

Urška Požgan

**Regulacija aktivnosti cisteinskih proteaz  
katepsinov B, S in K ter njihova vloga pri  
vnetnih procesih  
Doktorska disertacija**

**Regulation of cysteine proteases cathepsins  
B, S and K and their role in inflammatory  
processes  
Doctoral Dissertation**

*Mentor:* prof. ddr. Boris Turk

*Somentor:* prof. dr. Vito Turk

December 2009

**MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA**  
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL  
Ljubljana, Slovenija





# Kazalo

<b>Povzetek</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>Seznam kratic</b> .....	<b>IX</b>
Oznake aminokislin .....	X
Standardni genski kod .....	X
<b>1 Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1 Proteaze .....	1
1.2 Cisteinske proteaze .....	2
1.2.1 Lizosomski cisteinski katepsini .....	3
1.2.2 Inhibitorji lizosomskih cisteinskih proteaz .....	6
1.3 Metaloproteaze zunajceličnega matriksa .....	6
1.4 Sklepna obolenja in proteaze .....	9
1.4.1 Zgradba in funkcija sklepnega hrustanca .....	9
1.4.2 Osteoartroza .....	10
1.4.3 Revmatoidni artritis .....	11
1.4.4 Vloga proteaz v sklepnih obolenjih .....	12
1.5 Citrulinacija .....	14
1.5.1 Protitelesa proti citruliniranim peptidom .....	15
<b>2 Namen dela</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Materiali in metode</b> .....	<b>19</b>
3.1 Materiali .....	19
3.1.1 Kemikalije .....	19
3.1.2 Encimi .....	20
3.1.3 Protitelesa .....	20
3.1.4 Bakterijska gojišča .....	20
3.1.5 Kompleti reagentov .....	20
3.1.6 Gostiteljske bakterijske kulture .....	21
3.1.7 Vektorji .....	21
3.1.8 Klinični vzorci sinovijske tekočine .....	21
3.1.9 Pufri .....	22
3.1.10 Laboratorijska oprema .....	23
3.2 Metode .....	24
3.2.1 Izražanje gena za rekombinanten človeški prokatepsin B v bakteriji <i>Escherichia coli</i> .....	24
3.2.1.1 Priprava bakterijskih celičnih lizatov .....	24
3.2.2 Izolacija in čiščenje rekombinantnih proteinov .....	24
3.2.2.1 Izolacija inkluzijskih teles .....	24
3.2.2.2 Raztapljanje inkluzijskih teles in renaturacija prokatepsina B .....	24
3.2.2.3 Aktivacija prokatepsina B .....	25
3.2.2.4 Kromatografske tehnike čiščenja rekombinantnih proteinov .....	25
3.2.2.4.1 Anionska izmenjevalna kromatografija .....	25
3.2.2.4.2 Kationska izmenjevalna kromatografija .....	25
3.2.3 Biokemijska karakterizacija proteinov .....	26

3.2.3.1	Analiza proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS .....	26
3.2.3.1.1	Priprava kliničnih vzorcev sinovijske tekočine .....	26
3.2.3.2	Barvanje gelov s Commassie Brilliant Blue .....	26
3.2.3.3	Barvanje gelov s koloidnim srebrom .....	26
3.2.3.4	Encimsko imunski testi .....	27
3.2.3.4.1	Detekcija proteinov s prenosom Western .....	27
3.2.3.4.2	Direktni test ELISA .....	27
3.2.3.5	Encimska kinetika .....	28
3.2.3.5.1	Določitev aktivne koncentracije rekombinantnih encimov z inhibitorjem E-64 .....	28
3.2.3.5.2	Merjenje aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine .....	28
3.2.3.5.3	Merjenje aktivnosti izbranih MMP-jev v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine .....	28
3.2.4	Statistična obdelava podatkov .....	29
3.2.5	<i>In vitro</i> reakcija citrulinacije modelnih proteinov .....	29
3.2.6	Cepitve citruliniranih in necitruliniranih modelnih proteinov s cisteinskimi katepsini B, S in K ter z MMP-1 in MMP-3 .....	29
<b>4</b>	<b>Rezultati .....</b>	<b>31</b>
4.1	Priprava rekombinantnih proteinov .....	31
4.1.1	Izražanje gena za človeški rekombinanten prokatepsin B v bakteriji <i>Escherichia coli</i> , izolacija ter čiščenje .....	31
4.1.2	Določanje aktivne koncentracije katepsina B in prokatepsina B .....	32
4.2	Določitev proteolizne aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov ter metaloproteaz zunajceličnega matriksa v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine .....	33
4.2.1	Določitev encimske aktivnosti cisteinskih katepsinov .....	33
4.2.2	Določitev encimske aktivnosti metaloproteaz zunajceličnega matriksa .....	34
4.3	Raven izražanja izbranih cisteinskih katepsinov in metaloproteaz zunajceličnega matriksa ter cistatina C v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine .....	35
4.3.1	Raven izražanja cisteinskih katepsinov B in S ter cistatina C v vzorcih sinovijske tekočine .....	35
4.3.2	Raven izražanja proteinov MMP-1 in MMP-3 v vzorcih sinovijske tekočine .....	36
4.3.3	Določitev vsebnosti izbranih proznetnih citokinov in katepsina S v vzorcih sinovijske tekočine .....	37
4.4	Študij <i>in vitro</i> razgradnje/procesiranja citruliniranih in necitruliniranih modelnih proteinov z izbranimi cisteinskimi proteazami ter metaloproteazami zunajceličnega matriksa .....	38
4.4.1	Razgradnja/procesiranje citrulinirane in necitrulinirane želatine kolagena tipa I s cisteinskimi katepsini B, K in S ter metaloproteazama zunajceličnega matriksa-1 in -3 .....	39
4.4.2	Razgradnja/procesiranje native oblike kolagena tipa II s cisteinskimi katepsini B, K in S ter metaloproteazama zunajceličnega matriksa-1 in -3 .....	42
<b>5</b>	<b>Razprava .....</b>	<b>45</b>
5.1	Profil izražanja in aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov in metaloproteaz zunajceličnega matriksa v vzorcih sinovialne tekočine bolnikov z revmatoidnim artritism in osteoartritozo .....	45
5.2	Vpliv citrulinacije na <i>in vitro</i> razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa z izbranimi cisteinskimi katepsini in metaloproteazami zunajceličnega matriksa .....	48
<b>6</b>	<b>Zaključki .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Zahvale .....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Literatura in viri .....</b>	<b>55</b>
	<b>Kazalo slik .....</b>	<b>65</b>
	<b>Kazalo tabel .....</b>	<b>67</b>
	<b>Priloge .....</b>	<b>69</b>

## Povzetek

Proteaze so encimi, ki so odgovorni za razgradnjo peptidnih vezi v proteinskih oziroma peptidnih substratih, ki lahko ključno vplivajo na številne biološke procese. Zaradi tega mora biti proteolizna aktivnost proteaz natančno kontrolirana in uravnana. Nepravilno delovanje proteaz tako vodi do številnih bolezni. Bolezni sklepov delimo na vnetna, mednje sodi revmatoidni artritis (RA), in degenerativna (osteoartroza, OA) obolenja, kjer zaradi nepravilnega delovanja proteaz pride do razgradnje sklepnega hrustanca in kosti v obolenem sklepu. Proteaze, ki sodelujejo pri teh procesih, spadajo v skupini metaloproteaz zunajceličnega matriksa (MMP) in lizosomskih cisteinskih proteaz (katepsinov). Pri nastanku obolenj imajo pomembno vlogo tudi provnetni citokini, kot so interlevkin-1 $\beta$ , interlevkin-6 in dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), ki vplivajo na raven izražanja genov proteaz, ki sodelujejo pri procesih razgradnje. Prav tako do sedaj ni bilo narejene primerjalne študije ravni izražanja izbranih proteaz in njihovih proteoliznih aktivnosti med bolniki z RA in OA. Namen prvega dela doktorskega dela je bil določiti raven izražanja proteinov različnih provnetnih citokinov (IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\alpha$ ), izbranih cisteinskih katepsinov (katepsina B in S) in metaloproteaz zunajceličnega matriksa (MMP-1, -3 in -13) kot tudi njihove proteolitske aktivnosti v vzorcih sinovijske tekočine bolnikov obolenih z RA ali OA. Tako smo pokazali, da sta oba izbrana cisteinska katepsina in metaloproteaze zunajceličnega matriksa-1, -3 in 13 prisotni v vzorcih sinovijske tekočine bolnikov in da je njihov raven izražanja statistično značilno povišan pri bolnikih z RA. Podrobnejša analiza je pokazala, da ima med izbranimi cisteinskimi katepsini najpomembnejšo vlogo katepsin S, ki tudi pomembno vpliva na delovanje imunskega sistema. Ti rezultati tako nakazujejo pomembno vlogo cisteinskih katepsinov pri vnetnem odzivu, ki se razvije pri RA. Poleg izbranih proteaz pa smo v vseh vzorcih sinovijske tekočine določili tudi interlevkin-6, s statistično značilno razliko pri bolnikih z RA v primerjavi z OA, kar kaže pomembno vlogo tega provnetnega citokina pri stimulaciji izražanja teh proteaz med vnetnim odzivom.

Citrulinacija je posttranslacijska modifikacija proteinov, kjer se argininski aminokislinski preostanek spremeni v citrulin, ki predstavlja nenaravni aminokislinski preostanek. Reakcijo katalizira peptidilarginin deiminaza (PAD). Predvideva se, da se lahko s citrulinacijo spremeni imunogenost tarčnega proteina, ki zaradi spremenjenih aminokislinskih preostankov sproži avtoimunski odziv. Skladno s to idejo so pri bolnikih z RA našli tako citrulinirane proteine kot tudi protitelesa proti citruliniranim proteinom. Poleg tega pa so protitelesa proti citruliniranim proteinom postala zanesljiv diagnostični kazalec za ugotavljanje RA. S citrulinacijo lahko vplivamo na razgradnjo tarčnega proteina, saj s spremembo pozitivno nabitih argininskih aminokislinskih preostankov vplivamo na intra- in intermolekularne interakcije. Namen drugega dela doktorskega dela je pokazati, da so lahko citrulinirani proteini zunajceličnega matriksa bolj dovzetni za razgradnjo z izbranimi proteazami, za katere je bilo že pokazano, da so udeležene pri razvoju in napredovanju RA. Kolagena tipa I in tipa II, kot glavni sestavini kostnine in sklepnega hrustanca, tako predstavljata modelna proteina za študijo vpliva citrulinacije na razgradnjo z izbranimi proteazami. Uspešno smo citrulinirali želatino kolagena tipa I pri *in vitro* pogojih pri 37 °C, kar smo tudi potrdili z uporabo protiteles proti citruliniranim peptidom. Pokazali smo, da je citrulinirana oblika želatine kolagena tipa I bolj dovzetna za razgradnjo s cisteinskimi katepsini B, K in S kot necitrulinirana oblika. Teh rezultatov nismo mogli potrditi pri razgradnji oziroma procesiranju obeh oblik želatine tipa I z izbranimi metaloproteazami zunajceličnega matriksa-1 in -3. Nativne oblike kolagena tipa II, pod temi eksperimentalnimi pogoji, nismo uspeli citrulinirati.



## Abstract

Proteases are responsible for enzymatic cleavage of peptide bonds, which is a basic requirement for completion of diverse biological processes. The proteolytic activity of proteases must be rigorously controlled to avoid inappropriate degradation of proteins. Imbalance in regulation of proteolytic activity can be found in a wide range of diseases. Degradation of articular cartilage and bone is a characteristic feature of various types of arthritic diseases, including rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA). These irreversible changes are probably mediated by the excessive protease activity resulting from increased expression of matrix metalloproteinase (MMPs) and cysteine cathepsins families and/or an altered equilibrium between these proteases and their endogenous inhibitors. In addition, proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), are believed to contribute to tissue damage in arthritis by inducing the release of tissue-degrading proteases. A detailed comparison between the protease levels and activities between RA samples and OA samples has never been made. The aim of our study was to determine the protein levels of certain proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ), selected cysteine cathepsins (cathepsin B and S) and matrix metalloproteases (MMP-1, -3 and -13) as well as their proteolytic activities in samples of synovial fluid from patients with either RA or OA. We showed that both cysteine cathepsins B and S and matrix metalloproteases-1, -3 and -13 have been detected in patient synovial fluid samples with significantly higher levels detected in rheumatoid arthritis patients. Among the proteases, cathepsin S was found to be significantly elevated, consistent with its critical role in the immune response. These results suggest that cysteine cathepsins have a major role in inflammation at least in RA. In addition to proteases, interleukin-6 was detected at significant levels in most samples, suggesting that proinflammatory cytokines may be involved in the stimulation of expression of these proteases during inflammation.

Citrullination is a posttranslational modification in a protein where arginine is converted into the non-natural amino acid citrulline. This process is catalyzed by the enzyme peptidylarginine deiminase (PAD). It is believed that citrullination can convert a nonimmunogenic protein into an autoimmunogenic protein. Consistent with this idea, citrullinated proteins as well as antibodies against citrullinated proteins are found in patients with RA. Moreover, antibodies against citrullinated proteins have become a reliable diagnostic marker for RA. In addition, citrullination may affect protein degradation as molecular interactions that are mediated by positively charged arginine residues are lost upon citrullination. The goal of this study was to evaluate the effect of citrullination of extracellular matrix proteins on their susceptibility for degradation by proteases that have been implicated into articular cartilage and bone erosion in RA. Since type I and type II collagens are major components of articular cartilage and bone matrix, they also represent our model proteins for this study. We managed to perform *in vitro* citrullination of gelatine type I with a commercially available PAD enzyme at 37 °C. Successful citrullination was confirmed using antibodies against citrullinated proteins. We have showed that citrullinated form of gelatine type I is more susceptible for degradation by cysteine cathepsin B, K and S than non-citrullinated. These results were not confirmed using MMP-1 and MMP-3. On the other hand we were not able to perform citrullination of native form of type II collagen under these experimental conditions.



## Seznam kratic

Abu	=	<i>L</i> -aminobutil
Abz	=	<i>L</i> -aminobenzoil
AcOH	=	ocetna kislina
ADAM	=	disintegrinu in metaloprotazi podobna proteaza ( <i>angl. a disintegrin and metalloproteinase-like</i> )
$A_{xxx}$	=	absorbanca pri valovni dolžini xxx nm
CatB	=	katepsin B
CatS	=	katepsin S
Cha	=	<i>L</i> -cikloheksilalanin
CystC	=	cistatin C
Da	=	dalton; enota za molsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa $^{12}\text{C}$
dH <sub>2</sub> O	=	deionizirana voda
DNaza	=	deoksiribonukleaza
Dnp	=	2,4-dinitrofenil
Dpa	=	3-(2,4-dinitrofenil)- <i>L</i> -2,3-diaminopropionska kislina
<i>E. coli</i>	=	bakterija <i>Escherichia coli</i>
ECM	=	zunajcelični matriks ( <i>angl. extracellular matrix</i> )
EDTA	=	etilendiamintetraacetat
ELISA	=	encimsko imunski test ( <i>angl. enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EtOH	=	etanol
$F_{yyy/xxx}$	=	fluorescenca pri valovni dolžini xxx nm ob ekscitaciji pri yyy nm
GAG	=	glikozaminoglikan
Gdn-HCl	=	gvanidinijev hidroklorid
GPI	=	glikozilfosfatidilinozitol ( <i>angl. glycosylphosphatidylinositol</i> )
HRP	=	hrenova peroksidaza
IL-1 $\beta$	=	interlevkin-1 $\beta$
IL-6	=	interlevkin-6
LB gojišče	=	gojišče Luria-Bertanijevo
mAb	=	monoklonsko protitelo
MeOH	=	metanol
MHC	=	poglavitni histokompatibilnostni kompleks ( <i>angl. major histocompatibility complex</i> )
MMP	=	metaloproteaza zunajceličnega matriksa
mRNA	=	informacijska RNA
Nva	=	norvalin
OA	=	osteoartroza
OD <sub>600</sub>	=	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm ( <i>angl. optical density</i> )
P	=	verjetnost
pAb	=	poliklonsko protitelo
PAD	=	peptidilarginin deiminaza
PAGE	=	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	=	fosfatni pufer z dodatkom NaCl
pH	=	negativni desetiški logaritem aktivnosti H <sup>+</sup> ionov
RA	=	revmatoidni artritis
RNA	=	ribonukleinska kislina
rpm	=	obrati na minuto
S.D.	=	standardna deviacija
TNF- $\alpha$	=	dejavnik tumorske nekroze alfa
w/v	=	razmerje masa/volumen

X

v/v = razmerje volumen/volumen

### Oznake aminokislin

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

### Standardni genski kod

Prva lega	Druga lega								Tretja lega
	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCA	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

# 1 Uvod

## 1.1 Proteaze

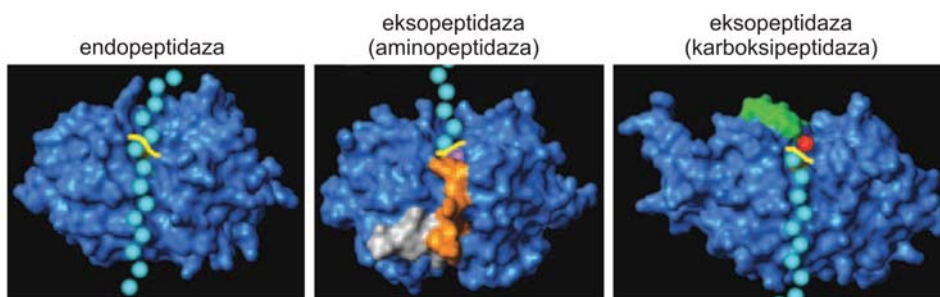
Proteaze, imenovane tudi proteolizni encimi ali peptidaze, so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidnih vezi v proteinskih oziroma peptidnih substratih [1]. Razvoj bioinformatike je omogočil podrobnejšo analizo človeškega genoma, v katerem so določili prisotnost okoli 500-600 proteaz, kar predstavlja ~ 2 % celotnega človeškega genoma [2].

Proteaze sodelujejo pri številnih ireverzibilnih fizioloških procesih, kot so koagulacija krvi, uravnavanje krvnega pritiska, uravnavanje ravnotežja ionov, zorenje hormonov, imunski odziv, apoptoza in razgradnja znotrajceličnih proteinov [3]. Nepravilno delovanje proteaz je povezano s številnimi bolezenskimi stanji, kot so rak, revmatoidni artritis in osteoartritoza, Alzheimerjeva bolezen, mišična distrofija ter številna druga obolenja, zato mora biti delovanje proteaz natančno regulirano, običajno s pomočjo različnih proteaznih inhibitorjev. Večina proteaz se sintetizira v obliki neaktivnih prekurzorjev in se kasneje aktivira z odcepom prodelca encima s pomočjo drugih proteaz ali avtokatalitsko [4, 5].

Proteaze razvrščamo na različne načine. Glede na izvor jih delimo na mikrobne, rastlinske in živalske. Glede na mesto cepitve substratov na endopeptidaze, ki cepijo znotraj polipeptidne verige in eksopeptidaze, ki cepijo na koncih polipeptidnih vezi (slika 1). Glede na lokacijo v organizmu pa jih delimo na znotrajcelične in zunajcelične [6]. Po pravilih Encimske nomenklature (IUB Nomenclature Committee, 1984 [7]) so proteaze razdeljene tako, kot so prikazane v tabeli 1. Endopeptidaze se delijo na osnovi različnih katalitskih mehanizmov, eksopeptidaze pa glede na specifičnost odcepljanja različno velikih fragmentov s karboksilnega ali amino terminalnega konca polipeptidne molekule. Takšna razvrstitev pa ima tudi nekatere pomanjkljivosti, saj ne upošteva, da imajo lahko proteaze tako endo- kot eksopeptidazno aktivnost. V zadnjem času se za razvrščanje proteaz veliko bolj uveljavlja sistem MEROPS [8], ki deli proteaze na osnovi njihovega katalitskega mehanizma in njihove evolucijske sorodnosti [9]. Splošen mehanizem hidrolize peptidne vezi poteka preko treh skupin [10]:

- nukleofilne skupine, ki napade karbonilno skupino in tvori tetraedrični intermediat,
- pozitivno nabite skupine oziroma predela, ki stabilizira negativen naboj kisikovega atoma in tetraedrični intermediat,
- donorja protonov, ki olajša odhod aminokislinskega preostanka.

Pri proteazah serinskega, treoninskega in cisteinskega tipa ima vlogo nukleofila atom kisika ali žvepla stranske verige aminokislinskega preostanka, ki se nahaja v aktivnem mestu. Pri metalo- in aspartatnih proteazah pa je nukleofil molekula vode, vezana v aktivno mesto encima. Po MEROPS delitvi klani združujejo proteaze s podobno terciarno strukturo. Proteaze znotraj klana pa so uvrščene v družine glede na visoko stopnjo ujemanja aminokislinskega zaporedja [9].

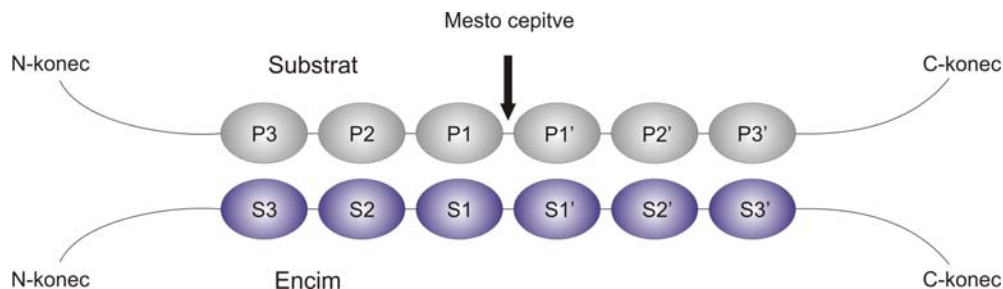


Slika 1: Shematski prikaz strukture endopeptidaze in eksopeptidaz. Katepsin L kot endopeptidaza, katepsin H kot aminopeptidaza in katepsin X kot karboksipeptidaza z ustreznimi peptidnimi substrati (povzeto po [1]).

Tabela 1: Razvrstitev proteaz (IUB Nomenclature Committee, 1984).

	OZNAKA	NAČIN DELITVE
endopeptidaze	serinske (E.C.3.4.21)	katalitski mehanizem
	cisteinske (E.C.3.4.22)	
	aspartatne (E.C.3.4.23)	
	metaloproteinaze (E.C.3.4.24)	
	treoninske (E.C.3.4.25)	
	z neznanim mehanizmom delovanja (E.C.3.4.99)	
eksopeptidaze	aminopeptidaze (E.C.3.4.11)	odcepljanje s C-konca ali N-konca proteinskega substrata
	dipeptidaze (E.C.3.4.13)	
	dipeptidil peptidaze in tripeptidil peptidaze (E.C.3.4.14)	
	peptidil dipeptidaze (E.C.3.4.15)	
	karboksipeptidaze (E.C.3.4.16-18)	
	omega peptidaze (E.C.3.4.19)	

Vezava substrata v aktivno mesto poteka preko specifičnih vezavnih mest, ki sta jih poimenovala Schechter in Berger na papainu [11]. Aminokislinski preostanki substrata potekajo vzdolž aktivnega mesta encima v iztegnjeni konformaciji, pri čemer so stranske verige izmenično obrnjene proti levi in desni domeni. Mesta na substratu, ki pridejo v stik z vezavnim mestom na encimu, so poimenovali od N-konca proti C-koncu s P<sub>3</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>', P<sub>2</sub>', P<sub>3</sub>', itd. Podobno so vezavna mesta za substrat na encimu poimenovala s S<sub>3</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>', S<sub>2</sub>', S<sub>3</sub>', itd., kot je to prikazano na sliki 2. Kasnejše kinetične in strukturne študije so pokazale, da so točno določena vezavna mesta pri papainu podobnih cisteinskih proteazah S<sub>2</sub>, S<sub>1</sub> in S<sub>1</sub>'. Aminokislinski preostanki, ki se vežejo pred P<sub>3</sub> in po P<sub>2</sub>', pa zavzamejo bolj ohlapno določena območja [12].



Slika 2: Definicija vezavnih mest za substrat (povzeto po [11]).

## 1.2 Cisteinske proteaze

Med cisteinske proteaze uvrščamo proteaze pri katerih mehanizem delovanja predstavlja nukleofilno reakcijo napada tiolne skupine cisteinskega (Cys) preostanka na peptidno vez. Histidinski (His) preostanek pa predstavlja vlogo donorja protonov pri reakciji [13].

Cisteinske proteaze so v naravi zelo razširjene. Najdemo jih tako v evkariontskih in prokariontskih organizmih, kot tudi v virusih. Na osnovi ohranjenega zaporedja aminokislinskih preostankov v aktivnem mestu posameznega encima, so cisteinske proteaze razvrščene v klane. Za vsak klan je značilen določen vrstni red Cys – His v aminokislinskem zaporedju in določena terciarna struktura, ki skupino teh proteaz razdeli naprej v družine. Klani cisteinskih proteaz so prikazani v tabeli 2. Še nekaj družin cisteinskih proteaz najdemo v klanih proteaz mešanega tipa PA, PB in PC. Obstajajo pa še tri družine cisteinskih proteaz, ki niso uvrščene v nobenega od klanov [13]. Encimi najboljšejšega klana CA, kamor uvrščamo najbolj raziskani družini, papainovo in kalpainovo, imajo v aminokislinskem zaporedju katalitski cistein pred histidinom, za reakcijo pa potrebujejo še asparagin. V to skupino prištevamo še rastlinske proteaze kot

so kimopapain, karikain, bromelain, aktinidin, kruzipain, proteaze nekaterih parazitov ter živalske proteaze, med katere prištevamo tudi lizosomske cisteinske proteaze, ki so prisotne tudi pri človeku [14].

Tabela 2: *Klani cisteinskih proteaz*. Poleg števila družin, ki so uvrščene v posamezen klan, so v tabeli prikazana še zaporedja ohranjenih aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu [13].

KLAN	ŠTEVILO DRUŽIN	ZAPOREDJE OSTANKOV V AKTIVNEM MESTU
CA	30 +	Cys, His, Asn (ali Asp)
CD	5	His, Cys
CE	5	His, Glu (ali Asp), Cys
CF	1	Glu, Cys, His
CH	1	Cys, Thr, His
CL	1	His, Cys

### 1.2.1 Lizosomski cisteinski katepsini

Lizosomske cisteinske proteaze, znane tudi kot katepsini, so bile odkrite v prvi polovici 20. stoletja [15]. Spadajo v skupino papainu podobnih encimov in se uvrščajo v klan CA in družino C1A. Poznanih je 19 cisteinskih katepsinov živalskega izvora, od tega 11 pri človeku: B, C, F, H, K, L, O, S, V, W in X. Preostalih osem jih je bilo odkritih v placenti glodalcev (katepsini -1, -2, -3 ter -6 pri miših in katepsini M, P, Q ter R pri podganah) [13].

Katepsini se sintetizirajo kot preproencimi, ki predstavljajo encimsko neaktivno obliko proteoliznega encima, ter se nato procesirajo do zrelega monomernega proteina z molsko maso ( $M$ ) med 20 000 in 35 000 Da, z izjemo katepsina C, ki je edini poznan tetramer z molsko maso  $\sim 200\,000$  Da. Signalni peptid služi za usmerjanje encima v lumen endoplazemskega retikuluma, kjer ga odcepi signalna proteaza. Propeptid, ki je odgovoren za pravilno zvitje proteina, preprečuje encimsko aktivnost ter pomaga pri usmerjanju encima v lizosom oziroma endosom. V Golgijevem aparatu se na propeptidu veže manoza-6-fosfat, ki predstavlja signal za prenos proteina v lizosom oziroma endosom, kjer se nahajajo receptorji za manoza-6-fosfat [16].

