pathways: Receptor Ectodomain Shedding in Treatment, Resistance, and Monitoring of Cancer," *Clin Cancer Res,* vol. 23, no. 3, pp. 623-629, Feb 1 2017.

[274] L. M. Coussens, C. L. Tinkle, D. Hanahan, and Z. Werb, "MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis," *Cell,* vol. 103, no. 3, pp. 481-90, Oct 27 2000.

[275] L. Yang *et al.*, "Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis," *Cancer Cell,* vol. 6, no. 4, pp. 409-21, Oct 2004.

[276] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell,* vol. 100, no. 1, pp. 57-70, Jan 7 2000.

[277] H. Hentze *et al.*, "In vivo and in vitro evidence for extracellular caspase activity released from apoptotic cells," *Biochem Biophys Res Commun,* vol. 283, no. 5, pp. 1111-7, May 25 2001.

[278] G. Garcia-Faroldi, F. R. Melo, E. Ronnberg, M. Grujic, and G. Pejler, "Active caspase-3 is stored within secretory compartments of viable mast cells," *J Immunol,* vol. 191, no. 3, pp. 1445-52, Aug 1 2013.

[279] C. N. Zorn, J. Pardo, P. Martin, M. Kuhny, M. M. Simon, and M. Huber, "Secretory lysosomes of mouse mast cells store and exocytose active caspase-3 in a strictly granzyme B dependent manner," *Eur J Immunol,* vol. 43, no. 12, pp. 3209-18, Dec 2013.

[280] M. T. Silva, "Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program," *FEBS Lett,* vol. 584, no. 22, pp. 4491-9, Nov 19 2010.

[281] M. Sachet, Y. Y. Liang, and R. Oehler, "The immune response to secondary necrotic cells," *Apoptosis,* vol. 22, no. 10, pp. 1189-1204, Oct 2017.

[282] F. Y. Mai *et al.*, "Caspase-3-mediated GSDME activation contributes to cisplatin- and doxorubicin-induced secondary necrosis in mouse macrophages," *Cell Prolif,* vol. 52, no. 5, p. e12663, Sep 2019.

[283] L. Hu *et al.*, "Chemotherapy-induced pyroptosis is mediated by BAK/BAX-caspase-3-GSDME pathway and inhibited by 2-bromopalmitate," *Cell Death Dis,* vol. 11, no. 4, p. 281, Apr 24 2020.

[284] C. Fu *et al.*, "GSDME-mediated pyroptosis promotes anti-tumor immunity of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer," *Cancer Immunol Immunother,* vol. 73, no. 9, p. 177, Jul 2 2024.

[285] Z. Zhang, H. Zhang, D. Li, X. Zhou, Q. Qin, and Q. Zhang, "Caspase-3-mediated GSDME induced Pyroptosis in breast cancer cells through the ROS/JNK signalling pathway," *J Cell Mol Med,* vol. 25, no. 17, pp. 8159-8168, Sep 2021.

[286] D. Lagadic-Gossmann, L. Huc, and V. Lecureur, "Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles," *Cell Death Differ,* vol. 11, no. 9, pp. 953-61, Sep 2004.

[287] G. Taraboletti *et al.*, "Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH," *Neoplasia,* vol. 8, no. 2, pp. 96-103, Feb 2006.

[288] Z. Liu, S. Choksi, H. J. Kwon, D. Jiao, C. Liu, and Z. G. Liu, "Tumor necroptosis-mediated shedding of cell surface proteins promotes metastasis of breast cancer by suppressing anti-tumor immunity," *Breast Cancer Res,* vol. 25, no. 1, p. 10, Jan 26 2023.

[289] R. V. Talanian *et al.*, "Substrate specificities of caspase family proteases," *J Biol Chem,* vol. 272, no. 15, pp. 9677-82, Apr 11 1997.

[290] Y. Choe *et al.*, "Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities," *J Biol Chem,* vol. 281, no. 18, pp. 12824-32, May 5 2006.

[291] R. Vidmar, M. Vizovisek, D. Turk, B. Turk, and M. Fonovic, "Protease cleavage site fingerprinting by label-free in-gel degradomics reveals pH-dependent specificity switch of legumain," *EMBO J,* vol. 36, no. 16, pp. 2455-2465, Aug 15 2017.

[292] L. Tusar *et al.*, "Proteomic data and structure analysis combined reveal interplay of structural rigidity and flexibility on selectivity of cysteine cathepsins," *Commun Biol,* vol. 6, no. 1, p. 450, Apr 24 2023.