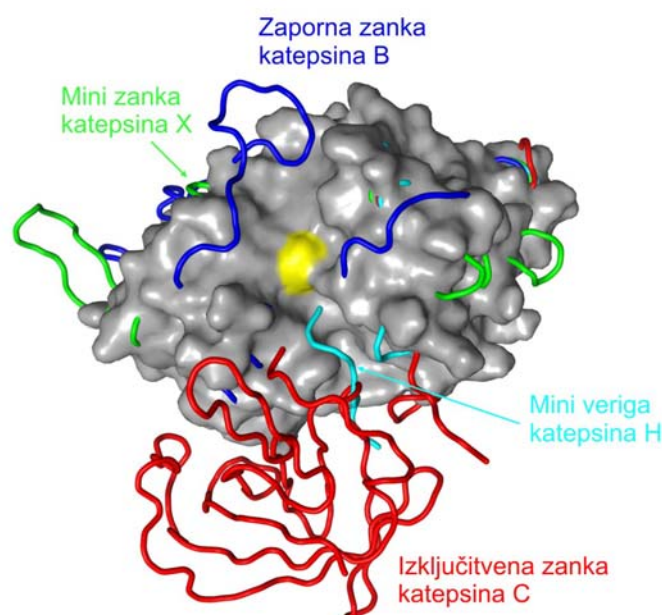
Encim sestavlja dve domeni, ki ju loči žep aktivnega mesta v obliki črke V. N-končno domeno, imenovano tudi L domena (*angl. Left*, levo), sestavljajo tri  $\alpha$ -vijačnice, medtem ko je prepoznavna značilnost C-končne domene, imenovane tudi R domena (*angl. Right*, desno), sodčku podobna struktura, sestavljena iz antiparalelne  $\beta$ -ploskve. Katalitski Cys25 (papainovo štetje) se tako nahaja v levi domeni na N-terminalnem delu  $\alpha$ -vijačnice, medtem ko se His159 nahaja na desni domeni na nasprotni strani žepa. Substrati se vežejo vzdolž žepa z aktivnim mestom v iztegnjeni konformaciji [4, 14, 15]. Podrobnejša analiza strukture zimogena je pokazala, da propeptid zavira dostop do aktivnega mesta, ki je že oblikovano v proencimu, saj poteka preko aktivnega mesta v nasprotni smeri kot substrat. Aktivacija prokatepsinov v aktivno obliko lahko poteče med dvema enakima molekulama (avtokatalitsko) v kislem okolju (pH vrednost med 4.5 in 6.5), kot je to v lizosomih, ali pa s pomočjo delovanja drugih proteaz, kot so pepsin, nevtrofilna elastaza, katepsin D in še nekatere druge. Pri večini prokatepsinov aktivacija poteče po mehanizmu avtoaktivacije, ki ga sproži znižanje vrednosti pH. Tako postanejo interakcije med propeptidom ter zrelem encimom šibkejšje in propeptid lahko zavzame ohlapnejšo konformacijo, vendar se pri tem sekundarna struktura ohrani. Sosednje molekule v raztopini nato odcepijo propeptid. To so najverjetneje molekule proencima, saj je bilo pokazano, da imajo nekateri prokatepsini tudi nizko encimsko aktivnost [17]. Zrele molekule encima, ki se sprostijo po cepitvi propeptida, so odgovorne za nadaljnji potek procesiranja [18]. Prav tako pa lahko aktivacijo nekaterih prokatepsinov (B, L in S) sprožijo različni glikozaminoglikani (GAG-i) [17]. Ti se lahko nahajajo v lizosomih kot produkti razgradnje proteoglikanov [19] in tako vplivajo na *in vivo* procesiranje lizosomskih cisteinskih proteaz tako, da oslabijo interakcijo med propeptidom in zrelem encimom [16].

Katepsini imajo raznovrstne encimske aktivnosti (tabela 3). Večina med njimi jih deluje kot endopeptidaze, nekateri med njimi pa imajo eksopeptidazno aktivnost. Tako poznamo aminopeptidaze (katepsin C), karboksimonopeptidaze (katepsin X), aminomonopeptidaze (katepsin H) ter karboksidiptidaze (katepsin B). Katepsina B in H pa imata poleg eksopeptidazne tudi endopeptidazno aktivnosti. Pri eksopeptidazah dostop do substrata vezavnega mesta preprečujejo strukturne posebnosti (slika 3). Tako zaporna zanka (*angl. occluding-loop*) pri katepsinu B in mini zanka (*angl. mini-loop*) pri katepsinu X onemogočata vezavo substratov na S' strani aktivnega mesta, medtem ko mini veriga (*angl. mini-chain*) pri katepsinu H in izključitvena domena (*angl. exclusion domain*) pri katepsinu C onemogočata

vezavo na S strani aktivnega mesta [4]. Katepsini so v večini primerov glikozilirani ter sestavljeni iz težke in lahke verige, ki sta med seboj povezani z disulfidno vezjo [15].

Tabela 3: Poimenovanje in katalitske lastnosti človeških lizosomskih cisteinskih proteaz [15].

IME	EC OZNAKA	SINONIM	VRSTA PEPTIDAZNE AKTIVNOSTI
katepsin F	3.4.22.41	-	endopeptidaza
katepsin K	3.4.22.38	katepsin O, O2, X	endopeptidaza
katepsin L	3.4.22.15	-	endopeptidaza
katepsin S	3.4.22.27	-	endopeptidaza
katepsin V	3.4.22.43	katepsin L2, U	endopeptidaza
katepsin O	3.4.22.42	-	ni znano
katepsin W	3.4.22.-	limfopain	ni znano
katepsin B	3.4.22.1	katepsin B1	endopeptidaza, karboksidiptidaza
katepsin H	3.4.22.16	katepsin I	endopeptidaza, aminomonopeptidaza
katepsin X	3.4.18.1	katepsin Z, P, Y	karboksimono(di)peptidaza
katepsin C	3.4.14.1	dipeptidil peptidaza I, katepsin J	aminodipeptidaza



Slika 3: Strukturne posebnosti eksopeptidaz [4]. Na sliki so prikazani katepsin B (modro), katepsin C (rdeče), katepsin H (svetlo modro) in katepsin X (zeleno) na površini katepsina L (1ICF.pdb, siva površina). Slika je narejena s programom PyMOL.

Katepsini se v večjih količinah nahajajo v vranici, ledvicah in jetrih, kjer sodelujejo predvsem pri nespecifični znotrajcelični razgradnji proteinov. Najpogostejši med njimi so katepsini B, H in L, medtem ko so katepsini F, S in W tkivno specifični. Določeni katepsini pa imajo še druge specifične funkcije in zato ni presenetljivo, da nepravilno delovanje katepsinov vodi do številnih patoloških stanj. Pri večini obolenj najdemo katepsine izven lizosomov in celo zunajcelično, pogosto v bolj stabilni proencimski obliki [20]. Ker imajo katepsini zelo pomembno vlogo pri homeostazi celice, in ker so lahko škodljivi zunaj celice, je potrebno njihovo aktivnost nadzorovati. Na celičnem nivoju obstajajo različni načini nadzora proteolizne aktivnosti: pH optimum delovanja, prostorska ločitev, inhibicija z endogenimi proteinskimi inhibitorji, aktivacija encimskih zimogenov. Optimalna pH vrednost večine katepsinov je v rahlo kislem območju, za delovanje pa potrebujejo tudi reducirajoče okolje. Oboje je značilno za okolje lizosomov oziroma endosomov. Če pridejo iz okolja lizosomov, se kmalu denaturirajo. Denaturacija v nevtralnem ali alkalnem pH območju poteče zaradi deprotonacije histidinskega preostanka His159, ki predstavlja sestavni del

katalitskega para. Zato se prekinejo določene elektrostatske interakcije, nabiti aminokislinski preostanki pa se izpostavijo topilu. S tem se terciarna struktura poruši in encim se ireverzibilno razvije [21].

Razširjenost katepsina B je povezana z dejstvom, da je odgovoren za pomemben del celičnih procesov, tako fizioloških kot patoloških. Zaradi svoje endopeptidazne in karboksipeptidazne aktivnosti sodeluje na začetku in na koncu proteinske razgradnje v lizosomih. V določenih primerih pa ima lahko katepsin B tudi bolj specifično vlogo [22]. Tako lahko sodeluje pri aktivaciji prorenina [23] in prekursorja tiroidnih hormonov tiroglubulina [24] ter pri preoblikovanju zunajceličnega matriksa (ECM) [25]. Povišana raven in porazdelitev katepsina B na površini tumorjev so osnova predpostavke, da ima katepsin B pomembno vlogo pri procesih invazivnosti in metastaziranja [26, 27]. Poleg tega pa je povezan še z obolenji sklepov in kosti [28], z vnetji dihalnih poti [29] in z akutnim vnetjem trebušne slinavke [30]. Nezrel človeški preprokatepsin B sestavlja 339 aminokislinskih preostankov, od tega jih je v zreli obliki 254, signalni peptid je sestavljen iz 17 aminokislinskih preostankov, propeptid pa iz 62, medtem ko 6 aminokislinskih preostankov predstavlja podaljšek na C-terminalnem koncu. Sam katepsin B vsebuje tudi šest disulfidnih vezi in je glikoziliran na dveh asparaginskih preostankih (Asn39 in Asn192) s pomočjo ustreznih N-oligosaharidov (N-manoza) [31].

Katepsin K je ključna proteaza, ki sodeluje pri preoblikovanju kosti. Večinoma se izraža v osteoklastih, kar potrjuje dejstvo, da lahko katepsin K razgrajuje osnovne gradnike kosti [32, 33]. Zelo učinkovito lahko razgrajuje elastin ter kolagen tipa I, ki predstavljata kar 90 % organske kostne mase, ter kolagen tipa II in agrekan, ki sta glavna gradnika sklepne hrustanca [34, 35]. Katepsin K tako povežemo z različnimi sklepnimi obolenji, saj je bilo pokazano, da ga sinovialni fibroblasti bolnikov z revmatoidnim artritisom prekomerno izražajo [35-37]. Številne nesmiselne mutacije v genu za katepsin K povzročajo piknodizostozo, za katero so značilne hude deformacije kosti [38, 39]. Informacijsko RNA (mRNA) katepsina K pa so našli tudi drugje, v jajčnikih, srcu, pljučih, skeletnih mišicah ter v tankem in debelem črevesju [40]. Katepsin K nastane kot nezrel prepro-encim, ki je sestavljen iz 329 aminokislinskih preostankov, od tega jih je v zreli obliki 215, signalni peptid je sestavljen iz 15 aminokislinskih preostankov, propeptid pa iz 99. Sama struktura vsebuje tudi tri disulfidne vezi in eno glikozilacijsko mesto na aminokislinskem preostanku Asn103.

Katepsin S predstavlja pomemben člen v predstavitvi antigenov povezanih s pglavitnim histokompatibilnostnim kompleksom razreda II (MHC razredom II) v celicah, ki nastajajo v kostnem mozgu, ter ima pomembno vlogo pri razgradnji invariantne verige [41, 42]. Ena izmed posebnosti katepsina S je, da je stabilen v nevtralnem območju pH, kar kaže na njegovo vlogo in aktivnost zunaj lizosomov. Sodeluje lahko pri razgradnji proteinov, ki pridejo v celico od zunaj [43, 44], ter pri razgradnji molekule zunajceličnega matriksa pri nevtralnem pH. Povezali so ga z različnimi obolenji kot so različna sklepnna obolenja [43], Alzheimerjevo obolenje [45, 46] ter še nekaterimi drugimi degenerativnimi obolenji, ki so povezana s celicami mononuklearnega fagocitoznega sistema [25, 47]. Tudi katepsin S nastane kot nezrel prepro-encim, ki ga sestavlja 331 aminokislinskih preostankov, od tega jih 16 pripada signalnemu peptidu, propeptid sestavlja 98 in zrela oblika 217 aminokislinskih preostankov. Sam katepsin S pa vsebuje tudi 4 disulfidne vezi in eno glikozilacijsko mesto na aminokislinskem preostanku Asn104.

Katepsin C sodeluje pri aktivaciji proencimov kimotripsinu podobnih serinskih proteaz kot so grancimi A, B in C, katepsin G, nevtrofilna elastaza ter kimaza [48]. Okvare v genu za katepsin C in izguba njegove aktivnosti privedejo do Papillon-Lefèvre-ovega in Haim-Munk-ovega sindroma, ki se kažeta kot periodontitis in/ali palmoplanarna keratoza [49]. Povezali pa so ga tudi z mišično distrofijo [50] in astmo [51].

Katepsin F najdemo v makrofagih [52], ki so ključni pri modifikaciji in fuziji (spajanju) LDL delcev pri razvoju arterioskleroze. Med različnimi cisteinskimi proteazami se je katepsin F pokazal za najučinkovitejšega pri spajanju teh delcev in tako predstavlja morebiten marker pri zdravljenju arterioskleroze [53]. Pri miših z izbitim genom za katepsin F se pojavi stopnjujoč propad nevronske celice, ki vodi do različnih obolenj [54].

Katepsin H je ključen pri procesiranju prooblike proteina C, ki je surfaktant in sodeluje pri vzdrževanju stabilnosti pljučnih mešičkov [55], njegove vrednosti pa so bile povišane tudi v serumu pri bolnikih z astmo [56]. Povečano raven izražanja katepsina H opazimo tudi pri mnogih oblikah raka, čeprav še ni točno znano, kako vpliva na razvoj rakavega obolenja. Predvideva se, da z razgradnjo zunajceličnega matriksa pospeši proliferacijo tumorskih celic in s tem pospeši metastaziranje [57].

Katepsin L je povezan z mnogimi fiziološkimi in patološkimi procesi, kot so proteoliza v lizosomih, spermatogeneza, predstavljanje antigenov, invazija in metastaziranje tumorjev ter sklepnna obolenja. Je prekomerno izražen v večini tumorjev, kar povzroči pretvorbo tumorskih celic, ki ne metastazirajo, v zelo

invazivne celice [58, 59]. Študije na miših z izbitim genom za katepsin L so pokazale, da te miši sicer preživijo, vendar kažejo nenormalno morfologijo kože in večkrat izgubijo dlako, kar nakazuje pomembno vlogo tega proteina pri obnovi lasnih mešičkov [60, 61]. Prav tako so se kasneje v razvoju pokazale spremembe v srčnih mišicah, kar je vodilo do nepravilnega delovanja srca in povečane smrtnosti [62]. Katepsin L ima pomembno vlogo tudi pri razgradnji invariantne verige MHC razreda II [63].

O katepsinu O je sicer znanega malo, čeprav je prisoten v mnogih človeških tkivih in se zato predvideva, da je soudeležan pri znotrajcelični nespecifični razgradnji proteinov v lizosomih, čeprav so njegovo prekomerno izražanje opazili tudi pri nekaterih oblikah tumorjev [64].

Zaporedje katepsina V je zelo podobno zaporedju katepsina L (79-odstotna enakost zrele oblike in 77-odstotna enakost preoblike proteina). Študije so pokazale, da ima katepsin V v pozitivni selekciji T limfocitov vlogo, ki jo pri miših opravlja katepsin L [63]. Prav tako je sposoben razgradnje invariantne verige MHC razreda II [65]. Povezali pa so ga z tudi določenimi oblikami raka na črevesju in dojkah [66, 67].

Tudi o katepsinu W je znanega bolj malo. Visoka raven izražene mRNA v krvnih celicah, vranici, limfnih vozlih ter kostnem mozgu in specifično izražanje v limfocitih T in naravnih celicah ubijalkah, kažeta na verjetno vlogo katepsina W v diferenciaciji in pri citotoksičnosti teh celic [68, 69].

Katepsin X se izraža v večini v imunskih celicah, kot so monociti, makrofagi in dendritske celice. Prekomerno izražanje proteina so opazili pri nekaterih oblikah tumorjev [70]. Določene študije pa nakazujejo možnost, da sodeluje tudi pri nastanku Alzheimerjevega obolenja [71].

### 1.2.2 Inhibitorji lizosomskih cisteinskih proteaz

Kratek pregled fizioloških in patoloških procesov, v katerih sodelujejo lizosomske cisteinske proteaze nam pove, da je proteoliza zelo pomemben proces, ki mora biti natančno nadzorovan in uravnavan. Eno izmed oblik nadzora proteolizne aktivnosti lizosomskih cisteinskih proteaz predstavljajo njihovi endogeni inhibitorji. Večina endogenih inhibitorjev je kompetitivnih. Osnova njihovega delovanja je vezava v aktivno mesto proteaz, s čimer je onemogočena vezava substrata. Organizem pred neželenim delovanjem proteaz v nevtralnem okolju izven lizosomov poleg nespecifičnega splošnega inhibitorja iz krvne plazme,  $\alpha_2$ -makroglobulina [72], ščitijo tudi inhibitorji iz naddružine cistatinov. Razdelimo jih v štiri družine. Člani treh družin, stefini, cistatini in kininogeni, so inhibitorni, medtem ko člani četrte družine predstavljajo neinhitorne homologe cistatinov, kot so fetuini in s histidinom bogati glikoproteini. Člani vseh štirih družin so si strukturno podobni. Sestavljeni so iz ene  $\alpha$ -vijačnice in antiparalelne pet-pasovne  $\beta$ -ploskve. S cisteinskimi proteazami dokaj nespecifično medsebojno delujejo z N-terminalnim delom molekule in dvema zavojema na eni strani  $\beta$ -ploskve [73, 74].

V družino stefinov spadajo znotrajcelični, neglikozilirani, enoverižni proteini brez disulfidnih mostov, ki so sestavljeni iz približno 100 aminokislinskih preostankov. Družino cistatinov sestavljajo proteini, ki vsebujejo približno 115 aminokislinskih preostankov in se od stefinov razlikujejo po dodatnem signalnem zaporedju za izločanje iz celice. So zunajcelični, neglikozilirani, enoverižni proteini, ki vsebujejo dve disulfidni vezi. Družino kininogenov predstavljajo večfunkcijski glikoproteini iz sesalske krvne plazme, ki so sestavljeni iz treh cistatinom podobnih domen, od katerih ima prva sposobnost vezave kalcijevih ionov, drugi dve pa lahko inhibirata cisteinske proteaze [75].

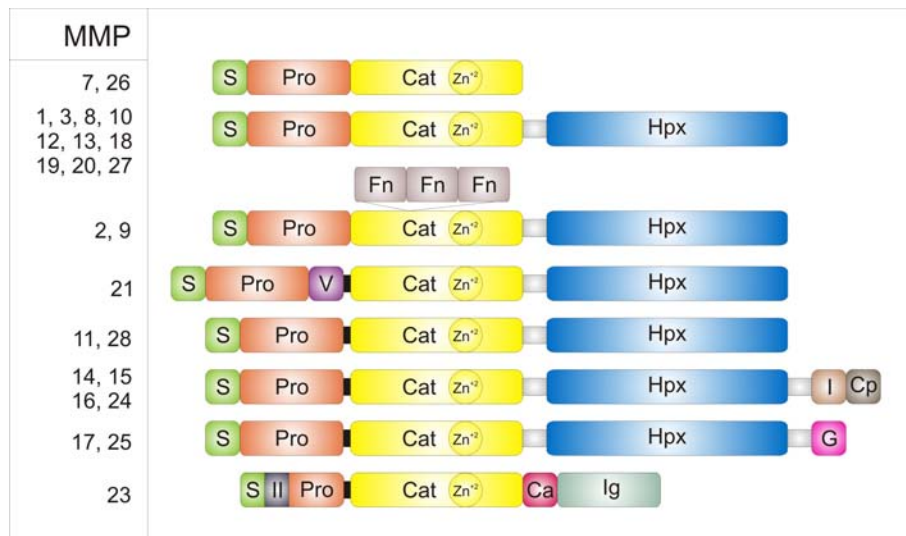
Poznamo pa tudi veliko bolj selektivne inhibitorje lizosomskih cisteinskih proteaz, imenovane tiropini, ki imajo aminokislinsko zaporedje podobno tiroglobulinski domeni tipa I [76]. Njihov predstavnik pri sesalcih, invariantna veriga MHC II, je sestavni del MHC razreda II. Fragment p41 invariantne verige je znan kot specifični inhibitor katepsinov L in H [77, 78]. Lizosomske cisteinske proteaze pa v nekaterih primerih inhibirajo tudi serpini, ki so inhibitorji serinskih proteaz [79].

## 1.3 Metaloproteaze zunajceličnega matriksa

Zunajcelični matriks je biološko aktivno vezno tkivo, ki zapolnjuje prostor med celicami. Sestavljen je iz mešanice makromolekul, ki imajo lahko strukturno vlogo, ali pa je njihova vloga zelo kompleksna in ključno vplivajo na celično fiziologijo organizma. Različne vrste celic tvorijo različne tipe zunajceličnega matriksa, za vse pa velja, da gre za visoko organizirane strukture, ki so nenehno podvržene preoblikovanju. Za razgradnjo in preoblikovanje tega matriksa so odgovorne številne proteaze, med katerimi imajo ključno vlogo metaloproteaze zunajceličnega matriksa (MMP; *angl. matrix metalloproteinase*) [80].

V človeškem genomu je prisotnih 24 genov za MMP, vendar poznamo le 23 proteinov, saj MMP-23 kodirata dva identična gena na kromosomu. Dolgo je veljalo, da MMP sodelujejo samo pri razgradnji zunajceličnega matriksa, vendar so nedavne študije pokazale, da imajo pomembno vlogo tudi pri regulaciji biološke aktivnosti citokinov, kemokinov, adhezijskih molekul na celični površini in proteinov, ki vežejo rastne faktorje, lahko pa tudi inaktivirajo proteazne inhibitorje [80, 81]. Prav tako imajo MMP-ji ključno vlogo pri vnetnih procesih, imunskem odzivu in obnovi tkiv [82]. MMP-je so povezali tudi s številnimi obolenji, ki lahko prizadanejo kardiovaskularni [83, 84] in respiratorni sistem [85, 86] kot tudi centralno-živčni sistem [87] in različna sklepna obolenja [88]. Številne študije so pokazale, da MMP-ji, predvsem preko razgradnje zunajceličnega matriksa, ključno vplivajo na rast tumorjev, invazivnost in metastaziranje le-teh. Povečana raven izražanja določenih MMP-jev je bila pokazana praktično pri vseh malignih obolenjih pri človeku [89-92].

Metaloproteaze zunajceličnega matriksa so uvrščene v klan MA, družino M10 ter v poddružino matriksinov (M10A), ki v aktivnem mestu nimajo disulfidnih mostičkov, temveč za aktivnost potrebujejo cinkov ion. Za dodatno stabilnost potrebujejo še dodaten cinkov ion ter en ali dva kalcijeva iona. Najdemo jih pri večini sesalcev, prisotne pa so tudi pri nekaterih rastlinah ter virusih in najmanj dveh bakterijah (*Listeria innocua* in *Streptococcus pneumoniae*). Gen za MMP ponavadi kodira signalni peptid, propeptid s približno 80 aminokislinskimi preostanki, katalitska domena med 160 - 170 aminokislinskimi preostanki in hemopeksinsko domeno, ki predstavlja približno 200 aminokislinskih preostankov, in jo najdemo pri večini proteinov iz te skupine. Katalitska domena vsebuje specifičen motiv za vezavno mesto cinkovega iona, HEXXHXXGXXH, kjer se lahko trije dodatni histidini vežejo na cinkov ion v katalitskem mestu. K dodatni specifičnosti te poddružine proteaz pripomore še cisteinsko stikalo, ki ga predstavlja motiv PRCGXPD in poskrbi za koordinacijo cinkovega iona in cisteina v aktivnem mestu ter tako prepreči molekuli vode, ki je potrebna za katalizo, da bi se vezala na cinkov ion. Prepoznavno zaporedje za furin, med propeptidom in katalitsko domeno, omogoči aktivacijo določenih skupin MMP-jev s pomočjo encimov, ki pretvarjajo ta protein v Golgijevem aparatu [81]. Proteolizna aktivnost te družine proteaz je regulirana na nivoju transkripcije, z aktivacijo zimogenov in z endogenimi inhibitorji, znanimi tudi kot TIMP inhibitorji (*angl. tissue inhibitors of metalloproteinases*). Na podlagi njihove substratne specifičnosti, podobnosti v aminokislinskem zaporedju in organiziranosti domen lahko MMP-je razdelimo v 6 skupin. Njihova razdelitev je prikazana v tabeli 4, zgradba pa na sliki 4.



Slika 4: Shematski prikaz zgradbe metaloproteaz zunajceličnega matriksa. (S – signalni peptid; Pro – domena propeptida; Cat – katalitska domena; Zn<sup>2+</sup> - cinkov ion v aktivnem mestu; Hpx – hemopeksinska domena; Fn – fibronektinska domena; V – vitronektinski vključek; I – transmembranska domena tipa I; II – transmembranska domena tipa II; G – GPI sidro; Cp – citoplazemska domena; Ca – regija cisteinske mreže; Ig – IgG domena; cepitveno mesto furina pa je prikazano v črni barvi med domeno propeptida in katalitsko domeno).

Tabela 4: *Metaloproteaze zunajceličnega matriksa in njihovi znani substrati* (povzeto po [81, 93]). V tabeli je prikazanih vseh 6 skupin MMP-jev in njihovi člani, njihova trivialna imena in skupni znani substrati. Posamezne proteaze ne delujejo le na skupne substrate, ki so prikazani v tabeli, temveč imajo tudi vsaka svoje tarče, ki so specifične za posamezen encim.

ENCIM	MMP	ZNANI SUBSTRATI
<i>Kolagenaze</i>		
kolagenaza 1	MMP-1	Kolageni tipa I, II in III (cepitev v značilna fragmenta $\frac{1}{4}$ in $\frac{3}{4}$ ), agrekan, želatina, fibronektin, vitronektin, laminin, $\alpha_2$ -makroglobulin, C1q
kolagenaza 2	MMP-8	
kolagenaza 3	MMP-13	
kolagenaza 4 ( <i>Xenopus</i> )	MMP-18	
<i>Želatinaze</i>		
želatinaza A	MMP-2	Različni tipi kolagenov, želatina, vitronektin, elastin, laminin, agrekan, mielin bazični protein, $\alpha_2$ -makroglobulin, IL-1 $\beta$ , proTNF- $\alpha$
želatinaza B	MMP-9	
<i>Stromelizini</i>		
stromelizin 1	MMP-3	Različni tipi kolagenov, želatina, agrekan, elastin, fibronektin, proMMP-1, proMMP-3, proMMP-8
stromelizin 2	MMP-10	
<i>Matrilizini</i>		
matrilizin 1	MMP-7	Kolagen tipa IV, želatina, fibronektin, vitronektin, proMMP-9, $\alpha_2$ -makroglobulin
matrilizin 2	MMP-26	
stromelizin 3	MMP-11	
<i>Membranski tip-MMP</i>		
<i>(A) Transmembranski tip</i>		
MT1-MMP	MMP-14	Različni tipi kolagenov, fibronektin, želatina, laminin, $\alpha_2$ -makroglobulin, proMMP-2, tkivna transglutaminaza
MT2-MMP	MMP-15	
MT3-MMP	MMP-16	
MT5-MMP	MMP-24	
<i>(B) GPI sidrni tip</i>		
MT4-MMP	MMP-17	Želatina, fibrinogen, fibrin, proMMP-2
MT6-MMP	MMP-25	
<i>Druge</i>		
makrofagna elastaza	MMP-12	Različni tipi kolagenov, želatina, laminin, agrekan, fibronektin, fibrinogen, entaktin
-	MMP-19	
enamelizin	MMP-20	Amelogenin, agrekan, COMP
-	MMP-21	Želatina, kazein
CA-MMP	MMP-23	Želatina
-	MMP-27	Želatina, kazein
epilizin	MMP-28	Kazein

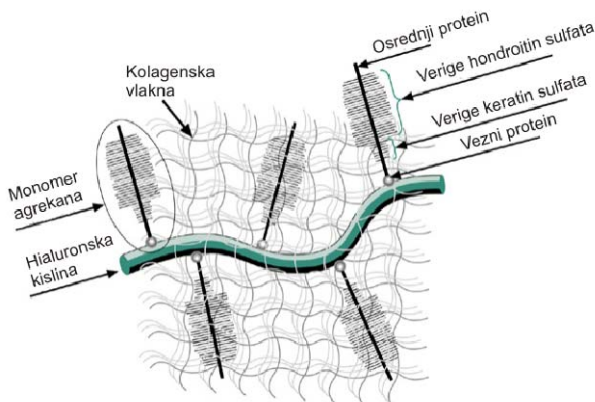
## 1.4 Sklepna obolenja in proteaze

Proteaze, kot encimi, so tako udeležene v ključnih stopnjah homeostaze sklepnega hrustanca in kosti. Pomembno vlogo imajo pri razvoju številnih sklepnih obolenj, ki jih ponavadi delimo v dve skupini, vnetna in degenerativna, ter med katerimi sta najpogostejši obliki revmatoidni artritis (RA) in osteoartritoza (OA). Proteaze tako imajo pomembno vlogo pri posredovanju signalov v sklepnih obolenjih in so lahko ključni označevalci za določitev stopnje obolenja kot tudi možne tarčne molekule za nove terapevtske učinkovine, tako pri zdravljenju kot tudi lajšanju simptomov.

### 1.4.1 Zgradba in funkcija sklepnega hrustanca

V človeškem telesu najdemo hrustančna tkiva na številnih mestih, kjer opravljajo različne funkcije in so se temu primerno specifično razvila. Ločimo štiri tipe hrustanca, ki nastanejo z diferenciacijo mezenhimskih celic v zarodku: hialini, elastični, vezivni in endohondralni (vmesna stopnja v procesu zakostenevanja). Med seboj se razlikujejo po sestavi in vsebnosti vezivnih ali elastičnih vlaken v medceličnini [94].

Sklepni hrustanec (slika 5) je predstavnik hialinega tipa in je, kljub na prvi pogled enostavni zgradbi, kompleksno organizirano tkivo. Specifičnost hrustančnega tkiva je odsotnost krvnega obtoka, limfne drenaže ter živčevja. Sklepni hrustanec pridobiva večino hranil s pomočjo difuzije iz sinovijske tekočine. Je trdo elastično tkivo z izjemnimi biološkimi in mehanskimi lastnostmi, ki jih omogoča sama struktura tkiva. Osnovni gradniki sklepnega hrustanca so hondrociti, ki jih obdaja hrustančna medceličnina oziroma matriks. Hondrociti predstavljajo le 5 – 10 % celotnega volumna hrustančnega tkiva, v medceličnini pa ležijo tako, da med njimi ni neposrednega stika. Dodatno pa sklepni hrustanec sestavlja tudi mreža kolagenskih vlaken, ki tvorijo gosto in čvrsto vezivno ogrodje, v katero so vloženi hondrociti, ki proizvajajo sestavine zunajceličnega matriksa. Hondrociti tvorijo kolagen in medceličnino iz proteoglikanov. Proteoglikani imajo visoko afiniteto do vode in s tem optimalno napnejo kolagensko mrežo, kar sklepnemu hrustancu omogoči ustrezno napetost in elastično trdoto. Glavni predstavnik skupine proteoglikanov v človeškem sklepnem hrustancu je agrekan [95-97].



Slika 5: Shematski prikaz sestave sklepnega hrustanca.

Agrekan je makromolekula, sestavljena iz osrednje proteinske molekule, na katero se vežejo različni glikozaminoglikani (GAG-i). Tako se nanjo veže več kot sto verig hondroitin sulfata in približno trideset verig keratin sulfata. Preko molekul hialuronske kisline in vezivnih proteinov se nato nekovalentno poveže v velike proteoglikanske skupke, ki skupaj še z ostalimi proteoglikani, glikozaminoglikani in glikoproteini zapolnijo kolagensko ogrodje. Številne negativno nabite skupine proteoglikanov določajo hidrofilno naravo agrekana, ki pomembno vpliva na afiniteto vode v kolagenskih vlaknih [98, 99].

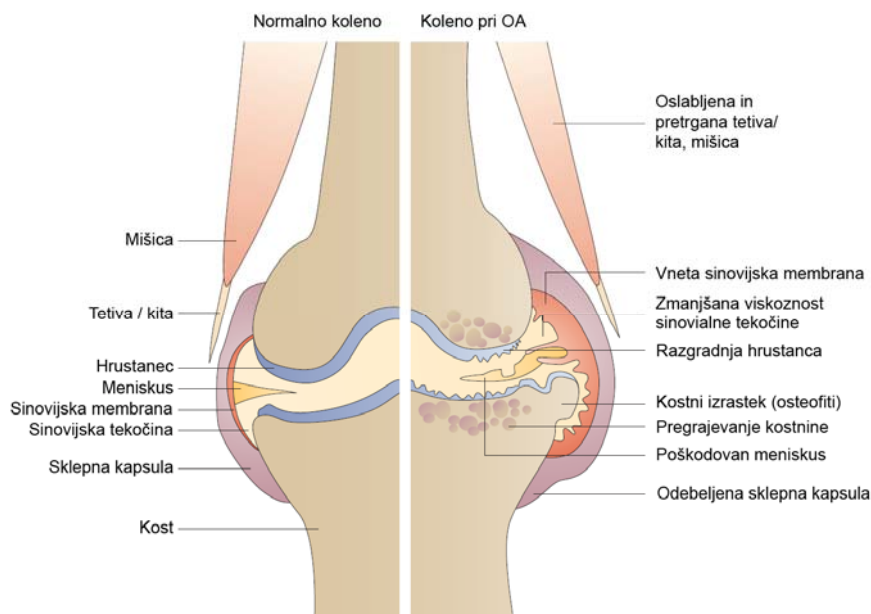
Kolagen je najbolj zastopan protein v hrustančnem tkivu in predstavlja kar 10 – 20 % celotnega tkiva. V zdravem sklepnem hrustancu je najbolj zastopan kolagen tipa II, ki lahko tvori fibrile, dolge nekaj mikrometrov. Prav tako pa so v sklepnem hrustancu pristani še nekateri drugi kolageni, predvsem tipa VI, IX, X in XI. Različni tipi hrustančnega tkiva vsebujejo kolagene v različnih razmerjih. Vsak tretji aminokislinski preostanek v strukturi kolagena je glicin. Nekaj 100 ponovitev tripleta aminokislinskih

preostankov Gly-Pro-X ali Gly-X-Hyp predstavlja značilno aminokislinsko zaporedje. Kolagenska vlakna so tako sestavljena iz mikrofibrilarnih podenot, ki nastanejo s polimerizacijo osnovnih gradbenih enot kolagena – molekula tropokolagena. Vsaka molekula tropokolagena je sestavljena iz treh polipeptidnih verig, ki so vsaka posebej ovite okrog svoje osi, vse tri pa se ovijajo druga okrog druge in tvorijo desno usmerjeno trojno vijačnico. Med seboj so povezane z vodikovimi vezmi in hidrofobnimi interakcijami [100].

## 1.4.2 Osteoartrza

Osteoartrza (OA) je najpogostejša oblika sklepnih obolenj v razvitem svetu. Prizadane več kot 70 % odrasle populacije starejše od 65 let. Pri 80 % bolnikov, obolenih s to boleznijo, je gibanje omejeno, od tega jih 25 % ne more opravljati vsakodnevnih opravil [101]. OA običajno opisujejo kot počasno, degenerativno obolenje in se zato loči od ostalih sklepnih obolenj. Zanj so značilni številni dejavniki kot so starost, sklepne poškodbe, genetsko nagnjenje ter hormonski in mehanski vplivi. Lahko prizadane vse sklepe v telesu, vendar so najpogosteje oboleni roke, kolena in kolki. Dolgo časa je veljalo prepričanje, da gre pri OA samo za obolenje sklepnega hrustanca, vendar so dolgoletne raziskave na tem področju pokazale, da gre za obolenje celotnega sklepa, saj so poškodovani tudi kost, sklepna ovojnica, vezi in sinovijska membrana. Prav tako pri OA ne gre za klasičen vnetni odziv, za katerega je značilna infiltracija nevtrofilcev in makrofagov v sklepna tkiva, temveč so pri bolnikih opazili občasna sklepna vnetja (sinovitis - vnetje sinovijske membrane), pokazali pa so tudi povečano koncentracijo proinflammatoryh citokinov v sinovijski tekočini [102-104].

OA je obolenje, kjer se obrabi ali popolnoma izgine sklepni hrustanec. Poškodbe sklepnega hrustanca so najprej opažene na sklepni površini. Začetne spremembe so povezane tudi s spremembo zunajceličnega matriksa, ki se kaže predvsem v izgubi proteoglikanov in cepitvi kolagena tipa II. Posledično se poveča količina vode v sklepu, kar dodatno oslabi in poškoduje strukturo hrustanca ter privede do napredovanja poškodbe. Ta stopnja sproži tudi pospešeno proliferacijo hondrocitov in njihovo dediferenciacijo. Organizem poskuša preprečiti poškodbe v hrustancu s povečano proliferacijo hondrocitov, vendar je le-ta neuspešna, saj bolezen kljub temu napreduje. Spremembe v ravnovesju anabolnih in katabolnih procesov se pri tem prevesijo v prid katabolnih, ki so odgovorni za razgradnjo hrustančnega zunajceličnega matriksa. Poveča se sproščanje katabolnih citokinov, kot sta interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), ki vplivata na povišano raven izražanja genov za različne citokine, metaloproteaze zunajceličnega matriksa ter še nekatere druge proteaze v hondrocitih in celicah sinovijske membrane [103, 105].

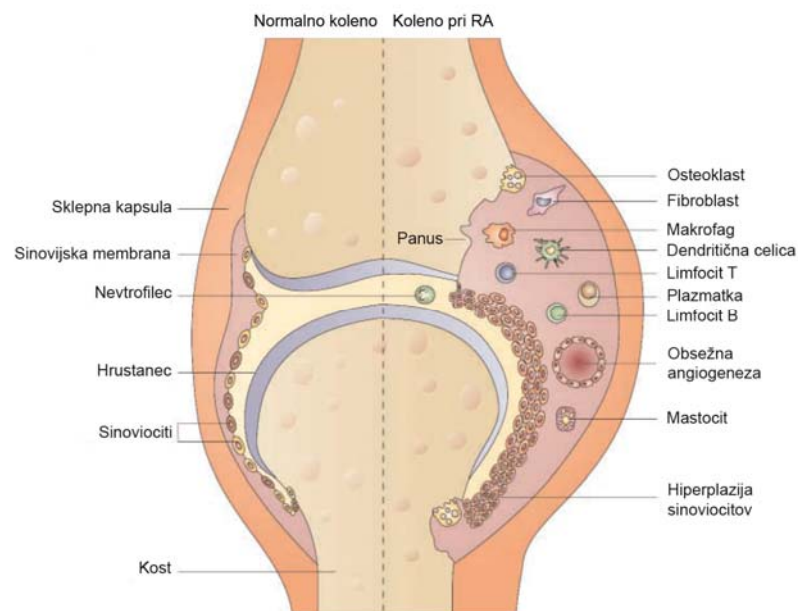


Slika 6: Shematski prikaz značilnosti zdravega in osteoartritičnega sklepa (povzeto po [106]).

### 1.4.3 Revmatoidni artritis

Revmatoidni artritis (RA) je praviloma avtoimunsko obolenje, povezano s kroničnim vnetjem, ki simetrično prizadane sklepe kot tudi ob sklepne dele, in katerega natančen vzrok še ni znan. Je najpogostejša oblika artritisa in drugo najpogostejše obolenje sklepov. Razširjen je po vsem svetu in prizadane vse rase in etnične skupine. Povezan je s hiperproliferacijo celic iz sinovijske membrane, ki se kaže v obliki sklepnega vnetja (sinovitis) in posledično privede do trajne poškodbe sklepov. Prizadane približno 1 % odrasle populacije med 25. in 50. letom starosti in bistveno vpliva na kvaliteto njihovega življenja. Ženske obolevajo trikrat pogosteje kot moški, kar se opazi zlasti v rodnem obdobju. Eden pomembnejših genetskih dejavnikov v etiologiji RA je tudi prisotnost alela HLA-DR4 na poglavitem histokompatibilnostnem kompleksu razreda II (MHC razred II). Ta alel je prisoten pri 70 % pacientov obolenih z RA, medtem ko je prisotnost pri splošni populaciji samo 28-odstotna [107].

Simptomi, ki se pojavijo na obolelih sklepih, se v začetni fazi bolezni kažejo predvsem kot oteklina, ki je posledica vnetnih sprememb sinovijske membrane zaradi povečane infiltracije limfocitov, plazmatk in makrofagov. Sinovijska membrana se spremeni v granulacijsko tkivo – panus, ki se vriva med hrustanec in kost ter povzroča spremembe sklepnega hrustanca, robne erozije kosti in zožitev sklepnega prostora (slika 7). V začetni fazi gre predvsem za izgubo oziroma razgradnjo agregata na površini sklepnega hrustanca, ki predstavlja ključni korak v razvoju RA, in kasneje napreduje tudi v globlje dele obolelega sklepa. Šele nato pride do razgradnje kolagenskih vlaken, ki privedejo do poškodbe sklepa. V začetku je lahko prizadet samo en sklep, običajno pa gre za sistemsko obolenost večjega števila sklepov. Pri napredovanju bolezni so ključne interakcije med tremi tipi v sinovialni membrani pristotnih celic: makrofagi, fibroblastom podobne celice (fibroblastni sinoviociti) ter limfociti T [107, 108]. Klinične znake spremlja povečano izločanje proinflammatoryh citokinov, kot so IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15 in TNF- $\alpha$ , ki predstavljajo ključne elemente za razvoj kroničnega vnetja, ter zmanjšano izločanje protivnetnih citokinov, kot so IL-4, IL-10, IL-1ra in TGF $\beta$ 1. Vse celice v sinovijski membrani prispevajo k povečanemu izločanju proinflammatoryh citokinov, vendar so makrofagi in limfociti prevladujoč vir IL-1 $\beta$ , IL-15 in TNF- $\alpha$ , fibroblastni sinoviociti pa vir IL-6. Povišana koncentracija citokinov nadalje omogoči prihod novih imunskih celic, predstavljanje antigenih peptidov v makrofagih in dendritičnih celicah, izdelovanje protiteles in povečano izločanje proteaz, predvsem metaloproteaz zunajceličnega matriksa in nekaterih lizosomskih cisteinskih proteaz. Prosti kisikovi radikali zmanjšujejo viskoznost sinovijske tekočine preko depolimerizacije hialuronske kisline in tako poškodujejo sklepnih hrustanec in proteoglikane. V kasnejših stopnjah RA se sinovijski fibroblasti preobrazijo in izločajo IL-6 ter proteaze neodvisno od vnetnih signalov [107, 109]. Pomembno vlogo proinflammatoryh citokina TNF- $\alpha$  pri RA so pokazali z uspešno uporabo različnih zdravil proti TNF- $\alpha$  [108].



Slika 7: Shematski prikaz značilnosti zdravega in revmatičnega sklepa (povzeto po [108]).

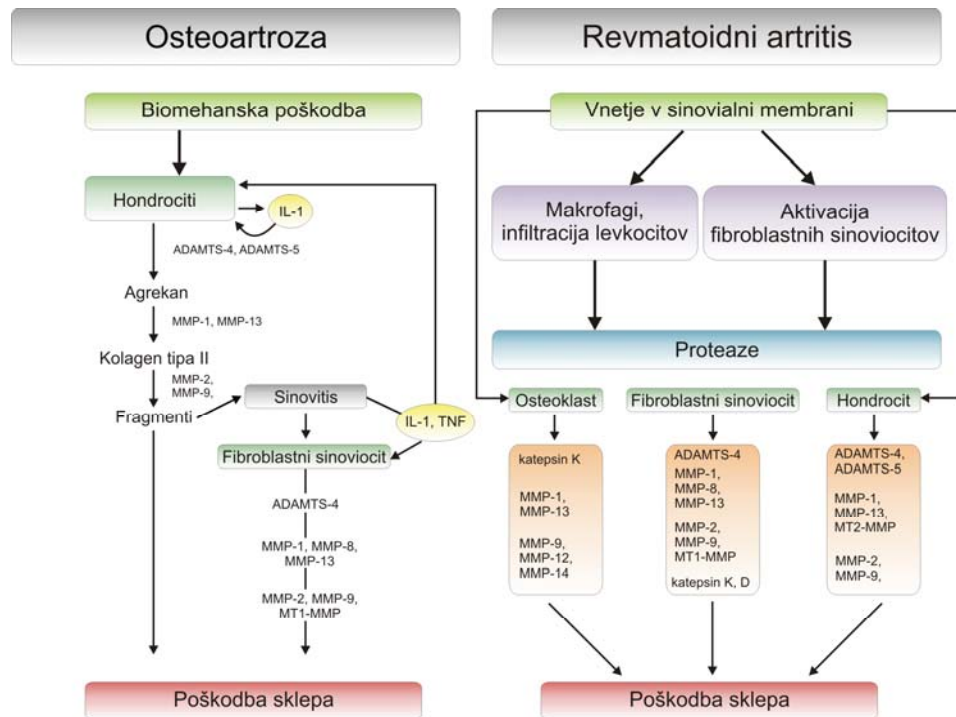
#### 1.4.4 Vloga proteaz v sklepnih obolenjih

Pri različnih sklepnih obolenjih se lahko lizosomske cisteinske proteaze in metaloproteaze zunajceličnega matriksa, ki sodelujejo pri razgradnji hrustanca in drugih delov sklepa, neprestano izražajo in/ali sprožajo v različnih vrstah celic, kot so hondrociti, osteoklasti, makrofagi, fibroblastni sinoviociti in levkociti [110].

Sprva so poglavitno vlogo v različnih sklepnih obolenjih pripisovali nevtralnimi metaloproteazam, predvsem kolagenazam MMP-1, MMP-8 in MMP-13 ter agrekanazam MMP-3, MT1-MMP, ADAMTS-4 in ADAMTS-5 [110]. Vendar so raziskave v zadnjem desetletju pokazale, da so tudi cisteinski katepsini, kot kisle proteaze, vključeni v proces razgradnje sklepnega hrustanca [111]. Študije so pokazale, da ima lokalno mikrookolje med hrustancem in kostjo pri bolnikih z OA kislo območje pH in je tako ugodnejše za delovanje cisteinskih katepsinov kot pa metaloproteaz [112]. Podobno velja tudi za stike s panusom in sklepnim hrustancem pri bolnikih z RA [113]. V fizioloških pogojih v telesu je aktivnost posameznih proteaz regulirana z njihovimi endogenimi inhibitorji. Pri različnih sklepnih obolenjih je inhibitorna aktivnost zmanjšana, zaradi zmanjšane ravni izražanja tako cistatinov, inhibitorjev cisteinskih katepsinov, kot tudi TIMP-ov, inhibitorjev MMP-jev [114, 115].

Razgradnja sklepnega hrustanca pri bolnikih z RA in OA je med drugim povezana z razgradnjo kolagenskih vlaken in s kolagenazo aktivnostjo določenih metaloproteaz zunajceličnega matriksa. Te kolagenaze cepijo fibrilarne strukture kolagenov tipa I, II in III na točno določenem mestu med Gly<sup>775</sup>-Leu/Ile<sup>776</sup> znotraj  $\alpha$ -verige kolagenske vijačnice, približno  $\frac{1}{4}$  dolžine od N-konca vsake verige in tako tvorijo značilne  $\frac{1}{4}$  in  $\frac{3}{4}$  kolagenske fragmente [116]. Med posameznimi metaloproteazami zunajceličnega matriksa takšno aktivnost kažejo tudi proteaze iz skupine kolagenaz (MMP-1, MMP-8 in MMP-13) ter MMP-2 in MT1-MMP [117]. Med seboj se ločijo predvsem po specifičnosti cepitve posameznih vrst kolagenskih vlaken. Kolagen tipa III je odličen substrat za MMP-1, kolagen tipa I za MMP-8, MMP-13 pa ima največjo aktivnost proti kolagenu tipa II [118]. Trojno vijačnico kolagena pa lahko cepi tudi cisteinska proteaza katepsin K, ki prav tako tvori podobne  $\frac{1}{4}$  in  $\frac{3}{4}$  fragmente (ne cepi na isrem mestu kot kolagenaze) in tako predstavlja svojevrstno izjemo med cisteinskimi katepsini [37]. Povečano izražanje katepsina K opazimo v hondrocitih, pridobljenih z mišjih modelov OA, ter v sinovialni membrani bolnikov obolenih z RA [35, 36]. Katepsin K optimalno deluje v kislem območju pH, hondroitin sulfat pa ga v nevtralnem območju pH stabilizira in tako omogoči njegovo kopičenje ob sklepnem hrustancu [119]. Prav tako pa so lahko tudi druge proteaze udeležene pri razgradnji kolagenskih vlaken, predvsem v nevijačnem območju fibrilarnih kolagenov. Te cepitve destabilizirajo strukturo kolagenov tako, da naredijo posamezne vijačnice bolj dovzetne za razgradnjo s kolagenazami. V to skupino proteaz tako uvrščamo MMP-3, serinsko proteazo katepsin G ter cisteinski proteazi katepsina B in L [117, 120]. Pomembno tarčo, za razgradnjo z različnimi proteazami v sklepnem hrustancu, predstavlja tudi agrekan, ki ga v večini cepijo že zgoraj omenjene agrekanaze, ki imajo predvsem pomembno vlogo pri razvoju OA. Miši z izbitim genom za ADAMTS-5 ne razvijejo OA [121]. Dodatno pa lahko agrekan in še nekatere druge manjše proteoglikane razgrajujejo tudi cisteinski katepsini B, L, K in S [35, 122]. Poleg tega pa so pri OA opazili povečano izražanje MMP-2 in MMP-9, kar naj bi vplivalo na povečano izražanje IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$  [115].

Pri RA je panus udeležen pri eroziji sklepnega hrustanca ter kosti in vsebuje makrofage in fibroblastne sinoviocite, ki so aktivno udeleženi pri razgradnji sklepa. Pokazano je bilo, da imajo te celice povečano raven izražanja MMP-1, MMP-3, MMP-13, MMP-14 in MMP-15 kot tudi katepsina K, katerega povečano izražanje je bilo opaženo tudi pri OA. V sinovijski membrani bolnikov z RA so zaznali največje povečanje izražanja gena za MMP-3, kar nakazuje na pomembno vlogo tega proteina pri napredovanju obolenja, predvsem preko aktivacije zimogenskih oblik drugih MMP-jev [117]. Podobno kot MMP-3, tudi MMP-10 aktivira druge prokolagenaze in so jo odkrili v sinovijski tekočini bolnikov z RA in OA [123]. Sinovijska membrana pri teh bolnikih vsebuje povišano raven cisteinskih katepsinov, predvsem B, K, L in S. Raven izražanja za katepsin K je višja pri bolnikih z RA kot z OA, medtem ko se nivo izražanja katepsina S med posameznimi skupinami ne razlikuje [36]. V primeru katepsina B se je pokazalo, da se poveča njegovo izražanje ob stimulaciji fibroblastnih sinoviocitov z IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$  [124]. Poleg neselektivne razgradnje proteinov sklepnega hrustanca pa katepsin S sodeluje tudi pri cepitvi invariantne verige Ii kompleksov MHC razreda II v antigen predstavitevni celicah (makrofagi, dendritične celice), ki se tvorijo v panusu in ima tako pomembno vlogo pri vnetnem odzivu [125].

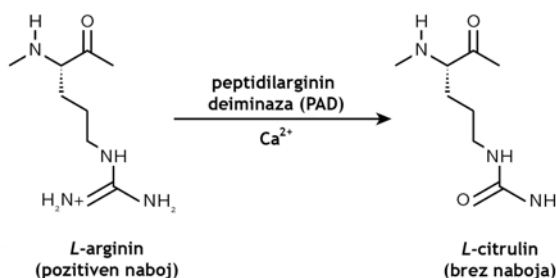


Slika 8: *Proteaze in sklepna obolenja* (povzeto po [126]). Na shemi so prikazane proteaze, ki sodelujejo pri razvoju osteoartraze in revmatoidnega artritisa. (ADAM – disintegrinu in metaloproteazi podobna proteaza; ADAMTS – ADAM-trombospondin; IL-1 – interlevkin-1; MMP – metaloproteaza zunajceličnega matriksa; MT – membranski tip; TNF – dejavnik tumorske nekroze)

## 1.5 Citrulinacija

Citrulinacija ali deiminacija je posttranslacijska modifikacija proteinov. Predstavlja enega izmed ključnih korakov v nastanku in napredovanju RA. Pri tej modifikaciji se pozitivno nabit aminokislinski preostanek *L*-arginin pretvori v nevtralni *L*-citrulin, pri tem pa se zmanjša molekulska masa proteina za 1 Da za vsak spremenjen aminokislinski preostanek (slika 9) [127].

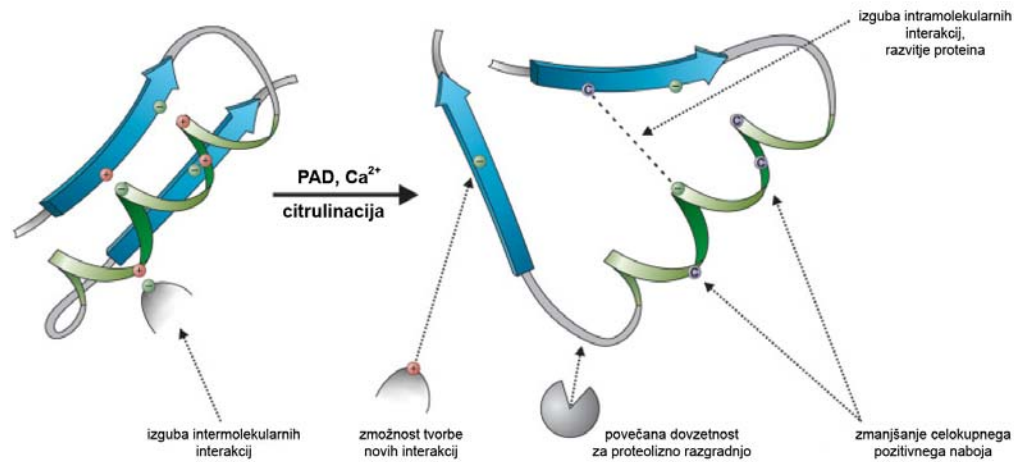
Pri evkariontih citrulinacijo katalizira družina od kalcija odvisnih peptidilarginin deiminaz (PAD; EC 3.5.3.15). Aktivnost encimov PAD naj bi bila odvisna tudi od vrednosti pH. Do sedaj je bilo identificiranih pet izo-oblik encimov, od katerih sta pri razvoju RA pomembna predvsem PAD2, ki se nahaja v monocitih, makrofagih in fibroblastnih sinoviocitih, ter PAD4, ki se večinoma izraža v kostnem mozgu in belih krvničkah, zasledili pa so ga tudi v nevtrofilcih in eozinofilcih. V fizioloških pogojih se encimi PAD nahajajo znotrajcelično, povečini v citosolu, razen PAD4, ki se lahko nahaja tudi v jedru. Pri RA v obolelem sklepu prihaja do množičnega umiranja celic, predvsem zaradi povečanega oksidativnega stresa, pri čemer se lahko encimi PAD sprostijo iz celic in se posledično aktivirajo ob prisotnosti višje zunajcelične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  ionov ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ; medtem ko je normalna koncentracija ionov v citosolu  $\sim 200 \text{ nM}$ ) ter tako citrulinirajo zunajcelične proteine [128, 129].