[293] A. Nishida and A. Andoh, "The Role of Inflammation in Cancer: Mechanisms of Tumor Initiation, Progression, and Metastasis," *Cells,* vol. 14, no. 7, Mar 25 2025.

[294] V. Y. Reddy, Q. Y. Zhang, and S. J. Weiss, "Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 92, no. 9, pp. 3849-53, Apr 25 1995.

[295] M. M. Markiewski *et al.*, "Modulation of the antitumor immune response by complement," *Nat Immunol,* vol. 9, no. 11, pp. 1225-35, Nov 2008.

[296] R. Frade, F. Rodrigues-Lima, S. Huang, K. Xie, N. Guillaume, and M. Bar-Eli, "Procathepsin-L, a Proteinase that Cleaves Human C3 (the Third Component of Complement), Confers High Tumorigenic and Metastatic Properties to Human Melanoma Cells1," *Cancer Research,* vol. 58, no. 13, pp. 2733-2736, 1998.

[297] U. Kishore and K. B. Reid, "C1q: structure, function, and receptors," *Immunopharmacology,* vol. 49, no. 1-2, pp. 159-70, Aug 2000.

[298] N. M. Thielens, F. Tedesco, S. S. Bohlson, C. Gaboriaud, and A. J. Tenner, "C1q: A fresh look upon an old molecule," *Mol Immunol,* vol. 89, pp. 73-83, Sep 2017.

[299] M. R. Artero, M. Lecerf, L. Roumenina, and J. Dimitrov, "Convergent patterns of protein binding promiscuity of complement proteins and immunoglobulins," *Immunobiology,* vol. 230, no. 4, p. 152981, 2025/07/01/ 2025.

[300] H. Xu, M. Niu, X. Yuan, K. Wu, and A. Liu, "CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target," *Exp Hematol Oncol,* vol. 9, no. 1, p. 36, Dec 10 2020.

[301] S. M. Varanasi, Y. Gulani, H. K. Rachamala, D. Mukhopadhyay, and R. S. Angom, "Neuropilin-1: A Multifaceted Target for Cancer Therapy," *Curr Oncol,* vol. 32, no. 4, Mar 31 2025.

[302] T. Chanmee, P. Ontong, and N. Itano, "Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment," *Cancer Lett,* vol. 375, no. 1, pp. 20-30, May 28 2016.

[303] C. Pellet-Many, P. Frankel, H. Jia, and I. Zachary, "Neuropilins: structure, function and role in disease," *Biochem J,* vol. 411, no. 2, pp. 211-26, Apr 15 2008.

[304] C. Battin *et al.*, "Neuropilin-1 Acts as a Receptor for Complement Split Products," *Front Immunol,* vol. 10, p. 2209, 2019.

[305] D. Brömme and S. Wilson, "Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis," in *Extracellular Matrix Degradation*, W. C. Parks and R. P. Mecham, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 23-51.

[306] M. Novinec and B. Lenarcic, "Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase," *Biol Chem,* vol. 394, no. 9, pp. 1163-79, Sep 2013.

[307] D. Qian *et al.*, "Cathepsin K: A Versatile Potential Biomarker and Therapeutic Target for Various Cancers," *Curr Oncol,* vol. 29, no. 8, pp. 5963-5987, Aug 22 2022.

[308] N. Montgomery *et al.*, "CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity," *Breast Cancer Res,* vol. 14, no. 3, p. R84, May 23 2012.

[309] G. Ren *et al.*, "Coronin 3 promotes gastric cancer metastasis via the up-regulation of MMP-9 and cathepsin K," *Mol Cancer,* vol. 11, p. 67, Sep 14 2012.

[310] J. Christensen and V. P. Shastri, "Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K," *BMC Res Notes,* vol. 8, p. 322, Jul 29 2015.

[311] R. B. Tajhya, R. S. Patel, and C. Beeton, "Detection of Matrix Metalloproteinases by Zymography," *Methods Mol Biol,* vol. 1579, pp. 231-244, 2017.

[312] S. J. Petricevic, A. Pavlovic, V. Capkun, K. Becic, and M. G. Durdov, "Cathepsin K expression in melanoma is associated with metastases," *Histol Histopathol,* vol. 32, no. 7, pp. 711-716, Jul 2017.

[313] P. Vertegel *et al.*, "Cell detachment: A review of techniques, challenges, and opportunities for advancing biomedical research and applications," *Prog Biophys Mol Biol,* vol. 196, pp. 50-68, Jun 2025.

[314] Y. Yang, H. Zheng, Y. Zhan, and S. Fan, "An emerging tumor invasion mechanism about the collective cell migration," *Am J Transl Res,* vol. 11, no. 9, pp. 5301-5312, 2019.

[315] M. Castaneda, P. den Hollander, N. A. Kuburich, J. M. Rosen, and S. A. Mani, "Mechanisms of cancer metastasis," *Semin Cancer Biol,* vol. 87, pp. 17-31, Dec 2022.

Bibliografija

Objave v povezavi z delom

E. Vidak, M. Vizovišek, N. Kavčič, M. Biasizzo, M. Fonović in B. Turk, „Apoptotic caspases-3 and -7 cleave extracellular domains of membrane-bound proteins from MDA-MB-231 breast cancer cells," *International Journal of Molecular Sciences*, Izv. 26, št. 8, pp. 3466-1-3466-22, 2025. doi: 10.3390/ijms26083466

M. Biasizzo, U. Javoršek, E. Vidak, M. Zarić in B. Turk, „Cysteine cathepsins: a long and winding road towards clinics," *Molecular aspects of medicine*, Izv. 88, pp. 101150-1-101150-24, 2022. doi: 10.1016/j.mam.2022.101150.

M. Vizovišek, E. Vidak, U. Javoršek, G. Mikhaylov, A. Kozak in B. Turk, „Cysteine cathepsins as therapeutic targets in inflammatory diseases," *Expert opinion on therapeutic targets*, Izv. 24, št. 6, pp. 573-588, 2020. doi: 10.1080/14728222.2020.1746765.

E. Vidak, U. Javoršek, M. Vizovišek in B. Turk, „Cysteine cathepsins and their extracellular roles: shaping the microenvironment," *Cells*, Izv. 8, št. 3, pp. 264-1-264-24, 2019. doi: 10.3390/cells8030264.

Prispevki na konferencah

E. Vidak, M. Vizovišek, R. Vidmar, N. Kavčič, M. Biasizzo, M. Fonović in B. Turk, „Identification of extracellular substrates of caspases-3 and -7 in cancer," v *Book of abstracts. Proteolysis at the interface between health and disease: FEBS ICGEB 2022 Advanced Course*, Bled, Slovenia, September 18-21, 2022. pp. 68.

E. Vidak, M. Vizovišek, R. Vidmar, N. Kavčič, M. Biasizzo, M. Fonović in B. Turk, „Extracellular substrates of apoptotic and inflammatory caspases in cancer," v 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons, Ljubljana, Slovenia: FEBS open bio. July 3-8, 2021, Izv. 11, št. s1, pp. 162.

E. Vidak, M. Vizovišek, R. Vidmar, N. Kavčič, M. Biasizzo, M. Fonović in B. Turk, „Extracellular substrates of apoptotic caspases in cancer," v *Book of abstracts. 6th Conference on Mitochondria, Apoptosis and Cancer (MAC'19)*, Prague, Czech Republic, September 17-20, 2019, pp. 85.

M. Vizovišek, R. Vidmar, B. Sobotič, E. Vidak, L. Kramer, N. Kavčič, B. Turk in M. Fonović, „Proteomic insights into extracellular proteolysis with cathepsin K,“ v *Book of abstracts. FEBS Workshop on Proteases, Inhibitors and Biological Control [within] 16. International Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control*, Portorož, Slovenia, September 8-12, 2018, pp. 24.

E. Vidak, K. Hrovat-Arnež in G. Gunčar, „Preparation of recombinant N-terminal domain of MLKL and antiMLKL nanobody and cloning of their fusion protein,“ v *Cutting edge 2015: scientific conference*, Ljubljana, Slovenia, September 2015, pp. 70.

Biografija

Eva Vidak je leta 2017 zaključila magistrski študijski program Biokemija na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani in pridobila naziv magistrica biokemije. Po pridobitvi naziva se je oktobra istega leta vpisala na doktorski študijski program Nanoznanosti in nanotehnologije (NANO3) na Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana ter se kot mlada raziskovalka zaposlila na Odseku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo. Pod mentorstvom prof. ddr. Borisa Turka je med leti 2017 in 2024 opravljala raziskovalno delo ter izsledke raziskav predstavila na številnih konferencah v Sloveniji in tujini. Od leta 2024 pa svojo karierno pot nadaljuje kot laboratorijska analitičarka na Kliničnem inštitutu za genetsko diagnostiko UKC Maribor.