Slika 9: Encimska pretvorba aminokislinskega preostanka arginina v citrulin s peptidilarginin deiminazo (PAD) ob prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  ionov.

Prav takšna modifikacija telesu lastnih proteinov lahko povzroči nastanek novih epitopov, za katere ne obstaja imunska toleranca, in tako pri posamezniku izzove avtoimunski odziv, hkrati pa proteini postanejo bolj dovzetni za proteolizno razgradnjo [130]. Citrulinirani proteini so vpleteni v posamezne fiziološke procese in nekateri med njimi nastanejo v končni stopnji življenjskega cikla posameznih celic. PAD2 in PAD4 lahko katalizirata citrulinacijo filagrina, K1 keratina in trihohialina med končno celično diferenciacijo epidermalnih celic, ki tako izgubijo urejeno strukturo. Vimentin in histoni se modificirajo med programirano celično smrtjo makrofagov [131-133]. Citruliniran fibrin je povezan z vnetnimi spremembami v sinoviji bolnikov obolelih z RA [134]. Citrulinacija mielin bazičnega proteina pri multipli sklerozi pa vodi do šibkejših interakcij tega proteina s fosfolipidi, kar vpliva na prenos živčnih impulzov v Schwannovih celicah in oligodendritih [135]. PAD4 ima pomembno vlogo tudi v znotrajjedrni citrulinaciji histonov in pri regulaciji izražanja genov. Tako nekateri raziskovalci citrulinacijo, preko modifikacije histonov, povezujejo še z nekaterimi drugimi posttranslacijskimi modifikacijami, kot so metilacija in acetilacija, in predvidevajo, da lahko vse skupaj uravnava mehanizme, ki so odgovorni za izražanje posameznih genov [136].

S citrulinacijo se spremeni struktura kot tudi funkcija tarčnega proteina (slika 10). S spremembo 5 % argininskih preostankov se pričinja rušiti terciarna struktura trihohialina in filagrina, medtem ko pa sprememba 10 % argininov povzroči izgubo urejene strukture, ki posledično vodi do denaturacije proteina [137]. Z izgubo celokupnega pozitivnega naboja proteina se prekinejo intramolekularne interakcije, ki povzročijo, da se protein razvije. Spremeni pa se tudi sekundarna struktura. Razvitje proteina nadalje vpliva tudi na morebitno izgubo intermolekularnih interakcij, hkrati pa spremenjena struktura omogoči tvorbo novih interakcij. Manj urejena struktura citruliniranega proteina predstavlja tudi boljše tarčo za razgradnjo s proteazami, pri čemer se predvideva, da naj bi bili citrulinirani proteini hitreje razgrajeni kot pa njihovi necitrulinirani analogi [129].



Slika 10: Možni vplivi citrulinacije (povzeto po [129]).

### 1.5.1 Protitelesa proti citruliniranim peptidom

Diagnoza RA temelji predvsem na vidnih kliničnih znakih posameznega bolnika z zelo omejeno laboratorijsko diagnostiko. Pri bolnikih s krvnimi testi velikokrat preverjajo prisotnost različnih protiteles, ki delujejo proti lastnim antigenom (avtoprotitelesa). Največkrat v serumu preverjajo prisotnost revmatoidnega faktorja (RF), vendar je le-ta prisoten le pri ~ 70 % bolnikov. Najbolj specifična družina avtoprotiteles pri RA so protitelesa proti citruliniranim peptidom [129].

Prisotnost protiteles, ki prepoznajo citrulinirane peptide v serumu posameznika, je v neposredni korelaciji z razvojem RA ter stopnjo poškodbe sklepov. V nekaterih primerih so ta protitelesa odkrili nekaj let pred prvimi kliničnimi znaki obolenja in so zato postala zelo uporaben diagnostični in prognostični kazalec [138, 139]. Citrulinirane peptide so do sedaj zaznali samo v sklepnih tkivih in tekočinah, ki so bili bolezensko spremenjeni, v zdravih pa ne. Prisotnost sinovijskih citruliniranih peptidov naj bi povzročila aktivacijo sistema limfocitov B, ki sintetizirajo protitelesa, od katerih so nekatera usmerjena proti lastnim antigenom, in s tem povzročijo avtoimunski odziv [129]. Dodatno pa so opazili tudi visoko stopnjo korelacije med citruliniranimi peptidi v pljučih kadilcev, pri katerih so opazili alele HLA-DR s t.i. deljenim epitopom, in verjetnostjo razvoja RA. Tako naj bi imel deljeni epitop nekajkrat večjo afiniteto do vezave citruliniranih peptidov v primerjavi z njihovimi necitruliniranimi analogi [140]. Do sedaj še ni točno znano kateri proteini so odgovorni za tvorbo teh protiteles, ki imajo tako pomembno vlogo pri razvoju RA. Predvideva se, da sta najverjetneje za to odgovorna kolagen tipa II in fibrinogen, ki tudi sestavljata zunajcelični matriks sklepnega hrustanca [141].



## 2 Namen dela

Bolezni sklepov delimo na vnetna, mednje sodi revmatoidni artritis, in degenerativna (osteoartroza) obolenja, kjer zaradi nepravilnega in prekomernega delovanja proteaz pride do razgradnje sklepnega hrustanca in kosti v obolelem sklepu. Proteaze, ki sodelujejo pri teh procesih, spadajo v skupini metaloproteaz zunajceličnega matriksa (MMP) in lizosomskih cisteinskih proteaz (katepsinov). Metaloproteaze zunajceličnega matriksa so dolgo časa veljale kot edine odgovorne za razgradnjo zunajceličnega matriksa. Danes pa je vedno več dokazov, da imajo tudi cisteinske proteaze (katepsini) specifično vlogo v procesih, ki vplivajo na razvoj sklepnih obolenj. Pri nastanku sklepnih obolenj pa imajo pomembno vlogo tudi provnetni citokini, predvsem interlevkin-1 $\beta$ , interlevkin-6 ter dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), ki lahko vplivajo na raven izražanja genov proteaz, ki sodelujejo pri procesih razgradnje zunajceličnega matriksa.

Citrulinacija ali deiminacija proteinov je proces pri katerem iz pozitivno nabitega arginina nastane nevtralni citrulin. Le-ta je ena izmed nenaravnih aminokislin, ki v telesu nastanejo kot posledica posttranslacijske modifikacije. Citrulinirane proteine oziroma peptide najdemo pri nekaterih imunskih obolenjih kot posledica aktivacije avtoimunskega odziva (RA, multipla skleroza ...). Takšni proteini postanejo tudi bolj dovzetni za proteolizno razgradnjo. Kolagena tipa I in tipa II sta glavni sestavini kostnine in sklepnega hrustanca. Spremembe v strukturi kolagena so poglaviti razlog za prizadetost sklepov pri bolnikih z OA in RA. Proteaze, ki so udeležene pri razvoju RA, naj bi hitreje razgradile citrulinirane analoge kolagena tipa I in tipa II.

Namen doktorskega dela je:

- določiti raven izražanja proteinov različnih provnetnih citokinov (IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\alpha$ ), cisteinskih katepsinov (katepsina B in S) in metaloproteaz zunajceličnega matriksa (MMP-1, -3 in -13) kot tudi njihove proteolitske aktivnosti v vzorcih sinovijske tekočine bolnikov obolelih z RA ali OA,
- *z in vitro* razgradnjo z izbranimi cisteinskimi katepsini (B, K in S) in metaloproteazama zunajceličnega matriksa -1 in -3 pokazati, da so citrulinirani proteini zunajceličnega matriksa bolj dovzetni za proteolizno cepitev

Naši delovni hipotezi sta bili:

- lizosomske cisteinske proteaze (katepsini B, S in K) in metaloproteaze zunajceličnega matriksa (MMP-1, -3 in -13) pomembno doprinesejo k razgradnji zunajceličnega matriksa, ko se le-te izločijo iz celic,
- citrulinirani proteini zunajceličnega matriksa predstavljajo boljše tarče za razgradnjo z izbranimi cisteinskimi katepsini in metaloproteazami zunajceličnega matriksa kot njihovi necitrulinirani analogi.



### 3 Materiali in metode

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Kemikalije

- agarozna NA (Pharmacia)
- AgNO<sub>3</sub> (srebrov nitrat; Fluka)
- akrilamid/N,N-metilenbisakrilamid (Serva)
- ampicilin, natrijeva sol (Sigma)
- anionski izmenjevalec FastFlow Sepharose Q (Amersham Biosciences)
- APS (amonijev persulfat; Serva)
- Bz-Phe-Val-Arg-AMC (benzoil-*L*-fenilalanil-*L*-valinil-*L*-arginil-4-metil-7-kumarilamid; Bachem)
- DMSO (dimetilsulfoksid; Merck)
- DNP-Pro-Cha-Abu-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH<sub>2</sub> (substrat za MMP-1; Calbiochem)
- DTNB (5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzojska kislina); Serva)
- DTT (ditiotreitol; Sigma)
- E-64 (1-*L*-trans-epoksisukcinitil-levcilamido-3-(4-gavinidno) butan; Peptide Institute)
- goveji serumski albumin (*angl. Bovine serum albumin*, BSA; New England Biolabs)
- hondroitin sulfat A (Calbiochem)
- IPTG (izopropil-β-*D*-1-tiogalaktopiranozid; Sigma)
- kationski izmenjevalec FastFlow Sepharose SP (Amersham Biosciences)
- kazeinski hidrolizat N-Z-Case (Sigma)
- kloramfenikol (Sigma)
- kolagen tipa I (Sigma)
- kolagen tipa II (Sigma)
- kvasni ekstrakt (Sigma)
- *L*-cistein (Serva)
- MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH<sub>2</sub> (substrat za MMP-3; Bachem)
- MCA-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH<sub>2</sub> (substrat za MMP-13; Bachem)
- MMTS (S-metil metan tiosulfonat; Sigma)
- NaDS (natrijev dodecil sulfat; Serva)
- označevalec velikosti proteinov: PageRuler Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas)
- PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid; Fluka)
- pefablok (AEBSF; 4-(2-aminoetil)-benzensulfonil fluorid hidroklorid; Boehringer Mannheim)
- raztopina razvijalca in fiksirja
- reagent ECL za kemiluminescenco (GE Healthcare)
- reagent za določanje koncentracije proteinov (Biorad)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin; Merck)
- TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin; Sigma)
- Triton X-100 (Serva)
- Tween-20 (Serva)
- Z-Arg-Arg-AMC (N-benziloksikarbonil-*L*-arginil-*L*-arginil-4-metil-7-kumarilamid; Bachem)
- Z-Phe-Arg-AMC (N-benziloksikarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-arginil-4-metil-7-kumarilamid; Bachem)

### 3.1.2 Encimi

- DNaza I (Roche Diagnostics GmbH)
- kunčja peptidilarginin deiminaza 2 (Sigma)
- rekombinantna človeška MMP-1 (prof. dr. Hideaki Nagase, Imperial College London, Velika Britanija)
- rekombinantna človeška MMP-3 (prof. dr. Hideaki Nagase, Imperial College London, Velika Britanija)
- rekombinantni človeški cistatin C (Mojca Trstenjak Prebanda, Institut Jožef Stefan)
- rekombinantni človeški katepsin K (Mojca Trstenjak Prebanda, Institut Jožef Stefan)
- rekombinantni človeški katepsin S (Gregor Kosec, Institut Jožef Stefan)

### 3.1.3 Protitelesa

- primarna kunčja poliklonska protitelesa proti cistatinu C (dr. Tina Zavašnik, Institut Jožef Stefan)
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti citokromu c (BD Pharmingen)
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti citruliniranim peptidom (ModiQuest Research)
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti interleukinu-1 $\beta$  (Pierce Biotechnology; EH2IL1B)
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti interleukinu-6 (Pierce Biotechnology; EH2IL6)
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu B (Andreja Sekirnik, Institut Jožef Stefan)
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu S (Andreja Sekirnik, Institut Jožef Stefan)
- primarna kozja monoklonska protitelesa proti katepsinu S (R&D Systems; DY11883)
- primarna kunčja poliklonska protitelesa proti katepsinu S (Olga Vasiljeva, Institut Jožef Stefan)
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti metaloproteinazi zunajceličnega matriksa 1 (MMP-1; Abcam)
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti metaloproteinazi zunajceličnega matriksa 3 (MMP-3; Abcam)
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti dejavniku tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ; R&D Systems; DTA00C)
- sekundarna kunčja anti-mišja in kozja antikunčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Jackson ImmunoResearch)

### 3.1.4 Bakterijska gojišča

- gojišče LB: 1 % (w/v) kazeinski hidrolizat, 0.5 % (w/v) kvasni ekstrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7.4
- gojišče LBA: gojišče LB, ki vsebuje ampicilin (delovna koncentracija 50  $\mu$ g/ml)
- gojišče LBAC: gojišče LB, ki vsebuje ampicilin (delovna koncentracija 50  $\mu$ g/ml) in kloramfenikol (delovna koncentracija 34  $\mu$ g/ml)

### 3.1.5 Kompleti reagentov

- Jetquick plasmid MINIPREP spin kit (Genomed)
- komplet reagentov za encimsko imunski test (ELISA) za določevanje vsebnosti IL-1 $\beta$  (Pierce Biotechnology; EH2IL1B)
- komplet reagentov za encimsko imunski test (ELISA) za določevanje vsebnosti IL-6 (Pierce Biotechnology; EH2IL6)
- komplet reagentov za encimsko imunski test (ELISA) za določevanje vsebnosti TNF- $\alpha$  (R&D Systems; DTA00C)
- komplet reagentov za encimsko imunski test (ELISA) za določevanje vsebnosti katepsina S (R&D Systems; DY1183)

### 3.1.6 Gostiteljske bakterijske kulture

- *Escherichia coli* sev DH5 $\alpha$   
(genotip: *SupE44  $\Delta$ lacU4169 ( $\phi$ 80 lacZ  $\Delta$ M15) hdsR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1)*)
- *Escherichia coli* sev BL21(DE3)pLysS  
(genotip: F-, *ompT*, *hsdS $\beta$* (r $\beta$ -m $\beta$ -), *dcm*, *gal*, (DE3), pLysS(Cm<sup>R</sup>) tonA)

### 3.1.7 Vektorji

- pET3a (Novagen)
- pUC19 (New England Biolabs)

### 3.1.8 Klinični vzorci sinovijske tekočine

Vzorci sinovijske tekočine so bili pridobljeni v sodelovanju s Kliničnim oddelkom za revmatologijo, Kliničnega centra v Ljubljani. V raziskavo smo vključili 16 bolnikov s sklepnimi obolenji, od tega 9 bolnikov z RA in 7 bolnikov z OA. Podatki o bolnikih so prikazani v tabeli 5. Vzorce sinovijski tekočine smo po odvzemu takoj centrifugirali (300 x g, 15 minut pri 4 °C), da smo odstranili celice, supernatante pa alikvotirali na manjše volumne in shranili pri temperaturi -80 °C. Omeniti velja bolnika pod zaporedno številko 6, ki je zavračal predpisano terapijo. Bolniki z RA so za terapijo največkrat prejeli temeljna zdravila (metotreksat, sulfasalazin ter rezohin) v kombinaciji z nesteroidnimi antirevmatikami (meloksikam) in glukokortikoidom metilprednizolonom. Eden izmed bolnikov je prejel samo biološko zdravilo infliksimab, ki je zaviralec aktivnosti enega glavnih pro-vnetnih citokinov - dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ). Bolniki z OA so povečini dobili nesteroidna protivnetna zdravila (diklofenak) in proti bolečinski terapijo (tramadol hidroklorid).

Tabela 5: Splošne in klinične značilnosti bolnikov s sklepnimi obolenji.

(CRP – C-reaktivni protein; SF – sinovijska tekočina; SR – sedimentacija; n.p. – ni podatka)

BOLNIK	DIAGNOZA	SPOL	STAROST	V <sub>SF</sub> /(ml)	TERAPIJA	SR	CRP
1	RA	Ž	58	25	metotreksat/metilprednizolon/sulfasalazin	64	64
2	RA	Ž	52	60	metotreksat /rezohin	35	8
3	RA	Ž	44	70	metotreksat	n.p.	n.p.
4	RA	Ž	44	30	infliksimab	n.p.	n.p.
5	RA	Ž	66	25	metotreksat/metilprednizolon/sulfasalazin	n.p.	n.p.
6	RA	M	n.p.	50	brez terapije	34	44
7	RA	Ž	74	30	metotreksat / metilprednizolon	n.p.	n.p.
8	RA	Ž	57	20	meloksikam	45	98
9	RA	Ž	54	40	diklofenak	52	98
10	OA	Ž	45	35	sulfasalazin	27	< 5
11	OA	Ž	76	60	tramadol hidroklorid	33	17
12	OA	Ž	56	40	n.p.	16	< 5
13	OA	M	27	90	n.p.	3	n.p.
14	OA	Ž	50	70	n.p.	16	< 5
15	OA	M	76	20	diklofenak	25	10
16	OA	Ž	74	15	diklofenak	32	< 5

### 3.1.9 Pufri

#### Acetatni puffer

100 mM NaCH<sub>3</sub>COO  
1 mM EDTA  
5 mM DTT  
0.1 % (w/v) PEG 6000  
pH 4.5

#### Elektroforezni puffer za NaDS-PAGE

25 mM Tris  
192 mM L-glicin  
0.1 % (w/v) NaDS

#### Nanašalni puffer za NaDS-PAGE (6x) – za 10 ml

300 mM Tris  
100 mM NaDS  
40 mM EDTA  
1.2 M DTT  
60 % (v/v) glicerol  
30 mg bromfenol modro

#### Prenašalni puffer

25 mM Tris  
192 mM L-glicin  
15 mM SDS  
20 % (v/v) metanol

#### Puffer BANA

16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
88 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
3 mM EDTA  
0.1 % (w/v) PEG

#### Puffer PBS

145 mM NaCl  
2.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
7.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
pH 7.4

#### Puffer TNC

50 mM Tris/HCl  
150 mM NaCl  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
0.02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>  
0.05 % (w/v) Brij 35  
pH 7.5

#### Substratni puffer za TMB

188.5 ml 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
121.5 ml 0.1 M citronske kisline  
250 ml dH<sub>2</sub>O  
pH 6.0

#### Thannhauserjev reagent

1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>  
27 mM DTNB  
pH 7.5

### 3.1.10 Laboratorijska oprema

- aparatura za prenos po Western P8DS Penguin (Owl Separation Systems)
- avtomatske pipete (Gilson)
- centrifuga RC 5C plus (Sorvall)
- centrifuge Eppendorf 5402, 5410, 5417R, 5415R, 5810R
- dializno črevo Servapor 10 kDa (Serva)
- filmi Biomax Light Film (Kodak)
- filter Minisart z velikostjo por 0.2  $\mu\text{m}$  (Sartorius)
- fluorimeter C-61 Photon Technology International
- fluorimeter za mikrotiterske plošče Safire (Tecan)
- ionsko izmenjevalna kolona FastFlow Sepharose S(Q) 1 cm x 10 cm (Pharmacia)
- kadička za NaDS PAGE Mini Protean II (Biorad)
- kaseta za razvijanje filmov X-omatic regular screens (Kodak)
- koncentradorji Centricon (Millipore)
- magnetna mešala MM-530 (Tehtnica)
- nitrocelulozna membrana NC45 (Sigma)
- pH – meter (Metrel)
- spektrofotometer Lambda 18 (Perkin Elmer)
- spektrofotometer ND-1000 (Nanodrop)
- ultrafilter 8200 (Amicon)
- ultrazvočni sonifikator (Heat Systems-Ultrasonics)

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Izražanje gena za rekombinanten človeški prokatepsin B v bakteriji *Escherichia coli*

Za izražanje gena za rekombinanten človeški prokatepsin B smo uporabili trajno kulturo seva *E.coli* BL21(DE3)pLysS z vektorjem za izražanje pET3a. Sev vsebuje lizogeni bakteriofag  $\lambda$ DE3 z zapisom za T7 RNA polimerazo, ki je pod nadzorom *lacUV* promotorja, katerega naloga je, da prepreči izražanje genov zelenega proteina vse do tistega trenutka, ko dodamo ustrezeni induktor (npr. IPTG) [142]. Celice z vstavljenim vektorjem, ki je vseboval zapis za protein, so imele rezistenco proti ampicilinu (vektor) in kloramfenikolu (celice).

S kolonijo celic BL21(DE3)pLysS z vstavljenim ustreznim vektorjem, ki je zrasla preko noči na trdnem gojišču LBAC, smo inokulirali 10 ml tekočega LBAC gojišča. To smo pustili stresati 6 - 8 ur pri 37 °C, 250 obr./min ter z 2 ml tega gojišča ponovno inokulirali 100 ml svežega LBAC gojišča, ki smo ga pustili stresati ob istih pogojih preko noči pri 37 °C. Po 10 ml prekonočne kulture smo uporabili za inokulacijo 400 ml alikvotov tekočega LBAC gojišča. Te smo ponovno stresali pri 37 °C dokler ni vrednost OD<sub>600</sub> znašala med 0.7 in 1.0. Z dodatkom IPTG do končne koncentracije 0.4 mM smo inducirali izražanje rekombinantnih proteinov. Po treh urah stresanja smo celice centrifugirali 10 minut pri 6000 obr./min in bakterijsko usedlino resuspendirali v 100 ml 50 mM Tris-HCl pH 8.0, ki je vseboval še 2 mM EDTA in 0.1% Triton X-100 ter zamrznili pri -70 °C.

#### 3.2.1.1 Priprava bakterijskih celičnih lizatov

Bakterije ( $1 \times 10^8$  celic) smo ločili od gojišča s centrifugiranjem (5 minut pri 14.000 x g) ter jih ponovno resuspendirali v nanašalnem pufru za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS. Suspenzijo celic smo nato sonificirali in nato inkubirali 5 minut pri 100 °C.

### 3.2.2 Izolacija in čiščenje rekombinantnih proteinov

Rekombinantna človeška prokatepsin B in katepsin B smo pripravili po že objavljenem protokolu [143], zato bodo na kratko opisani samo ključni koraki protokola.

#### 3.2.2.1 Izolacija inkluzijskih teles

Celice z izraženim rekombinantnim prokatepsinom B smo odmrznili in obdelali z ultrazvokom 3 x 5 minut pri 50-odstotni amplitudi, dodali 5 mg DNaze I in 100  $\mu$ l 1 M MgCl<sub>2</sub> ter inkubirali 45 minut pri 37 °C. Suspenzijo smo nato centrifugirali 40 minut pri 4 °C in 6000 obr./min in lizirane bakterijske celice sprali z:

- 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 (3x)
- 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 2 M urea (1x)
- dH<sub>2</sub>O (1x)

Med posameznimi spiranji smo bakterijsko suspenzijo centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 6000 obr./min. Tako pripravljena inkluzijska telesa smo shranili na -20 °C.

#### 3.2.2.2 Raztapljanje inkluzijskih teles in renaturacija prokatepsina B

Inkluzijska telesa smo raztopili v 60 ml sveže pripravljene raztopine 7 M GdnHCl, pH med 8.0 in 8.5, z dodanim 0.3 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, ob rahlem stresanju pri 37 °C. Raztopini smo zatem dodali 1 ml 50 mM Thannhauserjevega reagenta in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Reakcijo smo prekinili z dodatkom 4 ml ledocetne kisline in razredčili z mrzlo dH<sub>2</sub>O do končnega volumna 300 ml ter ponovno

inkubirali 1 uro na ledu. Suspenzijo smo centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 6000 obr./min in jo nato še enkrat resuspendirali z dH<sub>2</sub>O in ponovno centrifugirali pri enakih pogojih.

Spektrofotometrično smo določili koncentracijo raztopljenih S-sulfoniranih proteinov v pufru s pH 8,0, ki je vseboval 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 8 M urea, z merjenjem absorbance pri 280 nm ( $A_{280}$ ). Rastopino proteinov smo nato redčili v tolikšnem volumnu pufra s pH 8,0, ki je vseboval 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 6 M urea, da je bila končna koncentracija proteina ~ 0,1 mg/ml. Tako pripravljeno rastopino smo dializirali preko noči v dializnem črevesu z velikostjo por 14 kDa pri 4 °C proti reoksidacijskemu pufru s pH 7,6, ki je vseboval 100 mM Tris-HCl, 3 mM EDTA, 5 mM *L*-cistein. Zjutraj smo dializno črevo za približno 6 ur prenesli v dializni pufer brez *L*-cisteina, čez noč pa še v pufer s pH 7,6, ki je vseboval 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA. V primeru izolacije rekombinantnega prokatepsina B smo renaturiran protein po dializi samo še prefiltrirali skozi membrano z velikostjo por 0,2 μm in koncentrirali v ultrafiltru z membrano OM-10 oziroma v koncentradorjih Centricon 10 ter shranili pri -20 °C. Dodatno smo prokatepsin B očistili še s pomočjo anionsko izmenjevalne kromatografije (glej poglavje 3.2.2.4.1).

### 3.2.2.3 Aktivacija prokatepsina B

Pri pripravi zrelega encima (katepsina B) pa smo prokatepsin B aktivirali z 1 M NaCH<sub>3</sub>COO do pH 4,5, ter mu dodali *L*-cistein do končne koncentracije 10 mM in inkubirali 1,5 ure pri 37 °C. Zatem smo tako pripravljeno rastopino dializirali preko noči pri 4 °C v dializnem črevesu z velikostjo por 14 kDa proti pufru s pH 4,5, ki je vseboval 20 mM NaCH<sub>3</sub>COO in 1 mM EDTA. Tako dializiran vzorec smo dodatno očistili še s kationsko izmenjevalno kromatografijo (glej poglavje 3.2.2.4.2).

### 3.2.2.4 Kromatografske tehnike čiščenja rekombinantnih proteinov

#### 3.2.2.4.1 Anionska izmenjevalna kromatografija

Vzorec prokatepsina B, ki smo ga pripravili po postopku v poglavju 3.2.2.2, smo očistili s pomočjo ionsko izmenjevalne kromatografije. Kolona je vsebovala 10 ml trimetilaminopropilnega anionskega izmenjevalca FastFlow Sepharose Q (-O-CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). Nosilec smo najprej uravnotežili v pufru A in nato na kolono začeli nanašati rekombinanten protein. Nanašanje na kolono je potekalo pri konstantnem pretoku 50 ml/h in temperaturi 4 °C. Nevezane beljakovine smo sprali s 300 do 400 ml pufra A. Za elucijo vezanih proteinov smo uporabili pufer B, katerega smo nanašali na kolono v količini 1 ml in pod kolono zbirali frakcije. Zbranim frakcijam smo merili absorbanco pri 280 nm in združili tiste frakcije, pri katerih je bila  $A_{280} \geq 0,5$ . Očiščen vzorec prokatepsina B smo alikvotirali in zamrznili pri -20 °C.

- pufer A: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA
- pufer B: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl

#### 3.2.2.4.2 Kationska izmenjevalna kromatografija

Vzorec katepsina B, ki smo ga pripravili po postopku v poglavju 3.2.2.3, smo očistili s pomočjo ionsko izmenjevalne kromatografije. Kolona je vsebovala 10 ml sulfopropilnega kationskega izmenjevalca FastFlow Sepharose SP (-O-CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Nosilec smo najprej uravnotežili v pufru C in nato na kolono začeli nanašati rekombinanten protein. Nanašanje na kolono je potekalo pri konstantnem pretoku 50 ml/h in temperaturi 4 °C. Nevezane beljakovine smo sprali s 300 do 400 ml pufra C. Za elucijo vezanih proteinov smo uporabili pufer D, katerega smo nanašali na kolono v količini 1 ml in pod kolono zbirali frakcije. Zbranim frakcijam smo merili absorbanco pri 280 nm in združili tiste frakcije, pri katerih je bila  $A_{280} \geq 0,5$ . Očiščenemu vzorcu katepsina B smo inhibirali encimsko aktivnost z dodatkom reverzibilnega inhibitorja cisteinskih proteaz, MMTS, v molarnem prebitku 1.25: 1 glede na rekombinanten protein, ga alikvotirali in zamrznili pri -70 °C.

- pufer C: 20 mM NaCH<sub>3</sub>COO pH 4,5, 1 mM EDTA
- pufer D: 20 mM NaCH<sub>3</sub>COO pH 4,5, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl

### 3.2.3 Biokemijska karakterizacija proteinov

#### 3.2.3.1 Analiza proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo z dodanim denaturantom natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE) smo uporabljali za rutinsko analizo proteinske vzorcev, kot je analiza izražanja in čistosti proteinov ter določevanje približne molekulske mase. Izvajali smo jo po klasičnem postopku [144]. Poliakrilamidni gel je sestavljen iz ločevalnega gela z različno vsebnostjo akrilamida (w/v) in iz koncentracijskega gela (glej tabelo 7). Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali nanašalni pufer, ki je vseboval detergent natrijev dodecilsulfat (NaDS) in reducent DTT, in jih termično obdelali (5-minutna inkubacija pri 100 °C). Za kontrolo velikosti proteinov smo nanесли proteinske standarde. Elektroforeza je potekala v elektroforeznem pufru v aparaturi za elektroforezo pri konstantnem toku 25 mA/gel. Za obarvanje proteinov v gelu smo uporabljali 0.2 % raztopino Coomassie Brilliant Blue. Gele z manjšimi koncentracijami proteinov v vzorcih pa smo razvili z barvanjem s srebrom ( $\text{AgNO}_3$ ).

Tabela 6: Sestava 8 %, 12.5 % oz. 15 % ločevalnega poliakrilamidnega gela in 5 % koncentracijskega poliakrilamidnega gela.

komponenta	ločevalni gel			koncentracijski gel
	8 %	12.5 %	15 %	5 %
40 % akrilamid-bisakrilamid (37.5:1)	2 ml	3.13 ml	3.75 ml	1.25 ml
4x separacijski pufer (1.5 M Tris, pH 8.8)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	/
4x koncentracijski pufer (0.5 M Tris, pH 6.8)	/	/	/	2.5 ml
dH <sub>2</sub> O	5.4 ml	4.27 ml	3.65 ml	6.15 ml
10 % NaDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
10 % APS	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

##### 3.2.3.1.1 Priprava kliničnih vzorcev sinovijske tekočine

Vzorci sinovijske tekočine smo pripravili tako, da smo naredili 10-kratno redčitev posameznega vzorca v dH<sub>2</sub>O v končnem volumnu 100 µl, kateremu smo nato dodali ustrezní volumen nanašalnega pufera za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS. Tako pripravljeno raztopino sinovialne tekočine smo nato inkubirali 10 minut pri 100 °C. Za nadaljnjo analizo smo uporabili 20 µl alikvote.

##### 3.2.3.2 Barvanje gelov s Commassie Brilliant Blue

Commassie Brilliant Blue R-350 je barvilo, ki se nespecifično veže na proteine v poliakrilamidnem gelu in jih obarva modro. Meja detekcije je ~ 100 ng proteina. Koncentrirano raztopino Commassie Brilliant Blue R-350 smo pripravili tako, da smo tableto PlusOne Commassie Blue PhastGel R-350 5 min raztapljali v 80 ml dH<sub>2</sub>O, dodali 120 ml absolutnega EtOH in mešali dokler se ni tableta popolnoma raztopila. Pred uporabo smo koncentrirano raztopino redčili z 20 % očetno kislino (AcOH) v razmerju 1:1. Gel smo po elektroforezi prenesli v tako pripravljeno raztopino in inkubirali vsaj 1 uro pri sobni temperaturi ter nato 1 do 2 uri spirali z večkratno zamenjavo razbarvalne raztopine (30 % (v/v) MeOH, 10 % (v/v) AcOH), dokler se proteinske lise niso razločno videle.

##### 3.2.3.3 Barvanje gelov s koloidnim srebrom

Gel smo po končani elektroforezi fiksirali najmanj 30 minut pri sobni temperaturi v fiksirni raztopini F, raztopino smo nato odlili in gel dobro spirali z dH<sub>2</sub>O ter dodali 100 ml 0.0005 % raztopine DTT in ponovno stresali 30 minut pri sobni temperaturi. Raztopino DTT smo nato zamenjali z raztopino 0.1 % (w/v)  $\text{AgNO}_3$  in gel ponovno stresali najmanj 30 minut pri sobni temperaturi. Gel smo spirali z dH<sub>2</sub>O in razvili s 100 ml razvijalne raztopine R. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 5 g trdne citronske kisline, ki smo jo dodali v

razvijalno raztopino R.

- raztopina F: 30 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) AcOH
- raztopina R: 3 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.5 % (v/v) 37 % (v/v) formaldehid

### 3.2.3.4 Encimsko imunski testi

#### 3.2.3.4.1 Detekcija proteinov s prenosom Western

Prenos Western je metoda prenosa proteinov iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno membrano pod vplivom električnega toka. Membrane so bolj obstojne kot geli in omogočajo vrsto različnih načinov detekcije nanje vezanih proteinov, poleg tega pa jih lahko tudi večkrat uporabimo. V našem primeru smo proteine detektirali s specifičnimi protitelesi.

Prenos proteinov je potekal v prenašalnem pufru 120 minut pri konstantnem toku 200 mA (razen pri poskusih, kjer je to drugače označeno). Po končanem prenosu smo nezasedena vezavna mesta na membrani blokirali najmanj 1 uro v blokirnem pufru (5 % posneto mleko v prahu v pufru PBS-T (PBS pufer z dodanim 0.5 % (v/v) Tween-20)) pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju. V blokirnem pufru smo redčili tudi vsa protitelesa. Membrano smo nato inkubirali s primarnimi protitelesi čez noč pri 4 °C. Po končani inkubaciji smo membrano trikrat spirali s pufrom PBS-T, vsakič po 15 minut, nato je sledila 1.5-urna inkubacija pri sobni temperaturi s sekundarnimi protitelesi (redčitev 1:5000), konjugiranimi s hrenovo peroksidazo (HRP). Ponovno smo membrano trikrat po 15 minut sprali s pufrom PBS-T. Vse stopnje inkubacij so potekale ob rahlem stresanju. Za detekcijo proteinskih lis na nitrocelulozni membrani smo uporabili sistem ECL, ki temelji na kemiluminiscenčni reakciji, ki omogoči vizualizacijo proteinov na kemiluminiscenco občutljiv fotografski film X-Omat (Kodak).

Tabela 7: Prikaz delovnih koncentracij uporabljenih primarnih protiteles.

PRIMARNO PROTITELO	DELOVNA KONCENTRACIJA	REDČITVE PROTITELES
mAb CatB	1 µg/ml	1:1000
pAb CatS (serum)	n.p.	1:2000
pAb CystC	2 µg/ml	1:800
mAb MMP-1	167 ng/ml	1:6000
mAb MMP-3	333 ng/ml	1:3000
mAb citrulin	1 µg/ml	1:500

#### 3.2.3.4.2 Direktni test ELISA

Z direktnim testom ELISA z dvojnimi protitelesi (sendvič ELISA test) smo določali koncentracije antigenov v vzorcih. Antigeni, prisotni v preiskovanih vzorcih, so se vezali na protitelesa, adsorbirana na trdno fazo. Specifično protitelo veže antigen, nevezan material pa speremo. Na tvorjene komplekse protitelo-antigen, adsorbirane na trdno fazo, smo vezali protitelesa, ki so specifična za drug epitop in imajo kovalentno vezan encim (HRP). Po ponovnem spiranju nevezanega materiala je bila količina obarvanega kromogenega substrata sorazmerna količini antigenov v testiranih vzorcih.

Z direktnimi testi ELISA za izbrane antigene IL-1β, IL-6, TNF-α in CatS smo določili koncentracijo posameznih antigenov v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine. Testi so bili opravljeni po priporočenem protokolu proizvajalca (poglavje 3.1.5) pri sobni temperaturi. Za detekcijo smo uporabili kromogeni substrat TMB. V luknjice mikrotitrne plošče smo nanesti ustreznimi volumeni mešanice substrata TMB in substratnega pufru v razmerju 1:1 in inkubirali predpisan čas, glede na protokol proizvajalca. Reakcijo smo prekinili z dodatkom 50 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in izmerili absorbanco pri 450 nm.

Test ELISA za antigena IL-1β in IL-6 deluje v koncentracijskem območju med 10.24 do 400 pg/ml z občutljivostjo < 1pg/ml, medtem ko za TNF-α in CatS deluje v območju med 15.6 do 1000 pg/ml. Občutljivost testa za TNF-α je med 0.5 do 5.5 pg/ml, podatek za CatS pa ni na voljo.

### 3.2.3.5 Encimska kinetika

#### 3.2.3.5.1 Določitev aktivne koncentracije rekombinantnih encimov z inhibitorjem E-64

Meritev celotne proteinske koncentracije nam ne da informacije o deležu aktivne oblike rekombinantnega proteina. V proteinskih vzorcih ponavadi najdemo dve obliki, pravilno zvito (aktivno) ter nepravilno zvito (neaktivno). Aktivno koncentracijo encimov lahko določimo z metodo titracije aktivnega mesta, pri kateri merimo aktivnost encima pri dodatku inhibitorja z natančno določeno koncentracijo. Pri titraciji aktivnih mest katepsinov uporabljamo ireverzibilni inhibitor E-64, ki se veže v aktivno mesto v stehiometrijskem razmerju 1:1 in je specifičen za cisteinske proteaze.

Rekombinanten katepsin B smo ustrezno redčili in ga aktivirali 10 minut pri sobni temperaturi z 5 mM DTT (da odstranimo reverzibilen inhibitor MMTS) v 100 mM acetatnem pufru pH 4.5 z 1 mM EDTA.

Vzorcem smo dodali različne koncentracije E-64 in dopolnili do končnega volumna 200  $\mu$ l s pufrom, v katerem je encim aktiven. Tako pripravljene reakcijske mešanice smo inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi ter dodali 2.3 ml 10  $\mu$ M raztopine sintetičnega substrata Z-Arg-Arg-AMC v pufru BANA. Končna koncentracija encima v reakcijski mešanici je bila 15 nM. Merjenje fluorescence je potekalo eno minuto pri vzbujevalni valovni dolžini 370 nm in emisijski valovni dolžini 460 nm. Nakloni premic so sorazmerni preostali encimski aktivnosti. V vzorcih je bilo razmerje med inhibitorjem in encimom ( $[I]/[E]$ ) od 0 do 1.5. Iz grafa preostale encimske aktivnosti v odvisnosti od razmerja med  $[I]/[E]$  smo s pomočjo linearne regresije določili presečišče z ordinatno osjo. Le-to je enako razmerju med aktivno in ocenjeno koncentracijo proteaze.

#### 3.2.3.5.2 Merjenje aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine

Aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine smo spremljali z uporabo različnih sintetičnih fluorogenih substratov. Vzorce sinovijske tekočine (300  $\mu$ l) smo aktivirali 10 minut pri sobni temperaturi z dodatkom 5 mM DTT ter nato redčili s pripravljeno raztopino pufru BANA in izbranega substrata do končnega volumna 1 ml. Končna koncentracija substrata za merjenje katepsinske aktivnosti je bila 20  $\mu$ M. Reakcijo smo naredili tudi v prisotnosti desetkratnega prebitka inhibitorja E-64. Merjenje fluorescence je potekalo v kvarčnih kivetah neprekinjeno 1 uro pri sobni temperaturi pri vzbujevani valovni dolžini 370 nm in emisijski valovni dolžini 460 nm. Nakloni premic so tako sorazmerni encimski aktivnosti.

Za splošen katepsinski substrat smo uporabili Z-Phe-Arg-AMC, za določitev aktivnosti katepsina B smo izbrali Z-Arg-Arg-AMC ter Bz-Phe-Val-Arg-AMC za določitev aktivnosti katepsina S.

#### 3.2.3.5.3 Merjenje aktivnosti izbranih MMP-jev v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine

Aktivnosti izbranih MMP-jev v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine smo spremljali z uporabo različnih sintetičnih fluorogenih substratov. Vzorce sinovijske tekočine (95  $\mu$ l) smo redčili s pufrom TNC do končnega volumna 190  $\mu$ l. Tako pripravljeno reakcijsko mešanico smo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi in nato dodali 10  $\mu$ l izbranega substrata do končne koncentracije 10  $\mu$ M. Reakcijo smo naredili tudi v prisotnosti prebitka EDTA, ki je poznan tudi kot inhibitor MMP-jev. Merjenje fluorescence je potekalo v mikrotitrskih ploščah neprekinjeno 1.5 uro pri sobni temperaturi pri izbrani vzbujevalni in emisijski valovni dolžini. Nakloni premic so tako sorazmerni encimski aktivnosti.

Za določevanje aktivnosti izbranih MMP-jev smo uporabili sledeče sintetične fluorogene substrate:

DNP-Pro-Cha-Abu-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH<sub>2</sub> ( $\lambda_{exc}$  = 365 nm,  $\lambda_{em}$  = 450 nm) za MMP-1;  
Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH<sub>2</sub> ( $\lambda_{exc}$  = 325 nm,  $\lambda_{em}$  = 395 nm) za MMP-3;  
MCA-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH<sub>2</sub> ( $\lambda_{exc}$  = 325 nm,  $\lambda_{em}$  = 395 nm) za MMP-13.

### 3.2.4 Statistična obdelava podatkov

Rezultati so podani kot povprečna. Za statistično primerjavo kliničnih vzorcev sinovijske tekočine med bolniki obolelimi z RA in OA smo uporabili neparametrično analizo z Mann-Whitneyevim testom, kjer smo določali povezanost med izražanjem posameznih proteinov in proteolizno aktivnostjo proteaz pri bolnikih. Za računanje statističnih parametrov smo uporabili računalniški program SPSS 10.0.

### 3.2.5 *In vitro* reakcija citrulinacije modelnih proteinov

Citrulinacija je posttranslacijska modifikacija, ki jo uravnava encim PAD. Optimizirali smo postopek *in vitro* citrulinacije dveh modelnih proteinov, denaturiranega kolagena tipa I in tipa II (želatina), pri izbrani temperaturi 37 °C. Reakcija je potekala ob rahlem stresanju 1.5 ure. Reakcijska mešanica je bila sledeča:

- 20 µl kolagena tipa I ali tipa II (2.5 µg/µl)
- 68 µl pufra za citrulinacijo (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM CaCl<sub>2</sub>)
- 7 µl encima PAD2
- 5 µl 100 mM DTT

### 3.2.6 Cepitve citruliniranih in necitruliniranih modelnih proteinov s cisteinskimi katepsini B, S in K ter z MMP-1 in MMP-3

Teste proteolitskih cepitev citruliniranih (poglavje 3.2.5) in necitruliniranih modelnih proteinov s cisteinskimi katepsini B, S in K ter z MMP-1 in MMP-3 smo izvajali pri različnih masnih razmerjih ter časovnih intervalih, optimiziranih za posamezno kombinacijo proteinov (glej tabelo 6).

Reakcijske zmesi smo po končani reakciji analizirali z NaDS-PAGE (poglavje 3.2.3.1) ter jih barvali s koloidnim srebrom (3.2.5.3). Določene reakcijske mešanice smo detektirali tudi s prenosom Western.

Tabela 8: Prikaz različnih masnih razmerij za cepitve citruliniranih in necitruliniranih modelnih proteinov s cisteinskim katepsini B, K in S ter MMP-1 in MMP-3 (cdMMP-3 je okrajšava za katalitsko domeno MMP-3). Pri kolagenu tipa II smo pri reakciji s cisteinskimi katepsini uporabili tudi dodatek hondroitin sulfata A.

KOLAGEN TIP I		KOLAGEN TIP II	
CatB	1 : 250	CatB	1 : 10
CatK	1 : 1000	CatK	1 : 5
CatS	1 : 1000	CatS	1 : 10
± 1.5 mg/ml hondroitin sulfata A			
MMP-1	1 : 100	MMP-1	1 : 100
cdMMP-3	1 : 50	cdMMP-3	1 : 50

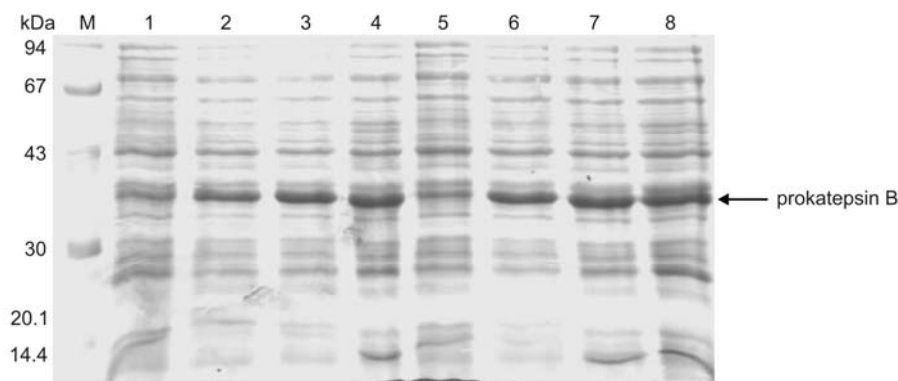


## 4 Rezultati

### 4.1 Priprava rekombinantnih proteinov

#### 4.1.1 Izražanje gena za človeški rekombinanten prokatepsin B v bakteriji *Escherichia coli*, izolacija ter čiščenje

Gen za prokatepsin B smo izrazili in dobljene proteine osamili po že objavljenem protokolu [143]. Količino izraženega prokatepsina B smo določili z analizo bakterijskih celičnih lizatov z uporabo poliakrilamidne gelske elektroforeze v prisotnosti NaDS. Bakterijski celični lizati so bili pripravljene po postopku opisanem v poglavju 3.2.5.1.1 ter odvzeti pred indukcijo izražanja gena za prokatepsin B in nato prvo, drugo in tretjo uro po dodatku induktorja IPTG. Označena velikost prokatepsina B pri ~ 35 kDa ustreza teoretični neglikozilirani obliki tega proteina (slika 11).

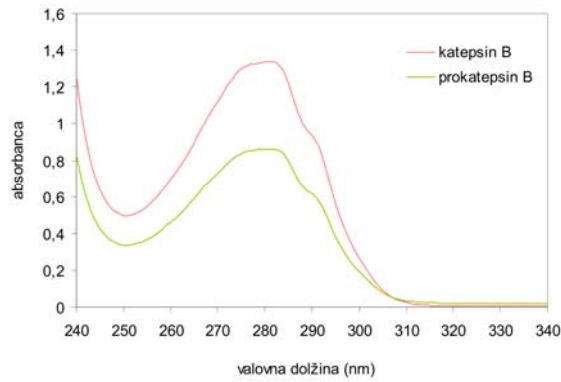


Slika 11: Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (12.5 % gel) pripravljenih bakterijskih lizatov pred in po indukciji izražanja gena za prokatepsin B. (M – označevalec velikosti; 1 in 5 – pred indukcijo izražanja; 2 in 6 – ena ura po indukciji; 3 in 7 – dve uri po indukciji; 4 in 8 – tri ure po indukciji).

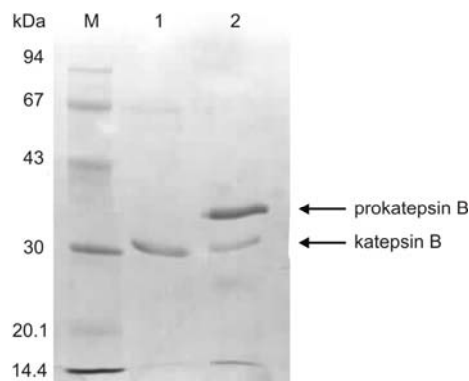
Prokatepsin B smo dodatno očistili s pomočjo anionsko izmenjevalne kromatografije po postopku opisanem v poglavju 3.2.2.4.1 in pridobili 3.2 mg/ml rekombinantnega proteina.

Pri izolaciji katepsina B pa smo delu pridobljenega in očiščenega prokatepsina B znižali vrednost pH, mu dodali *L*-cistein ter inkubirali pri 37 °C. S tem smo sprožili avtoaktivacijo prokatepsina B v njegovo zrelo obliko. Vzorec smo dodatno še dializirali in očistili s kationsko izmenjevalno kromatografijo po postopku opisanem v poglavju 3.2.2.4.2 ter tako pridobili 5.6 mg/ml rekombinantnega proteina.

Čistost izoliranih rekombinantnih proteinov prokatepsina B in katepsina B smo preverili z merjenjem absorpcijskega spektra (slika 12) in s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (slika 13).



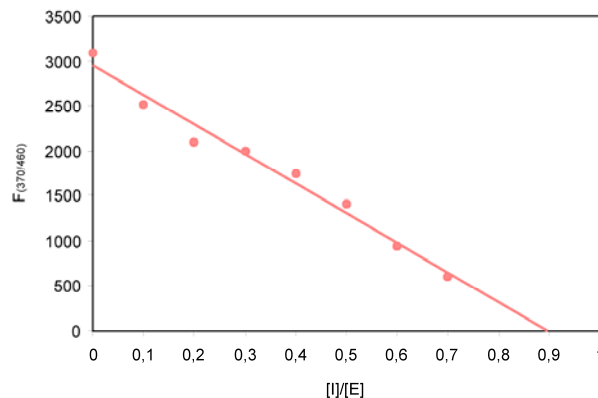
Slika 12: Absorpcijska spektra rekombinantnega katepsina B in prokatepsina B.



Slika 13: Poliakrilamidna gelska elektroforeza izoliranih rekombinantnih proteinov v prisotnosti NaDS (12.5 % gel). (M – označevalci velikosti; 1 – rekombinanten katepsin B; 2 – rekombinanten prokatepsin B)

#### 4.1.2 Določanje aktivne koncentracije katepsina B in prokatepsina B

V nadaljevanju smo rekombinantno pridobljenim proteinom želeli določiti tudi delež aktivnega encima s titracijo aktivnega mesta. V ta namen smo uporabili ireverzibilni inhibitor cisteinskih proteaz papainove naddružine s široko specifičnostjo, E-64 [145]. V primeru katepsina B je bil delež aktivnega encima približno 90 %. Točke na grafu nam predstavljajo eksperimentalne vrednosti hitrosti preostale encimske aktivnosti pri določenem molarnem razmerju [encim]/[inhibitor] ( $[E]/[I]$ ), premica pa je izračunana s pomočjo linearne regresijske analize.

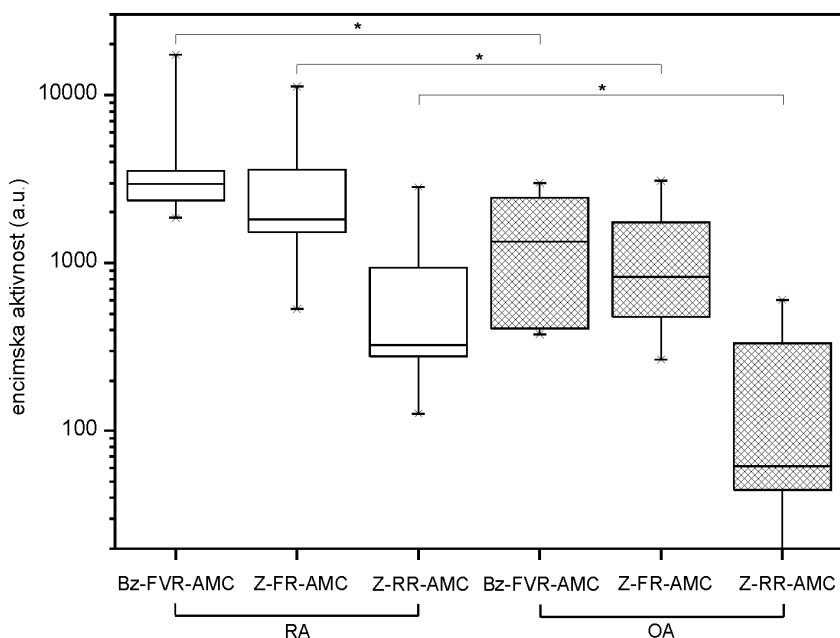


Slika 14: Titracija aktivnega mesta rekombinantnega katepsina B z ireverzibilnim inhibitorjem E-64.

## 4.2 Določitev proteolizne aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov ter metaloproteaz zunajceličnega matriksa v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine

### 4.2.1 Določitev encimske aktivnosti cisteinskih katepsinov

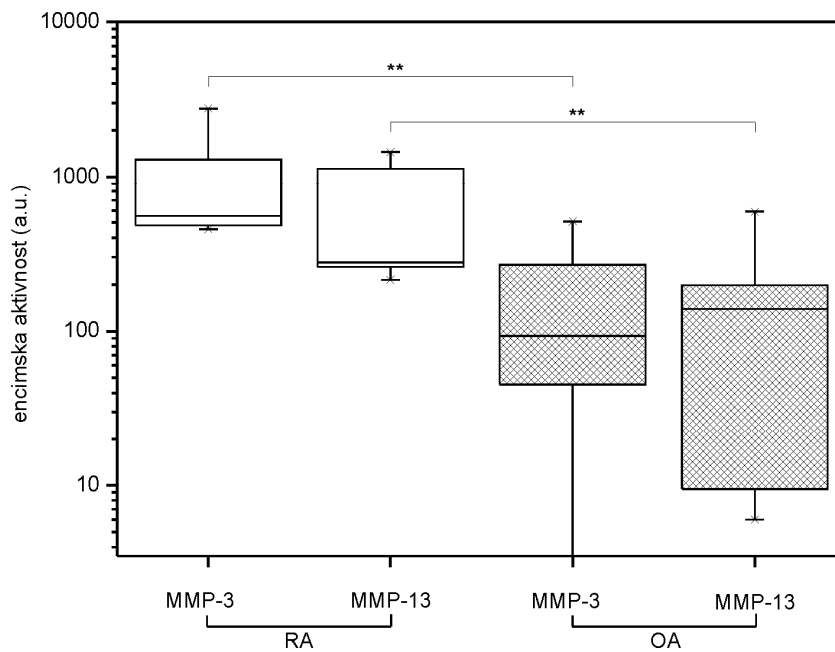
V kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov obolelih z RA ali OA smo želeli preveriti encimsko aktivnost izbranih cisteinskih katepsinov, predvsem katepsinov B in S. V ta namen smo uporabili različne sintetične fluorogene substrate (slika 15). Razgradnja splošnega katepsinskega substrata Z-Phe-Arg-AMC s široko specifičnostjo je pokazala, da so aktivni cisteinski katepsini (katepsini B, K, L in S) prisotni v vseh kliničnih vzorcih sinovialne tekočine bolnikov obolelih z RA ali OA. V nadaljevanju smo želeli ločiti med posameznimi katepsinskimi aktivnostmi in smo uporabili selektivnejše sintetične substrate. Tako smo uporabili Bz-Phe-Val-Arg-AMC, ki se uporablja za merjenje aktivnosti katepsinu S podobnih encimov, in Z-Arg-Arg-AMC, ki se uporablja za merjenje aktivnosti katepsinu B podobnih encimov. Primerjava katepsinskih aktivnosti med splošnim in obema selektivnejšima substratoma je pokazala, da je bila razgradnja Bz-Phe-Val-Arg-AMC uspešnejša in da gre večino katepsinske aktivnosti pripisati katepsinu S in ne katepsinu B, ki je kazal precej nižjo encimsko aktivnost. Čeprav so katepsinske aktivnosti kazale podoben vzorec tako pri bolnikih z RA kot z OA, je podrobnejša analiza pokazala, da gre vendarle za statistično značilno razliko proteolizne aktivnosti ( $P < 0.05$ ) pri bolnikih z RA za vse uporabljene substrate. Čeprav ni statistično značilno, velja omeniti, da so bile pri bolniku, ki je zavrnil predpisano terapijo, aktivnosti za red velikosti višje, kot pa pri ostalih bolnikih s terapijo.



Slika 15: Aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov na različne sintetične fluorogene substrate v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA (bela barva) ali OA (siva barva). Slika prikazuje minimalno in maksimalno vrednost ter kvartile za posamezno skupino meritev, pri čemer horizontalna črta predstavlja mediano. Statistično značilna razlika je na sliki prikazana z \* ( $P < 0.05$ ). Z-FR-AMC smo uporabili kot splošen katepsinski substrat, za določitev aktivnosti katepsina B smo izbrali Z-RR-AMC ter Bz-FVR-AMC za določitev aktivnosti katepsina S.

#### 4.2.2 Določitev encimske aktivnosti metaloproteaz zunajceličnega matriksa

Dodatno smo želeli preveriti tudi encimsko aktivnost metaloproteaz zunajceličnega matriksa v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine, med katerimi smo izbrali MMP-1, MMP-3 ter MMP-13 za katere je bilo že pokazano, da imajo pomembno vlogo pri razvoju sklepnih obolenj in pri razgradnji zunajceličnega matriksa [82]. Uporabili smo selektivne sintetične fluorogene substrata za posamezno izbrano proteazo (slika 16). Encimsko aktivnost v kliničnih vzorcih smo zaznali v primeru MMP-3 in MMP-13 pri vseh testiranih vzorcih sinovialne tekočine, s statistično značilno razliko proteolizne aktivnosti pri bolnikih z RA ( $P < 0.01$ ) za oba uporabljena sintetična substrata. Proteolizne aktivnosti za MMP-1 pa v kliničnih vzorcih pri takšnih eksperimentalnih pogojih nismo uspeli zaznati. V nasprotju z opaženo povečano proteolizno aktivnostjo cisteinskih proteaz pri bolniku brez terapije so bile aktivnosti MMP-3 in MMP-13 primerljive z ostalimi vzorci. Glede na to, da primerjava aktivnostnih profilov med MMP-3 in MMP-13 ni pokazala večjih razlik, lahko rečemo, da sta obe proteazi pomembni pri razgradnji zunajceličnega matriksa in razvoju sklepnih obolenj.



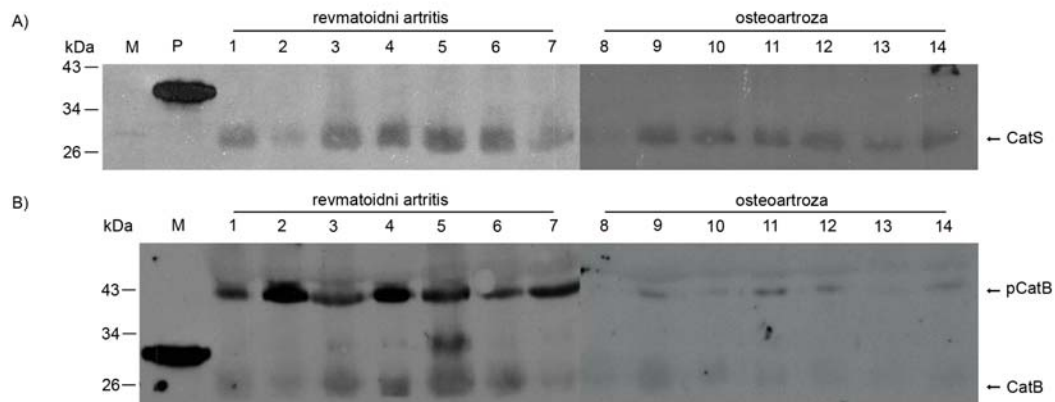
Slika 16: Aktivnosti izbranih metaloproteaz zunajceličnega matriksa (MMP) na različne sintetične fluorogene substrata v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA (bela barva) ali OA (siva barva). Slika prikazuje minimalno in maksimalno vrednost ter kvartile za posamezno skupino meritev, pri čemer horizontalna črta predstavlja mediano. Statistično značilna razlika je na sliki prikazana z \*\* ( $P < 0.01$ ).

### 4.3 Raven izražanja izbranih cisteinskih katepsinov in metaloproteaz zunajceličnega matriksa ter cistatina C v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine

Z meritvami proteolizne aktivnosti smo uspešno pokazali prisotnost izbranih proteaz v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov s sklepnimi obolenji, zato smo v nadaljevanju želeli preveriti tudi profil izražanja genov za te proteaze na proteinskem nivoju. V ta namen smo uporabili metodo prenosa Western, ki temelji na detekciji izbranih proteinov s specifičnimi protitelesi. Predvsem nas je zanimal nivo izražanja za katepsin S in MMP-3, ki sta imela izmerjene najvišje proteolizne aktivnosti. Dodatno pa smo želeli ovrednotiti tudi profil izražanja za katepsin B in MMP-1, za katera je bilo že pokazano, da sta prisotna v vzorcih sinovijske tekočine [111, 146], kot tudi za cistatin C, ki je glavni predstavnik zunajceličnih inhibitorjev cisteinskih proteaz katepsinov [14].

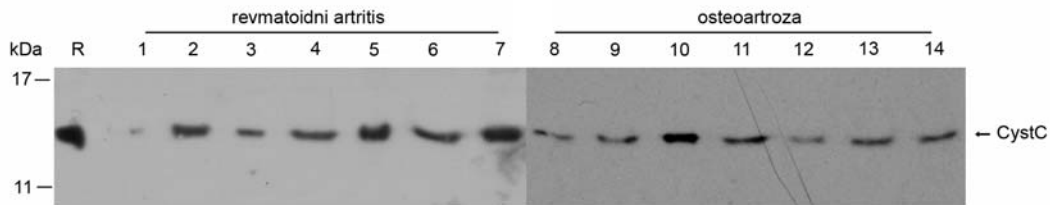
#### 4.3.1 Raven izražanja cisteinskih katepsinov B in S ter cistatina C v vzorcih sinovijske tekočine

Iz slike 17 je razvidno, da smo v vzorcih sinovijske tekočine pri bolnikih z RA in OA zaznali zrelo obliko katepsina S (slika 17A), ki ji ustrezajo lise velikosti ~ 28 kDa. Prooblake katepsina S pa v vzorcih nismo zaznali. Primerjava intezitet lis med RA in OA pokaže, da je več katepsina S prisotnega pri bolnikih z RA, kar je tudi v skladu z merjenimi proteoliznimi aktivnostmi. Zanimivi rezultati pa so bili opaženi za katepsin B (slika 17B). Pri bolnikih z RA smo opazili močan signal za prokatepsin B (~ 45 kDa), medtem ko je bil signal za zrelo obliko v velikosti ~ 26 kDa (težka veriga) zelo šibek. V nasprotju s temi rezultati pa pri bolnikih z OA nismo zaznali signala za zrelo obliko, medtem ko je bil prokatepsin B viden samo v posameznih primerih, pa še ta signal je bil zelo šibek. Tudi v primeru katepsina B se je pokazalo, da so rezultati dobljeni s pomočjo imunodetekcije, skladni z meritvami proteolizne aktivnosti, kjer smo pri bolnikih z RA dobili nizko aktivnost, medtem ko pa pri bolnikih z OA aktivnosti skorajda ni bilo zaznati.



Slika 17: Western analiza izražanja proteinov za katepsina B in S v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA ali OA. Zrela oblika rekombinantnega katepsina B (CatB) ali S (CatS) je označena z M, prooblika katepsina B (pCatB) pa s P.

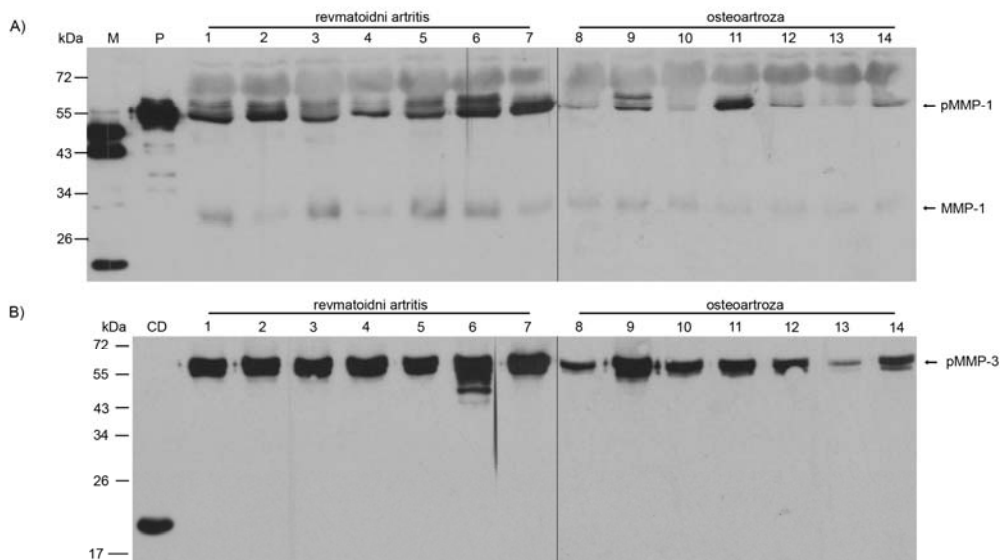
Ker lahko na aktivnost cisteinskih katepsinov vplivajo tudi zunajcelični endogeni inhibitorji, smo v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine preverili izražanje cistatina C, ki je eden glavnih predstavnikov te skupine inhibitorjev. Cistatin C smo zaznali v vseh kliničnih vzorcih, tako pri bolnikih z RA kot tudi z OA, vendar med njimi ni bilo opažene razlike (slika 18).



Slika 18: Western analiza izražanja proteina za cistatin C v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA in OA. Rekombinantno izražen cistatin C (CystC) je označen z R.

#### 4.3.2 Raven izražanja proteinov MMP-1 in MMP-3 v vzorcih sinovijske tekočine

V nadaljevanju smo v kliničnih vzorcih preverili tudi raven izražanja proteinov za izbrane metaloproteaze zunajceličnega matriksa. Kljub temu, da proteolizne aktivnosti za MMP-1 nismo zaznali, smo s pomočjo imunodetekcije (slika 19A) dokazali prisotnost prekursorske oblike MMP-1 pri ~ 54 kDa. Primerjava signalov za prekursorsko obliko MMP-1 pokaže, da je le-ta šibkejši v primeru bolnikov z OA. Proteinske lise, ki se pojavijo pri velikosti ~27 kDa verjetno predstavljajo razgradne produkte prooblike MMP-1. Meritve proteolizne aktivnosti so pokazale, da ima izmed izbranih metaloproteaz zunajceličnega matriksa MMP-3 najvišjo aktivnost, zato smo pričakovali tudi visok nivo izražanja tega proteina, vsaj pri bolnikih z RA. Kot kaže slika 19B, smo uspeli zaznati močan signal samo za pro-obliko MMP-3 pri ~ 54 kDa pri vseh bolnikih, medtem ko zrele oblike nismo opazili.



Slika 19: Western analiza izražanja proteinov za MMP-1 in MMP-3 v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA in OA. Zrela oblika rekombinantne MMP-1 je označena z M, prekursorska oblika pa s P. Pri MMP-3 je kontrola označena s CD, ki predstavlja rekombinantno katalitsko domeno tega encima.

### 4.3.3 Določitev vsebnosti izbranih provnetnih citokinov in katepsina S v vzorcih sinovijske tekočine

Glede na to, da sklepna obolenja delimo na vnetna (mednje sodi RA) in degenerativna (OA) obolenja smo v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine določili tudi koncentracijo provnetnih citokinov. Med provnetnimi citokini smo izbrali glavna predstavnika IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$ , ki sta odgovorna za nastanek vnetnega procesa pri RA, ter IL-6. Podatki o dobljenih rezultatih so zbrani v tabeli 9. Uporabili smo direktni ELISA test za izbrane antigene v vzorcih sinovijske tekočine bolnikov obolelih z RA ali OA (glej poglavje 3.2.5.4.2).

Uspešno smo določili koncentracijo katepsina S pri vseh bolnikih z RA in OA, vendar med obolenjima ni bilo statistično značilne razlike ( $P = 0.41$ ). Tako je znašala povprečna koncentracija katepsina S pri bolnikih z RA 64.7 ng/ml in pri bolnikih z OA 43.8 ng/ml. Prav tako smo pri vseh bolnikih določili koncentracijo proteina IL-6 s statistično značilno razliko pri bolnikih z RA ( $P = 0.00524$ ). Tako je znašala povprečna koncentracija proteina 16.7 ng/ml pri bolnikih z RA ter 2.0 ng/ml pri bolnikih z OA. V nasprotju s temi rezultati pa smo IL-1 $\beta$ , kot enega glavnih provnetnih citokinov, uspešno določili samo pri enem bolniku z RA s koncentracijo 23.3 ng/ml. To je bil bolnik, ki je zavrnil predhodno predpisano terapijo. V primeru TNF- $\alpha$  smo koncentracijo določili samo pri štirih bolnikih z RA, s povprečno koncentracijo 27.6 pg/ml, vendar pa nadaljnje statistične analize nismo uspeli narediti zaradi prenizkega števila pozitivnih rezultatov.

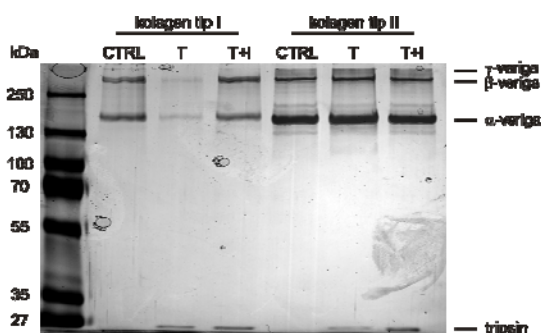
Tabela 9: Povprečne koncentracije proteinov katepsina S, IL-6, IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$  v kliničnih vzorcih sinovialne tekočine. Rezultati so podani kot povprečna vrednost. Statistično značilna razlika je prikazana z \*\* ( $P < 0.01$ ); n.d. – nezaznavno; # določen samo pri enem bolniku z RA.

	bolniki z RA		bolniki z OA	
	koncentracija	območje	koncentracija	območje
CatS	64.7 ng/ml	(23.6 – 160.6) ng/ml	43.8 ng/ml	(4.2 – 93.1) ng/ml
IL-6	16.7 ng/ml **	(2.54 – 94.9) ng/ml	2.0 ng/ml	(0 – 10.1) ng/ml
TNF- $\alpha$	27.6 pg/ml	(11.0 – 54.8) pg/ml	n.d.	-
IL-1 $\beta$	23.3 ng/ml #	-	n.d.	-

#### 4.4 Študij *in vitro* razgradnje/procesiranja citruliniranih in necitruliniranih modelnih proteinov z izbranimi cisteinskimi proteazami ter metaloproteazami zunajceličnega matriksa

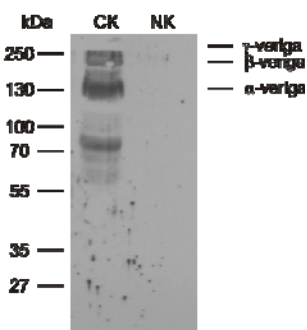
Kolagen tipa I in tipa II predstavljata modelna proteina za študijo vpliva citrulinacije na *in vitro* razgradnjo/procesiranje z izbranimi cisteinskimi proteazami ter metaloproteazami zunajceličnega matriksa. Ker se predvideva, da lahko proteaze hitreje razgradijo citrulinirane proteine kot pa njihove necitrulinirane analoge, smo to želeli preveriti z *in vitro* razgradnjo/procesiranjem modelnih proteinov z rekombinantnimi cisteinskimi katepsini B, K in S ter metaloproteazama zunajceličnega matriksa-1 in -3.

V začetku smo najprej optimizirali *in vitro* reakcijo citrulinacije s pomočjo encima PAD2 (glej 3.2.5) za oba izbrana modelna proteina pri 37 °C. Pri tem velja omeniti, da bi se naj fibrilarni kolageni, torej tudi kolagen tipa I in tipa II, pri temperaturi 37 °C v *in vitro* pogojih denaturirali in prešli v želatino. Želatina je tako tudi bolj dovzetna za razgradnjo s proteazami, kot pa nativne oblike fibrilarnih kolagenov [147, 148]. Nativno obliko fibrilarnih kolagenov tipa I in tipa II tako cepijo samo kolagenaze ter še nekatere druge serinske in cisteinske proteaze. V ta namen smo tudi pri naših modelnih proteinih preverili obliko fibrilarnih kolagenov pri 37 °C. Pri tem smo uporabili tripsin, ki je serinska proteaza in lahko razgradi samo želatino. Iz slike 20 je razvidno, da je kolagen tipa I prešel pri tej temperaturi v želatino, saj ga je tripsin razgradil. V nasprotju se v primeru kolagena tipa II nativna oblika pri 37 °C ohrani saj razgradnje s tripsinom nismo opazili.

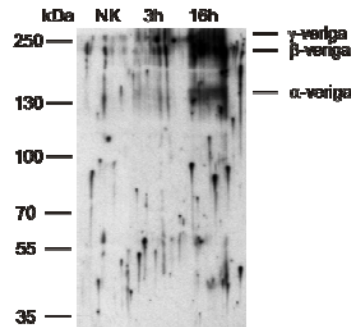


Slika 20: Razgradnja kolagenov tipa I in tipa II s tripsinom pri 37 °C (CTRL – kolagen tipa I ali tipa II; T – kolagen tipa I ali tipa II z dodanim tripsinom; T+I - kolagen tipa I ali tipa II z dodanim tripsinom in inhibitorjem serinskih proteaz AEBSF).

Uspešnost *in vitro* posttranslacijske modifikacije modelnih proteinov pod izbranimi eksperimentalnimi pogoji smo preverili tudi z uporabo protiteles proti citruliniranim peptidom. Želatino kolagena tipa I smo uspešno citrulinirali pri izbrani temperaturi, kar je razvidno iz slike 21. V nasprotju nativne oblike kolagena tipa II nismo uspeli citrulinirati pri teh pogojih. Citrulinacija je bila uspešna šele, ko smo kolagen tipa II inkubirali dve uri pri 55 °C, pri čemer smo nativno obliko denaturirali (želatina), in ko smo podaljšali čas posttranslacijske modifikacije na 16 ur (slika 22).



Slika 21: Western analiza citrulinacije želatine kolagena tipa I pri 37 °C. Nativna oblika kolagena tipa I je označena z NK, citrulinirana oblika pa s CK.



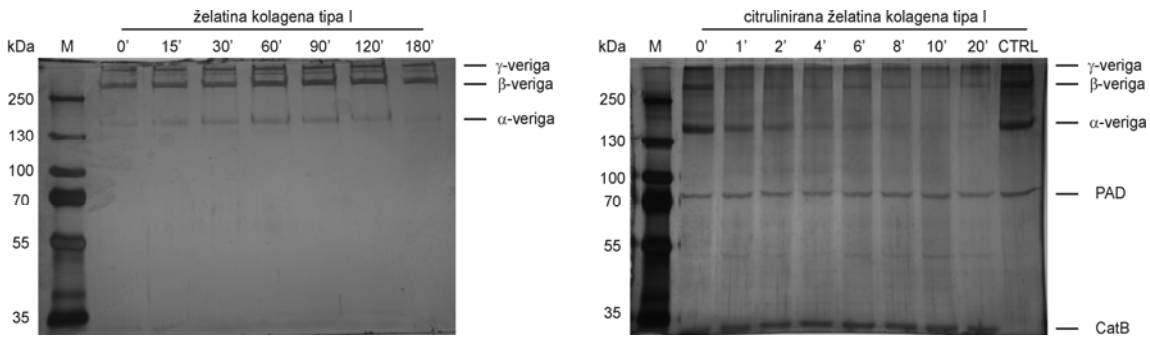
Slika 22: *Western analiza citrulinacije želatine kolagena tipa II pri 37 °C. Nativna oblika kolagena je označena z NK.*

#### 4.4.1 Razgradnja/procesiranje citrulinirane in necitrulinirane želatine kolagena tipa I s cisteinskimi katepsini B, K in S ter metaloproteazama zunajceličnega matriksa-1 in -3

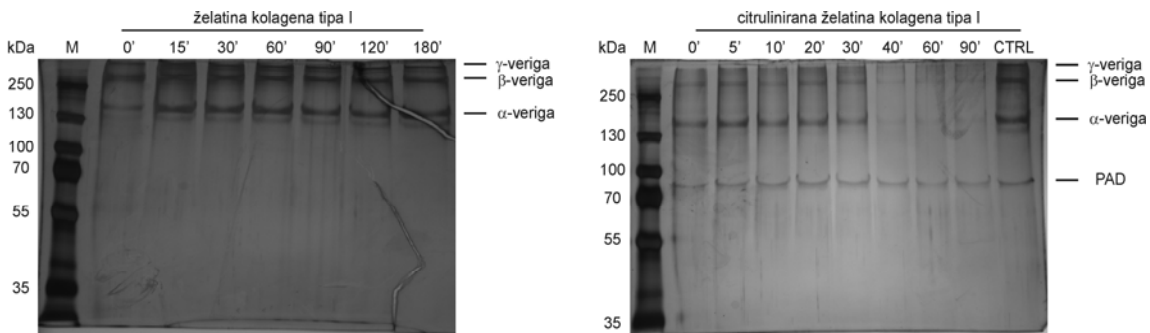
Pri proučevanju razgradnje oziroma procesiranja z rekombinantnimi cisteinskimi katepsini B, K in S ter metaloproteazama zunajceličnega matriksa-1 in -3 smo najprej optimizirali masna razmerja za posamezno reakcijsko mešanico. Sledil je časovni potek razgradnje oziroma procesiranja modelnih proteinov z izbranimi proteazami.

Tako v primeru želatine kolagena tipa I nismo opazili nobenih bistvenih razlik pri cepitvi oziroma procesiranju z izbranimi cisteinskimi katepsini (slika 23 za katepsin B, slika 24 za katepsin K in slika 25 za katepsin S). Po treh urah razgradnje so bile še vedno prisotne vse proteinske lise, ki so enake kontrolnim lisam ob začetnem času.

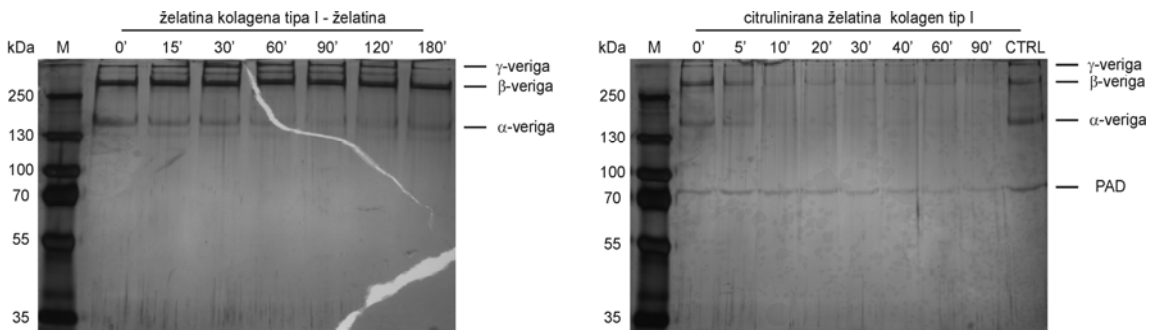
V primeru citrulinirane oblike želatine kolagena tipa I je bila razgradnja s cisteinskimi katepsini B, K in S učinkovitejša. Prav tako smo opazili spremembe med časom in posameznimi razgradnimi produkti med cisteinskimi katepsini in citrulinirano želatino kolagena tipa I. Tako je bila razgradnja citrulinirane želatine kolagena tipa I v primeru katepsina B (slika 23) zelo hitra. Posamezne lise ( $\alpha$ -veriga) so se pričele razgrajevati že po 2 minutah reakcije. Lisa za  $\alpha$ -verigo je po 20 minutah skoraj popolnoma izginila. Prav tako smo opazili razliko v jakosti lis tudi za  $\beta$ - in  $\gamma$ -verigo v primerjavi s kontrolo. Hitra razgradnja citrulinirane želatine kolagena tipa I je bila opažena tudi v primeru katepsina S (slika 25). Opazili smo, da  $\alpha$ -veriga prične izginjati po 5 minutah in se popolnoma razgradi po 10 minutah. V tem času se razgradita tudi preostali dve verigi. Tudi katepsin K (slika 24) je bil učinkovit pri razgrajevanju citrulinirane želatine kolagena tipa I, vendar je njegova učinkovitost nekoliko počasnejša. Razgradnjo smo opazili komaj po štiridesetih minutah reakcije. Za razliko od ostalih dveh katepsinov (B in S) smo opazili, da se razgradnja s katepsinom K prične hkrati za vse tri verige in da je po 90 minutah citrulinirana želatina kolagena tipa I že skoraj popolnoma razgrajena.



Slika 23: Prikaz *in vitro* razgradnje obeh oblik želatine kolagena tipa I s katepsinom B pri 37 °C (CatB – katepsin B; CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).

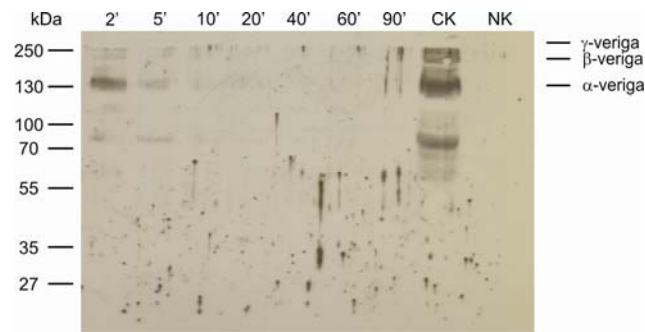


Slika 24: Prikaz *in vitro* razgradnje obeh oblik želatine kolagena tipa I s katepsinom K pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).



Slika 25: Prikaz *in vitro* razgradnje obeh oblik želatine kolagena tipa I s katepsinom S pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).

Z uporabo protiteles proti citruliniranim peptidom smo preverili tudi uspešnost razgradnje citrulinirane želatine kolagena tipa I. Na sliki 26 je tako prikazana razgradnja s katepsinom B. Podobno kot pri detekciji s koloidnim srebrom (slika 23) se je razgradnja vseh treh verig pričela pri 2 minutah. Dokončna razgradnja je bila opažena po 10 minutah reakcije. Vzorec označen z NK je želatina kolagena tipa I in je uporabljena kot kontrola, ki ne reagira s specifičnimi protitelesi proti citruliniranim peptidom. Podobni rezultati so bili opaženi tudi pri katepsinu K in S, vendar slike niso pokazane.

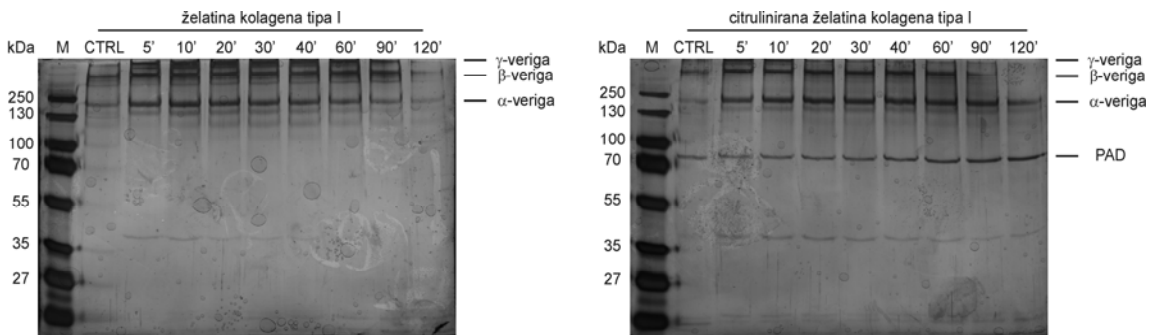


Slika 26: Prikaz razgradnje citrulinirane želatine kolagena tipa I s katepsinom B z uporabo protiteles proti citruliniranim peptidom (CK – citrulinirana želatina kolagena tipa I; NK - želatina kolagena tipa I).

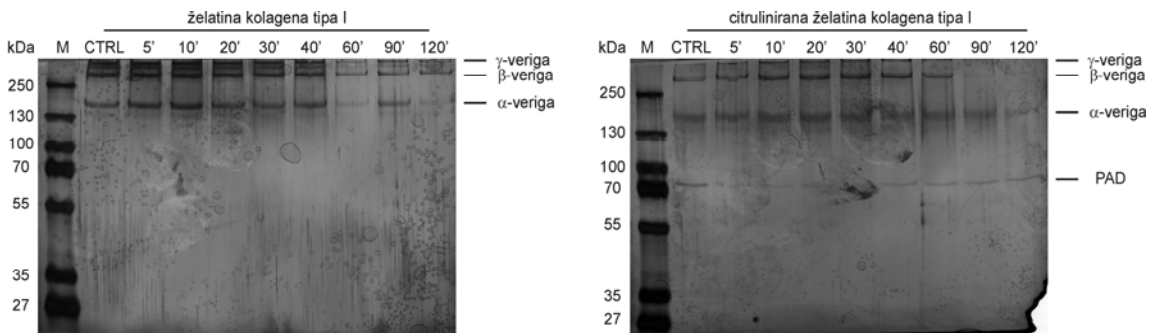
Metaloproteaze zunajceličnega matriksa imajo ključno vlogo pri homeostazi zunajceličnega matriksa, zato smo želeli ugotoviti ali lahko citrulinacija vpliva na njihovo sposobnost razgradnje oziroma procesiranja modelnih proteinov, ki predstavljajo osnovne gradnike sklepnega hrustanca in kostnine.

V primeru cepitve želatine kolagena tipa I z MMP-1 (slika 27) smo po 5 minutah reakcije opazili dodatno liso tik pod  $\alpha$ -verigo. Po 10 minutah so se pojavile še dodatne lise, ki so bile opazne tudi še po uri in pol reakcije. Delno razgradnjo vseh treh verig želatine kolagena tipa I smo opazili šele po dveh urah reakcije. Pri citrulinirani želatini kolagena tipa I smo prav tako opazili dodatno liso tik pod  $\alpha$ -verigo, vendar dodatnih cepitvenih produktov nismo zaznali. Tudi pri citrulinirani obliki želatine kolagena tipa I smo razgradnjo vseh treh verig opazili šele po dveh urah reakcije.

Rezultati razgradnje želatine kolagena tipa I z MMP-3 niso pokazali bistvenih razlik med obema oblikama (slika 28). Pri obeh oblikah želatine se je po eni uri reakcije pričela razgradnja vseh treh verig, ki pa v primeru citrulinirane oblike želatine kolagena tipa I skoraj popolnoma izginejo po dveh urah reakcije.



Slika 27: Prikaz *in vitro* razgradnje/procesiranja obeh oblik želatine kolagena tipa I z MMP-1 pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).

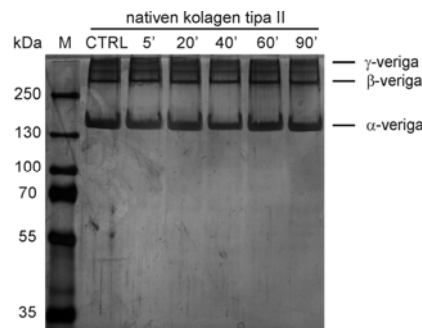


Slika 28: Prikaz *in vitro* razgradnje/procesiranja obeh oblik želatine kolagena tipa I z MMP-3 pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).

#### 4.4.2 Razgradnja/procesiranje nativne oblike kolagena tipa II s cisteinskimi katepsini B, K in S ter metaloproteazama zunajceličnega matriksa-1 in -3

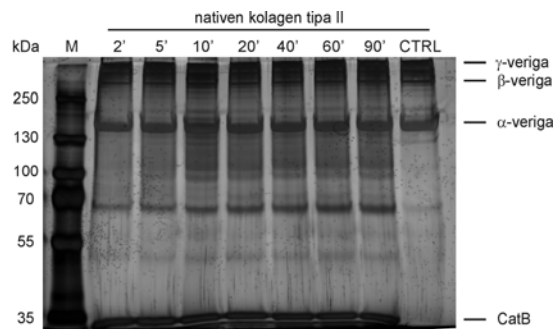
V nadaljevanju smo želeli preveriti tudi razgradnjo oziroma procesiranje nativne oblike kolagena tipa II s cisteinskimi katepsini B, K in S ter metaloproteazama zunajceličnega matriksa-1 in -3 v istem časovnem intervalu, kot je bilo to narejeno pri želatini kolagena tipa I.

V primeru izbranih cisteinskih katepsinov nismo opazili razgradnje (slika 29; prikazana je samo slika z razgradnjo s katepsinom S), zato smo v reakcijsko mešanico dodali glikozaminoglikan hondroitin sulfat A s končno delovno koncentracijo 1.5 mg/ml. Glikozaminoglikani se vežejo na tarčne proteine večinoma preko elektrostatskih interakcij [17]. Tako lahko pozitivno nabiti aminokislinski preostanki na površini ali v aktivnem mestu posameznega proteina omogočijo elektrostatsko interakcijo z negativno nabitim hondroitin sulfatom A. V primeru katepsina K se na nasprotni strani katalitskega mesta nahaja precej argininskih in lizinskih aminokislinskih preostankov, ki tako omogočajo tvorbo nastanka kompleksa med katepsinom K in hondroitin sulfatom A. To posledično vpliva na kolagenolitično sposobnost katepsina K, medtem ko tega pojava niso opazili pri katepsinu L [149, 150].

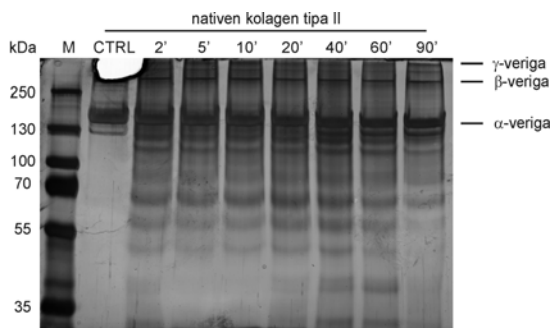


Slika 29: Prikaz *in vitro* razgradnje nativne oblike kolagena tipa II s katepsinom S pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).

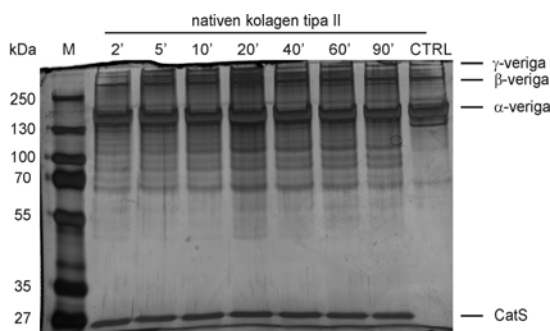
Rezultati razgradnje oziroma procesiranja nativne oblike kolagena tipa II s cisteinskimi katepsini B, K in S v prisotnosti hondroitin sulfata A so drugačni kot pri obeh oblikah želatine kolagena tipa I. Pri vseh izbranih cisteinskih katepsinih je prišlo do procesiranja nativne oblike kolagena tipa II in ne do razgradnje. V primeru procesiranja s katepsinom B sta se po dveh minutah pojavili lisi pri približno 70 in 50 kDa (slika 30), ki jih pri kontrolnem vzorcu nismo opazili. Podobno smo opazili tudi v primeru procesiranja nativne oblike kolagena tipa II s katepsinom K (slika 31) in katepsinom S (slika 32). Vendar pri nobenem od obeh katepsinov nismo opazili značilnih proteinskih lis, kot je to bilo pri katepsinu B.



Slika 30: Prikaz *in vitro* procesiranja nativne oblike kolagena tipa II s katepsinom B in hondroitin sulfatom A pri 37 °C (CatB – katepsin B; CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov).

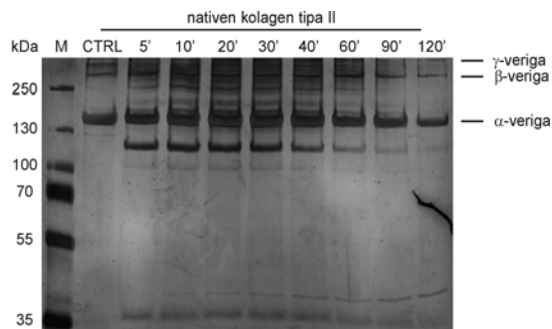


Slika 31: Prikaz *in vitro* procesiranja nativne oblike kolagena tipa II s katepsinom K in hondroitin sulfatom A pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov).

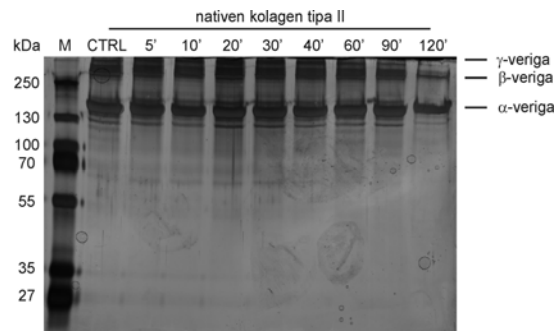


Slika 32: Prikaz *in vitro* procesiranja nativne oblike kolagena tipa II s katepsinom S in hondroitin sulfatom A pri 37 °C (CatS – katepsin S; CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov).

V primeru razgradnje/procesiranja nativne oblike kolagena tipa II z izbranimi metaloproteazama zunajceličnega matriksa se dobljeni rezultati prav tako razlikujejo od tistih, ki smo jih dobili z izbranimi cisteinskimi proteazami. Tako se je pri razgradnji nativnega kolagena tipa II z MMP-1 po petih minutah reakcije pojavila dodatna lisa pod  $\alpha$ -verigo kolagena tipa II (slika 33). Vendar intenziteta lise pada s časovnim potekom in skoraj popolnoma izgine po dveh urah razgradnje. Pri razgradnji nativne oblike kolagena tipa II z MMP-3 pa nismo opazili ne razgradnje in ne procesiranja (slika 34).



Slika 33: Prikaz *in vitro* razgradnje nativnega kolagena tipa II z MMP-1 pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov).



Slika 34: Prikaz *in vitro* razgradnje nativnega kolagena tipa II z MMP-3 pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov).

## 5 Razprava

Razprava je razdeljena na dva dela. Prvi govori o profilu izražanja in aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov in metaloproteaz zunajceličnega matriksa v vzorcih sinovialne tekočine bolnikov z RA in OA, drugi del razprave pa je osredotočen na vpliv citrulinacije na *in vitro* razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa z izbranimi cisteinskimi in metaloproteazami.

### 5.1 Profil izražanja in aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov in metaloproteaz zunajceličnega matriksa v vzorcih sinovialne tekočine bolnikov z revmatoidnim artritisom in osteoartrozo

Lizosomske cisteinske proteaze ali katepsini s svojo proteolizno aktivnostjo pomembno, če ne že ključno, vplivajo na homeostazo pri vseh živih organizmih. Dolgo časa je veljalo, da so lizosomske cisteinske proteaze odgovorne samo za nespecifično razgradnjo proteinov v lizosomih [151], vendar so številne raziskave pokazale, da imajo lahko cisteinski katepsini specifične substrate, ki jih lahko cepijo zelo selektivno [13], in da sodelujejo pri številnih fizioloških procesih. Zaradi tega mora biti proteolizna aktivnost cisteinskih katepsinov strogo nadzorovana, da se prepreči prekomerna in neželjena razgradnja proteinov. Pomanjkanje biološkega nadzora mehanizmov proteolizne aktivnosti cisteinskih proteaz lahko privede do številnih bolezni, kot so rak, vnetni procesi, revmatoidni artritis in osteoartraza, Alzheimerjeva bolezen, multipla skleroza, mišična distrofija, idr. Pri večini omenjenih bolezni se lizosomske cisteinske proteaze nahajajo v zunajceličnem okolju oziroma v okolju izven lizosomov v bolj stabilnih proencimskih oblikah. Ta prisotnost v zunajceličnem prostoru je lahko posledica večje prepustnosti lizosomov zaradi poškodbe, razgradnje ali pa so posledica alternativnih oblik transporta lizosomskih proteaz [14].

V razvitem svetu več kot 15 % prebivalstva, starejšega od 18 let, prizadanejo različna sklepna obolenja, med katerimi sta najbolj pogosti RA in OA. Glavna značilnost obeh obolenj je razgradnja sklepnega hrustanca in s tem tudi razgradnja zunajceličnega matriksa. Celice, ki izločajo proteaze in so najpogosteje udeležene pri razgradnji sklepnega hrustanca ter posledično tudi samega sklepa, so pri RA sinovijski fibroblasti, hondrociti ter osteoklasti. Razgradnja sklepa in ob sklepnih delov pri OA pa je povezana s hondrociti [36]. Vedno več pa je tudi dokazov, da so metaloproteaze zunajceličnega matriksa in lizosomski cisteinski katepsini s svojo kolagenolitično in proteoglikanolitično aktivnostjo ključne proteaze, ki so udeležene v razgradnji zunajceličnega matriksa [126]. Prav te proteaze predstavljajo primerne diagnostične tarče ter zato predstavljajo eno najbolj perspektivnih področij raziskav usmerjenih v razumevanje sklepnih obolenj ter načrtovanje novih terapevtikov za njihovo zdravljenje. Tako so bile nekatere med njimi že potrjene kot primerne tarče za razvoj novih zdravil tako pri RA kot pri OA [82, 152].

V doktorskem delu smo proučevali profil izražanja in aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov in metaloproteaz zunajceličnega matriksa v vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA in OA. Želeli smo pokazati, da imajo lahko tudi izbrani cisteinski katepsini specifično vlogo v procesih, ki vplivajo na razvoj sklepnih obolenj. Tako smo pokazali, da imajo cisteinska katepsina B in S ter metaloproteaze zunajceličnega matriksa MMP-1, -3 in -13, različno raven izražanja in aktivnosti v vzorcih sinovijske tekočine pri bolnikih z RA in OA. Vsi bolniki, ki so bili vključeni v študijo, so bili v pozni fazi obolenja, ki so vključevala klinične znake značilne za RA ali OA. Višji nivo izražanja in prav tako višje proteolizne aktivnosti vseh izbranih proteaz so bile opažene pri bolnikih z RA v primerjavi z rezultati pri bolnikih z OA. Vzrok za takšne rezultate lahko pripišemo povišanemu vnetnemu odzivu pri bolnikih z RA, ki ključno vpliva na napredovanje obolenja, medtem ko pri bolnikih z OA, ki je v osnovi degenerativno obolenje, opazimo le minimalen vneten odziv. Znano je, da so cisteinski katepsini, predvsem katepsin S, ključni pri posredovanju signalov imuskega odziva MHC razreda II, ki ima pomembno vlogo pri razvoju RA. Povišane proteolizne aktivnosti cisteinskih katepsinov so tako v skladu z že objavljenimi rezultati na

živalskem modelu s kolagenom inducirane artritisa [43]. Na delovanje proteaz pa lahko vpliva tudi protivnetna terapija in sicer tako, da zniža njihovo raven izražanja na proteinskem nivoju ter posledično tudi proteolizno aktivnost, predvsem pri bolnikih z RA. Takšno teorijo podpirajo izvidi vzorcev sinovijske tekočine pri bolniku z RA, ki je zavračal uteženo zdravljenje bolezni. Pokazalo se je, da so bile aktivnosti vseh cisteinskih katepsinov pri tem bolniku zelo povišane, približno 10-kratno, v primerjavi z aktivnostmi cisteinskih proteaz preostalih bolnikov, ki so prejeli različne vrste temeljne in protivnetne terapije in s tem si tudi olajšali simptome obolenja (tabela 5). Takšnih rezultatov nismo opazili za proteolizno aktivnost izbranih metaloproteaz, kar nakazuje pomembnejšo vlogo cisteinskih katepsinov pri RA. Pri bolnikih obolelih z OA pa bistvenih razlik proteolizne aktivnosti zaradi uporabljene terapije nismo opazili, kar je v skladu s patogenezo od bolezni.

Pomembno vlogo cisteinskih katepsinov pri razvoju RA in OA so pokazali tudi s študijo na mišjem modelu eksperimentalnega vnetnega artritisa, kjer so z uporabo selektivnih inhibitorjev cisteinskih katepsinov (peptidilfluorometil ketonov) zmanjšali aktivnost teh proteaz in s tem resnost obolenja [153]. V skladu s temi rezultati so tudi rezultati študije mišjega modela artritisa [154], kjer so na nivoju izražanja cisteinskih katepsinov in njihove aktivnosti prav tako pokazali, da lahko katepsini pomembno vplivajo na razvoj sklepnih obolenj. Med vsemi cisteinskimi katepsini je tako katepsin S pokazal najbolj pomembno vlogo, saj smo v vzorcih sinovijske tekočine bolnikov obolelih z RA in OA (slika 15) določili, da gre večino katepsinske aktivnosti pripisati prav katepsinu S. Primerjava proteolizne aktivnosti za katepsin S med obema skupinama obolenj pokaže statistično značilno razliko pri bolnikih z RA. Podobno opazimo tudi pri Western analizi izražanja katepsina S (slika 17A), kjer smo zaznali samo zrelo obliko, ki ji ustrezajo lise v velikosti ~ 28 kDa. Primerjava intenzitet lis med RA in OA pokaže, da je več katepsina S prisotnega pri bolnikih z RA, medtem ko prekursorske oblike proteina v vzorcih nismo zaznali. Opažanja se ujemajo z rezultati dobljenih na miših z izbitim genom za katepsin S, kjer se je pokazalo, da imajo miši zmanjšane simptome s kolagenom inducirane artritisa in oslABLJENO sposobnost procesiranja invariantne verige tako v dendritičnih celicah kot tudi v limfocitih B [43]. Vsi ti rezultati nakazujejo pomembno vlogo katepsina S pri posredovanju predstavitve antigenov v različnih imunskih celicah kot tudi to, da lahko vzdržuje vnetni odziv predvsem pri RA in v manjši meri tudi pri OA. Slednje so pokazali s študijo uporabe zlatih delcev, ki so vsebovala antirevmatike, ki so že v klinični uporabi, in so učinkovito inhibirala aktivnost katepsina S in K *in vitro* ter v celičnih modelih [155]. Po drugi strani pa ima katepsin S pomembno vlogo tudi pri razgradnji zunajceličnega matriksa, saj je stabilen in proteolizno aktiven v nevtralnem območju pH, ki je značilen za okolje zunaj celic. Tako lahko uspešno razgrajuje elastin in številne proteoglikane, ki sestavljajo zunajcelični matriks [156].

Proteolizno aktivnost katepsina B smo uspešno določili v vseh vzorcih sinovialne tekočine, vendar je bila le-ta precej nižja v primerjavi s katepsinom S (slika 15). Tudi z analizo izražanja gena za katepsin B smo pokazali, da je prisoten samo pri bolnikih z RA, večinoma v proobliki, kar nakazuje na manj pomembno vlogo pri razvoju sklepnih okvar. To se ujema z ugotovitvami študije na človeških hondrocitih bolnikov z OA [157]. Vemo pa, da se lahko prokatepsin B nadalje avtoaktivira v primernem okolju do zrele oblike [158-160]. V vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA ali OA nismo zaznali zrele oblike katepsina B, kar je v nasprotju z že objavljenimi rezultati [111, 161]. Vsekakor se ta ugotovitev ujema z našimi rezultati izmerjene proteolizne aktivnosti v vzorcih sinovijske tekočine, kjer smo z uporabo sintetičnega substrata Z-Arg-Arg-AMC, ki se uporablja za merjenje aktivnosti katepsinu B podobnih encimov, določili le minimalno aktivnost. Katepsin B je v patofizioloških stanjih pomemben predvsem zaradi njegove sposobnosti razgradnje agrekana [162], kolagena [111] ter drugih komponent zunajceličnega matriksa [163]. Zanimariti pa ne smemo tudi njegove zmožnosti aktivacije drugih proteaz, predvsem prokolagenaz in prostromelizinov, ki ključno vplivajo na homeostazo zunajceličnega matriksa, s čimer lahko katepsin B prispeva k napredovanju sklepnih obolenj [164].

Glede na prisotnost in aktivnost lizosomskih cisteinskih katepsinov v vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA in OA smo se odločili preveriti tudi raven izražanja cistatina C. Človeški cistatin C je zunajcelični endogeni inhibitor cisteinskih katepsinov B, H ter L in je prisoten v vseh telesnih tekočinah [75]. Vendar smo ga zaznali v vseh kliničnih vzorcih, vendar ne moremo potrditi njegove vloge kot aktivnega inhibitorja, saj smo v istih vzorcih prav tako določili proteolizno aktivnost cisteinskih katepsinov. Ti rezultati tako potrjujejo, da je v vzorcih sinovialne tekočine bolnikov z RA in OA povišana raven izražanja cisteinskih katepsinov.

Poleg lizosomskih cisteinskih katepsinov pa imajo pri razvoju ter napredovanju sklepnih obolenj pomembno vlogo tudi metaloproteaze zunajceličnega matriksa, med katerimi imajo pomembnejšo vlogo kolegenazi MMP-1 in MMP-13 ter stromelizin MMP-3, predvsem zaradi razgradnje različnih komponent zunajceličnega matriksa. Nivo proteolizne aktivnosti za MMP-3 je pokazal, da so bile višje aktivnosti določene v vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA v primerjavi z bolniki z OA. Predvideva se, da je

MMP-3 udeležena pri aktivaciji drugih prooblik MMP-jev, predvsem prokolagenaz v sklepem hrustancu in sinovijski membrani, ter da odsotnost tega encima močno zmanjša razgradnjo zunajceličnega matriksa, kar je bilo tudi pokazano pri različnih eksperimentalnih modelih artritisa [165, 166]. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi v primeru določitve proteolizne aktivnosti za MMP-13, saj je bil nivo aktivnosti višji pri bolnikih z RA kot pri bolnikih z OA. Tudi v tem primeru se rezultati ujemajo z že objavljenimi študijami, kjer so pokazali povišano raven izražanja MMP-13 v hondrocitih [167] in fibroblastnih sinoviocitih [168]. V nasprotju z aktivnostnima profiloma za MMP-3 in MMP-13 ter z že delno pokazano vlogo pri razgradnji zunajceličnega matriksa [164], pa v primeru MMP-1 nismo uspeli določiti proteolizne aktivnosti v vzorcih sinovijske tekočine. Smo pa po drugi strani MMP-1 v kliničnih vzorcih uspešno zaznali s pomočjo analize po Westernu, vendar samo v proobliki, kar je možen razlog, da proteolizne aktivnosti nismo določili. Vsi ti rezultati skupaj z že objavljenimi študijami nakazujejo, da metaloproteaze zunajceličnega matriksa skupaj s cisteinskimi katepsini predstavljajo pomembne dejavnike, ki prispevajo k razvoju in napredovanju sklepnih obolenj.

Primerjava profila izražanja izbranih cisteinskih katepsinov in metaloproteaz zunajceličnega matriksa v vzorcih sinovijske tekočine pokaže, da je raven izražanja višja pri bolnikih z RA kot pa pri bolnikih z OA. Verjeten razlog za določitev različne ravni izražanja teh proteaz pri obeh obolenjih je prisotnost provnetnih citokinov, kot so IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\alpha$ . Tako lahko ti citokini uravnavajo izražanje teh proteaz saj vemo, da je njihova raven izražanja močno povišana pri bolnikih z RA, ne pa pri bolnikih z OA [169]. Pomembno vlogo teh citokinov so pokazali tudi pri povišanem imunskem odzivu bolnikov z RA [107]. Tako smo uspešno določili vsebnost IL-6 v vseh vzorcih sinovijske tekočine, medtem ko sta bila IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$  v večini primerov pod mejo detekcije posameznega testa. Verjetna razlaga za takšne rezultate je, da sta IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$  udeležena pri sprožitvi imunskega odziva pri začetni fazi razvoja RA [170]. Bolniki, ki pa so bili vključeni v študijo, pa so bili vsi v pozni fazi obolenja in je verjetno IL-6 prevzel vlogo preostalih dveh provnetnih citokinov v smislu vzdrževanja aktivnosti bolezni. To potrjuje tudi statistično značilna razlika določitve koncentracije IL-6 v vzorcih sinovijske tekočine, ki je skoraj 10-kratno povišana pri bolnikih z RA v primerjavi z bolniki z OA in tako dodatno potrjuje vnetno naravo RA. Pomembno vlogo provnetnih citokinov pri napredovanju RA so pokazali tudi z uporabo različnih temeljnih in bioloških zdravil, ki med drugim delujejo tako, da preprečijo vezavo IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$  na ustrezne receptorje in tako zmanjšajo aktivnost bolezni in celo preprečijo nadaljnjo erozijo sklepnega hrustanca in kosti [108].

Analiza vzorcev sinovijske tekočine bolnikov z RA in OA je tako pokazala, da se ti dve obolenji med seboj izrazito razlikujeta tako v aktivnosti kot tudi na nivoju izražanja izbranih cisteinskih katepsinov in metaloproteaz zunajceličnega matriksa. Pomembno vlogo, predvsem pri RA, je tako pokazal katepsin S, za katerega vemo, da je močno povezan z vnetnim odzivom. Naše rezultate potrjujejo tudi številne študije o ključni vlogi katepsina S pri posredovanju signalov imunskega odziva preko predstavitve antigenov na molekulah MHC razreda II. Tako katepsin S, MMP-3 in MMP-13 skupaj z IL-6 predstavljajo ustrezne tarčne proteine pri RA kot tudi pri OA. V prihodnosti bi lahko s selektivno inhibicijo katepsina S zmanjšali odzivnost imunskega sistema pri bolnikih z RA in s tem ublažili simptome obolenja.

## 5.2 Vpliv citrulinacije na *in vitro* razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa z izbranimi cisteinskimi katepsini in metaloproteazami zunajceličnega matriksa

Večina proteinov je podvržena različnim posttranslacijskim modifikacijam. Tako se lahko z eno ali večimi reakcijami za posamezno posttranslacijsko modifikacijo spremeni večina aminokislinskih preostankov, ki sestavljajo oziroma kodirajo posamezen protein. Zaradi tega ima tako spremenjen protein prisotne redke aminokislinske preostanke, ki lahko pomembno vplivajo na strukturo ter funkcijo izbranega proteina. Citrulinacija je posttranslacijska modifikacija, kjer se ob prisotnosti encima peptidilarginin deiminaze (PAD) spremenijo argininski aminokislinski preostanki v tarčnem proteinu v citrulin. Citrulin tako predstavlja nenaravni aminokislinski preostanek v zgradbi proteina in zato lahko sproži delovanje imunskega sistema [127].

Revmatoidni artritis je avtoimunska obolenje, povezano s kroničnim vnetjem sklepov in obskernih delov [107]. Bolniki imajo tako poškodovane sklepe, ki sicer zagotavljajo stabilnost in omogočajo usklajeno gibanje. Te lastnosti sklepom zagotavlja sklepni hrustanec, ki se nahaja na sklepni površini, ter še nekateri ostali proteini, ki tvorijo zunajcelični matriks. Poleg sklepnega hrustanca sestavljajo sklep tudi druga vezivna tkiva (kost, vezi in kite) za katere se ve, da vsebujejo različne tipe kot tudi različne količine kolagenov. Tako organsko medceličnino kostnine v 90 % predstavlja kolagen tipa I. Poleg kolagena so prisotni še specifični glikoproteini ter glikozaminoglikani (hondroitin sulfat A, hondroitin sulfat C in keratan sulfat) [171]. Tudi hrustančno medceličnino sestavljajo različni tipi kolagenov, glikoproteini, proteoglikani ter voda. Večino kolagena (90 – 95 %) tvori mehansko najodpornejši kolagen tipa II, v manjših količinah pa so prisotni še kolageni tipa IX, X in XI [100].

Kolagen pa je še drugače povezan s patogenezo RA, predvsem preko avtoimunskega odziva. Zgodnje študije avtoimunosti kolagena so pokazale predvsem prisotnost avtoprotiteles kolagena tipa II in njegovih imunskih kompleksov tako v serumu kot v sinovialni tekočini bolnikov z RA [172]. Tudi kasnejše študije so potrdile vlogo kolagena tipa II pri odzivnosti limfocitov T [173] ter tvorbo avtoprotiteles proti ostalim kolagenom, ki so prisotni v hrustančni medceličnini [174]. V začetni fazi razvoja RA so avtoprotitelesa proti kolagenu tipa II v serumu bolnikov prisotna pri 70 % primerov, vendar njihova pogostost in raven upade z napredovanjem obolenja, predvsem zaradi povečane erozije kolagena tipa II v hrustancu [175, 176]. Bolniki imajo tako v serumu kot tudi v sinovijski tekočini prisotne povišane koncentracije avtoprotiteles proti različnim antigenom (kolagen tip II, agrekan, stresni proteini, glikoproteini), vendar leta niso specifična samo za to obolenje. Tako se v diagnostične namene uporabljajo veliko bolj specifična avtoprotitelesa, kot sta revmatoidni faktor (RF) in družina protiteles proti citruliniranim peptidom [138]. Številne klinične študije so tako pokazale posredne dokaze, da so protitelesa proti citruliniranim peptidom udeležena pri razvoju patofizioloških procesov pri RA [177, 178]. Prisotnost teh protiteles so dokazali pri bolnikih še pred kliničnimi znaki obolenja [179]. Modifikacija proteinov zunajceličnega matriksa s pomočjo citrulinacije tako lahko predstavlja pomemben korak pri porušenju mehanizmov, ki normalno vzdržujejo imunsko toleranco, ter tako sprožijo avtoimunski odziv [180]. Med drugim se predvideva, da je kolagen tipa II podvržen citrulinaciji v obolelih sklepih bolnikov z RA, kar posledično povzroči tvorbo avtoprotiteles proti citruliniranemu kolagenu tipa II. Tako sta lahko formacija in zatem odstranitev imunokompleksov, ki so sestavljeni iz protiteles proti citruliniranemu kolagenu II in fragmentov citruliniranega kolagena tipa II, vključeni v patogenezo RA [181].

Glavni namen drugega dela tega doktorskega dela je bil, pokazati da so citrulinirani proteini, ki sestavljajo zunajcelični matriks, bolj dovzetni za razgradnjo s proteazami, ki so udeležene pri razvoju in napredovanju RA od necitruliniranih. Po podatkih iz literature je bilo pokazano, da citrulinacija mielin bazičnega proteina (MBP) pri multipli sklerozi poruši njegovo strukturo in tako postane tudi štirikrat bolj dovzetan za razgradnjo s katepsinom D [135, 182]. Kot modelna proteina smo izbrali kolagen tipa I in tipa II, ki sta glavna gradnika kostnine in sklepnega hrustanca. Znano je, da so pod fiziološkimi pogoji fibrilarni kolageni, torej tudi oba izbrana kolagena, odporni na proteolizno razgradnjo. *In vitro* razgradnjo oziroma cepitve citruliniranih in necitruliniranih modelnih proteinov smo tako preverili z izbranimi rekombinantnimi cisteinskimi katepsini (B, K in S) ter metaloproteazama zunajceličnega matriksa -1 in -3.

*In vitro* razgradnja oziroma procesiranje citruliniranega in necitruliniranega kolagena tipa I in tipa II so potekale pri temperaturi 37 °C, ki hkrati predstavlja telesno in delovno temperaturo človeškega organizma. Pri tej temperaturi se fibrilarni kolageni v *in vitro* pogojih, torej tudi oba naša modelna proteina, denaturirajo in preidejo v želatino. Želatina je v primerjavi s fibrilarnimi oblikami nativnih kolagenov bolj dovzetna za razgradnjo s proteazami. V telesu pa so fibrilarni kolageni vpeljeni v zunajcelični matriks s pomočjo drugih proteinov (agrekana), molekul (glikozaminoglikanov) ter vode, kar naredi njihovo strukturo bolj stabilno in manj dovzetno za razgradnjo z različnimi proteazami [147, 148].

Znano je, da so cisteinski katepsini aktivno udeleženi v razgradnjo različnih gradnikov zunajceličnega matriksa [126]. Tako smo v primeru želatine kolagena tipa I pokazali, da v izbranem časovnem okvirju ne opazimo cepitve ali procesiranja z izbranimi cisteinskimi katepsini B, K in S. Ti rezultati so v skladu z že objavljenimi študijami, kjer je bilo pokazano, da izmed vseh cisteinskih katepsinov lahko le katepsin K cepi trojno vijačnico kolagena tipa I in sicer na večjih mestih znotraj te regije, vendar le ob prisotnosti hondroitin sulfata A [119]. Preostali cisteinski katepsini cepijo samo regije, ki se nahajajo na koncu kolagenske vijačnice (telopeptide) [37]. Vendar pa so vsi trije izbrani cisteinski katepsini uspešno razgradili citrulinirano obliko želatine kolagena tipa I. Tako se je med izbranimi cisteinskimi katepsini za najbolj učinkovitega pri tej razgradnji pokazal katepsin B, za katerega je bilo že pokazano, da cepi sintetični fluorogeni substrat Cbz-Xaa-Arg-NH-Mec (pri čemer je Xaa arginin ali citrulin) 7 – 8 krat bolj učinkovito za citrulinom kot za argininom [183]. Katepsina B in S sta začela z razgradnjo  $\alpha$ -verige trojne vijačnice in šele nato preostali dve verigi kolagena tipa I. Kljub temu, da je katepsin K edini izmed cisteinskih katepsinov, ki lahko razgradi trojno vijačnico nativnega kolagena tipa I, je v primeru citruliniranega analoga deloval najpočasnejše, vendar pa se je razgradnja vseh treh verig začela hkrati. Ti rezultati so tako skladni z opažanji drugih študij, kjer je bilo pokazano, da ima katepsin K kot kolagenaza drugačen način delovanja od preostalih cisteinskih katepsinov, ki se kaže tudi v primeru citrulinirane želatine kolagena tipa I.

Rezultati cepitev oziroma procesiranja kolagena tipa II se precej razlikujejo v primerjavi z rezultati pri želatini kolagena tipa I. Pri izbranih eksperimentalnih pogojih nismo bili uspešni z *in vitro* reakcijo citrulinacije pri 37 °C. Oba fibrilarna kolagena sta sestavljena iz trojne vijačnice. Trojno vijačnico kolagena tipa I tako sestavljata dve  $\alpha 1$  in ena  $\alpha 2$  verige, medtem ko strukturo trojne vijačnice kolagena tipa II določajo tri identične verige. Tako lahko tudi ta razlika v sestavi trojne vijačnice kolagena tipa I in tipa II razlog za različno uspešnost posttranslacijske modifikacije, saj je bilo pokazano, da lahko oblika sekundarne strukture proteinov pomembno vpliva na uspešnost citrulinacije [137]. Neuspešnost citrulinacije pri uporabljenih eksperimentalnih pogojih smo tudi potrdili z metodo prenosa Western tako tudi potrdili. Citrulinacija pa je bila uspešna, ko pa smo nativno obliko kolagena tipa II pred citrulinacijo dve uri inkubirali pri temperaturi 55 °C in tako dobili želatino kolagena tipa II, hkrati pa smo morali podaljšati tudi čas reakcije na 16 ur pri 37 °C. Pokazali pa smo tudi to, da se nativna oblika kolagena tipa II pri 37 °C v *in vitro* pogojih ohrani, kar še dodatno otežuje posttranslacijsko modifikacijo.

Tako v primeru nativne oblike kolagena tipa II nismo opazili nobene razgradnje ali procesiranja z izbranimi cisteinskimi proteazami pri uporabljenih eksperimentalnih pogojih (slika 29). Zato smo se odločili, da v reakcijsko mešanico dodamo glikozaminoglikan hondroitin sulfat A, z namenom, da pospešimo reakcije razgradnje oziroma procesiranja. Vemo, da se lahko glikozaminoglikani vežejo na tarčne proteine preko elektrostatskih interakcij [17] in da se s pomočjo cisteinskih katepsinov izločajo kot peptidil glikozaminoglikani iz proteoglikanov, ki so eni izmed osnovnih gradnikov zunajceličnega matriksa. Tako lahko pozitivno nabiti aminokislinski preostanki na površini ali v bližini aktivnega mesta tarčnega proteina omogočijo elektrostatske interakcije z negativno nabitimi glikozaminoglikani (npr. hondroitin sulfat A) [149]. Dobljeni rezultati so pokazali, da izbrani cisteinski katepsini ob prisotnosti hondroitin sulfata A sicer procesirajo nativno obliko kolagena tipa II, vendar je niso razgradili. Prav tako med posameznimi cisteinskimi katepsini ni bilo opaženih bistvenih razlik.

Celice, ki sestavljajo in so potrebne za integriteto zunajceličnega matriksa (hondrociti, osteoklasti, sinovijski fibroblasti), vplivajo na raven izražanja metaloproteaz zunajceličnega matriksa, predvsem iz skupine kolagenaz in stromelizinov, tako v fizioloških kot tudi patoloških procesih. Kolagenaze (MMP-1, MMP-8 in MMP-13) so sposobne razgraditi kolagen tipa I in tipa II tako, da tvorijo značilne  $\frac{1}{4}$  in  $\frac{3}{4}$  fragmente. Stromelizini (MMP-3, MMP-10 in MMP-11) pa so udeleženi v aktivacijo prokolagenaz kot tudi v razgradnjo ostalih gradnikov zunajceličnega matriksa [117, 184].

Razgradnje oziroma procesiranja želatine kolagena tipa I in nativne oblike kolagena tipa II z MMP-1 niso pokazale bistvenih razlik. Tako smo v vseh primerih opazili procesiranje in delna razgradnja  $\gamma$ -verige po dveh urah, vendar popolne razgradnje kolagenov nismo opazili. Ti rezultati sicer niso v skladu s

kolagenazno aktivnostjo MMP-1 [184], vendar to razložimo s spremenjenimi cepitvenimi pogoji. Po podatkih iz literature cepitvene reakcije potekajo 24 ur [184], v našem primeru pa so potekale največ dve uri, zaradi primerjave rezultatov s cisteinskimi katepsini.

Ker se je izkazalo, da ima citrulinacija pozitiven vpliv na razgradnjo želatine kolagena tipa I z izbranimi cisteinskimi katepsini, ki v večini nimajo kolagenazne aktivnosti, smo v nadaljevanju uporabili še MMP-3 ali stromelizin-1, ki prav tako nima znane kolagenazne aktivnosti. Lahko pa razgrajuje ostale gradnike zunajceličnega matriksa, predvsem agrekan, in ima pomembno vlogo pri aktivaciji prokolagenaz [93]. Vendar tudi rezultati razgradnje oziroma procesiranja z MMP-3 niso pokazali bistvenih razlik med obema oblikama želatine kolagena tipa I. Prav tako pa ni prišlo do razgradnje ali procesiranja native oblike kolagena tipa II. Glede na daljši reakcijski čas kolagenaz, ki je potreben, da razgradijo fibrilarne kolagene, bi bilo mogoče tudi v primeru razgradnje oziroma procesiranja z MMP-3 smiselno podaljšati reakcijske čase.

Za vse izbrane cisteinske proteaze in metaloproteaze zunajceličnega matriksa je bilo pokazano, da vplivajo na razvoj in napredovanje RA preko razgradnje osnovnih gradnikov zunajceličnega matriksa. Na osnovi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da citrulinacija pomembno vpliva na sposobnost in dovzetnost razgradnje proteinov zunajceličnega matriksa z izbranimi cisteinskimi katepsini B, K in S v primerjavi z metaloproteazama zunajceličnega matriksa -1 in -3. Pri tem se je pokazalo, da ima ključno vlogo pri tem tudi struktura tarčnega proteina ter intramolekularne interakcije, saj se lahko s citrulinacijo spremeni tudi funkcija proteina.

## 6 Zaključki

V tem doktorskem delu smo pokazali, da cisteinske proteaze (katepsini) in metaloproteaze zunajceličnega matriksa s svojo proteolizno aktivnostjo pomembno vplivajo na razvoj različnih sklepnih obolenj, kot sta revmatoidni artritis in osteoartritoza, predvsem preko razgradnje zunajceličnega matriksa, ki sestavlja sklepnih hrustanec in kostnino.

- V vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA in OA smo pokazali, da imajo cisteinska katepsina B in S ter metaloproteaze zunajceličnega matriksa-1, -3 in 13 različno raven izražanja ter različno proteolizno aktivnost.
- Raven izražanja in proteolizne aktivnosti izbranih cisteinskih proteaz in metaloproteaz zunajceličnega matriksa so bile višje pri bolnikih z RA v primerjavi z bolniki z OA.
- Med izbranimi cisteinskimi katepsini je katepsin S pokazal najbolj izrazito vlogo, saj je v vzorcih sinovijske tekočine edini prisoten v zreli encimski obliki in ima tudi izmerjeno najvišjo proteolizno aktivnost.
- Med izbranimi metaloproteazami sta pomembnejšo vlogo pokazali MMP-3 in MMP-13, ki sta bili proteolizno aktivni v vzorcih sinovijske tekočine.
- Z določanjem koncentracije proinflammatoryh citokinov smo pokazali, da v poznem stadiju obolenja, predvsem pri RA, ki ima izrazito vnetno naravo, to vlogo prevzame IL-6.
- Želatino kolagena tipa I smo uspešno citrulinirali pri 37 °C, medtem ko pa nativne oblike kolagena tipa II, pod temi eksperimentalnimi pogoji, nismo citrulinirali.
- Citrulinirana oblika želatine kolagena tipa I je bolj dovzetna za razgradnjo s cisteinskimi katepsini B, K in S, medtem ko te razlike nismo opazili za izbrane metaloproteaze zunajceličnega matriksa.



## 7 Zahvale

Doktorsko delo sem opravljala na Odseku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo Instituta Jožef Stefan v okviru programske skupine »Proteoliza in njena regulacija«.

Svojemu mentorju, prof. ddr. Borisu Turku, in somentorju, prof. dr. Vitu Turku, se najlepše zahvaljujem za vodstvo v času mojega raziskovalnega dela, nasvete pri pisanju in pregled doktorskega dela.

Za natančen, skrben in kritičen pregled dela se najlepše zahvaljujem članom komisije, dr. Veroniki Stoka, prof. dr. Blažu Rozmanu in prof. dr. Vitu Turku.

Za pomoč, številne nasvete in razprave o raziskovalnem delu se zahvaljujem dr. Dejanu Cagliču, dr. Urški Repnik, dr. Jerci Rozman Pungerčar in dr. Aleš Premzlu.

Prof. dr. Hideakiju Nagase se najlepše zahvaljujem za rekombinantne metaloproteaze zunajceličnega matriksa-1 in -3, univ. dipl. kem Mojci Trstenjak Prebanda za rekombinantna katepsina K in cistatin C ter dr. Gregorju Koscu za rekombinten katepsin S.

Iz srca se zahvaljujem Katji Škerget in Alešu Špesu, ki sta mi bila v veliko oporo in marsikdaj poskrbela za nasmeh na mojem obrazu. Iskrena hvala Ajdi Taler-Verčič za pomoč in številne razprave med nastajanjem doktorskega dela. Andreji Sekirnik hvala za vse trenutke, ki sva jih preživeli skupaj. Za vse objeme pa se zahvaljujem Poloni Pirš Kovačič.

Iskrena hvala tudi vsem ostalim sodelavcem vseh treh biokemijskih odsekov, ki so mi pomagali pri delu tako z nasveti ter poskrbeli za prijetno vzdušje v laboratoriju, na stopnicah in v B220.

Janu iskrena hvala za vso moralno podporo, za vse vzpodbudne besede, objeme in nasmeh skozi vsa leta, ko je nastajalo doktorsko delo, ter za vse računalniške težave, ki jih je reševal skupaj z mano.

Hvala tudi vsem ostalim prijateljem in mojim pupam, zato ker so kar so in me sprejemajo takšno kot sem.



## 8 Literatura in viri

1. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews. Drug Discovery* **5**, 785-799 (2006)
2. Rossi A.; Deveraux Q.; Turk B.; Sali A. Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biological Chemistry* **385**, 363-372 (2004)
3. Puente X. S.; Sanchez L. M.; Overall C. M.; Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Reviews Genetics* **4**, 544-558 (2003)
4. Turk D. in Guncar G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **59**, 203-213 (2003)
5. Rawlings N. D.; Tolle D. P.; Barrett A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal* **378**, 705-716 (2004)
6. Rawlings N. D.; Tolle D. P.; Barrett A. J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* **32**, D160-164 (2004)
7. NC-IUBMB. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (dostop: januar 2009).
8. Rawlings N. D.; Morton F. R.; Kok C. Y.; Kong J.; Barrett A. J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* **36**, D320-325 (2008)
9. Rawlings N. D. in Barrett A. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* **290** 205-218 (1993)
10. Price N. C. in Stevens L. *Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins* (Oxford University Press, Oxford, 1999).
11. Schechter I. in Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **27**, 157-162 (1967)
12. Turk D.; Guncar G.; Podobnik M.; Turk B. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biological Chemistry* **379**, 137-147 (1998)
13. Barrett A. J.; Rawlings N. D.; Woessner F. J. (ur.). *Handbook of proteolytic enzymes* (Elsevier Academic Press, Amsterdam; London, 2004).
14. Turk B.; Turk D.; Salvesen G. S. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Current Pharmaceutical Design* **8**, 1623-1637 (2002)
15. Turk V.; Turk B.; Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO Journal* **20**, 4629-4633 (2001)
16. Turk B.; Turk D.; Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**, 98-111 (2000)
17. Rozman J.; Stojan J.; Kuhelj R.; Turk V.; Turk B. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Letters* **459**, 358-362 (1999)
18. Jerala R.; Zerovnik E.; Kidric J.; Turk V. pH-induced conformational transitions of the propeptide of human cathepsin L. A role for a molten globule state in zymogen activation. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 11498-11504 (1998)
19. Winchester B. G. Lysosomal metabolism of glycoconjugates. *Sub-Cellular Biochemistry* **27**, 191-238 (1996)
20. Vasiljeva O.; Reinheckel T.; Peters C.; Turk D.; Turk V.; Turk B. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current Pharmaceutical Design* **13**, 387-403 (2007)
21. Turk B.; Dolenc I.; Zerovnik E.; Turk D.; Gubensek F.; Turk V. Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site. *Biochemistry* **33**, 14800-14806 (1994)
22. Mort J. S. in Buttle D. J. Cathepsin B. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **29**, 715-720 (1997)
23. Wang P. H.; Do Y. S.; Macaulay L.; Shinagawa T.; Anderson P. W.; Baxter J. D.; Hsueh W. A. Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 12633-12638 (1991)

24. Brix K.; Linke M.; Tepel C.; Herzog V. Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid. *Biological Chemistry* **382**, 717-725 (2001)
25. Reddy V. Y.; Zhang Q. Y.; Weiss S. J. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3849-3853 (1995)
26. Berquin I. M. in Sloane B. F. Cathepsin B expression in human tumors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **389**, 281-294 (1996)
27. Mai J.; Finley R. L., Jr.; Waisman D. M.; Sloane B. F. Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 12806-12812 (2000)
28. Davies M. E. in Dingle J. T. *Immunopharmacology of joints and connective tissue* (Academic Press, London, 1994).
29. Burnett D.; Abrahamson M.; Devalia J. L.; Sapsford R. J.; Davies R. J.; Buttle D. J. Synthesis and secretion of procathepsin B and cystatin C by human bronchial epithelial cells in vitro: modulation of cathepsin B activity by neutrophil elastase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **317**, 305-310 (1995)
30. Halangk W.; Lerch M. M.; Brandt-Nedelev B.; Roth W.; Ruthenbueger M.; Reinheckel T.; Domschke W.; Lippert H.; Peters C.; Deussing J. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *Journal of Clinical Investigation* **106**, 773-781 (2000)
31. Podobnik M.; Kuhelj R.; Turk V.; Turk D. Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen. *Journal of Molecular Biology* **271**, 774-788 (1997)
32. Bossard M. J.; Tomaszek T. A.; Thompson S. K.; Amegadzie B. Y.; Hanning C. R.; Jones C.; Kurdyla J. T.; McNulty D. E.; Drake F. H.; Gowen M.; Levy M. A. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 12517-12524 (1996)
33. Bromme D.; Okamoto K.; Wang B. B.; Biroc S. 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. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 2126-2132 (1996)
34. Hummel K. M.; Petrow P. K.; Franz J. K.; Muller-Ladner U.; Aicher W. K.; Gay R. E.; Bromme D.; Gay S. Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *Journal of Rheumatology* **25**, 1887-1894 (1998)
35. Hou W. S.; Li Z.; Gordon R. E.; Chan K.; Klein M. J.; Levy R.; Keyszer M.; Keyszer G.; Bromme D. Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *American Journal of Pathology* **159**, 2167-2177 (2001)
36. Hou W. S.; Li W.; Keyszer G.; Weber E.; Levy R.; Klein M. J.; Gravalles E. M.; Goldring S. R.; Bromme D. Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis & Rheumatism* **46**, 663-674 (2002)
37. Garnero P.; Borel O.; Byrjalsen I.; Ferreras M.; Drake F. H.; McQueney M. S.; Foged N. T.; Delmas P. D.; Delaisse J. M. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 32347-32352 (1998)
38. Gelb B. D.; Shi G. P.; Chapman H. A.; Desnick R. J. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* **273**, 1236-1238 (1996)
39. Motyckova G. in Fisher D. E. Pycnodysostosis: role and regulation of cathepsin K in osteoclast function and human disease. *Current Molecular Medicine* **2**, 407-421 (2002)
40. Zhao Q.; Jia Y.; Xiao Y. Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **380**, 721-723 (2009)
41. Nakagawa T. Y. in Rudensky A. Y. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunological Reviews* **172**, 121-129 (1999)
42. Villadangos J. A.; Bryant R. A.; Deussing J.; Driessen C.; Lennon-Dumenil A. M.; Riese R. J.; Roth W.; Saftig P.; Shi G. P.; Chapman H. A.; Peters C.; Ploegh H. L. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunological Reviews* **172**, 109-120 (1999)
43. Nakagawa T. Y.; Brissette W. H.; Lira P. D.; Griffiths R. J.; Petrushova N.; Stock J.; McNeish J. D.; Eastman S. E.; Howard E. D.; Clarke S. R.; Rosloniec E. F.; Elliott E. A.; Rudensky A. Y. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* **10**, 207-217 (1999)
44. Shi G. P.; Villadangos J. A.; Dranoff G.; Small C.; Gu L.; Haley K. J.; Riese R.; Ploegh H. L.; Chapman H. A. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**, 197-206 (1999)

45. Munger J. S.; Haass C.; Lemere C. A.; Shi G. P.; Wong W. S.; Teplow D. B.; Selkoe D. J.; Chapman H. A. Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A beta peptides: a distinct role for cathepsin S. *Biochemical Journal* **311** ( Pt 1), 299-305 (1995)
46. Lemere C. A.; Munger J. S.; Shi G. P.; Natkin L.; Haass C.; Chapman H. A.; Selkoe D. J. The lysosomal cysteine protease, cathepsin S, is increased in Alzheimer's disease and Down syndrome brain. An immunocytochemical study. *American Journal of Pathology* **146**, 848-860 (1995)
47. Petanceska S.; Canoll P.; Devi L. A. Expression of rat cathepsin S in phagocytic cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 4403-4409 (1996)
48. Pham C. T. in Ley T. J. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8627-8632 (1999)
49. Toomes C.; James J.; Wood A. J.; Wu C. L.; McCormick D.; Lench N.; Hewitt C.; Moynihan L.; Roberts E.; Woods C. G.; Markham A.; Wong M.; Widmer R.; Ghaffar K. A.; Pemberton M.; Hussein I. R.; Temtamy S. A.; Davies R.; Read A. P.; Sloan P.; Dixon M. J.; Thakker N. S. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nature Genetics* **23**, 421-424 (1999)
50. Gelman B. B.; Papa L.; Davis M. H.; Gruenstein E. Decreased lysosomal dipeptidyl aminopeptidase I activity in cultured human skin fibroblasts in Duchenne's muscular dystrophy. *Journal of Clinical Investigation* **65**, 1398-1406 (1980)
51. Wolters P. J.; Laig-Webster M.; Caughey G. H. Dipeptidyl peptidase I cleaves matrix-associated proteins and is expressed mainly by mast cells in normal dog airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **22**, 183-190 (2000)
52. Kaakinen R.; Lindstedt K. A.; Sneek M.; Kovanen P. T.; Oorni K. Angiotensin II increases expression and secretion of cathepsin F in cultured human monocyte-derived macrophages: an angiotensin II type 2 receptor-mediated effect. *Atherosclerosis* **192**, 323-327 (2007)
53. Oorni K.; Sneek M.; Bromme D.; Pentikainen M. O.; Lindstedt K. A.; Mayranpaa M.; Aitio H.; Kovanen P. T. Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 34776-34784 (2004)
54. Tang C. H.; Lee J. W.; Galvez M. G.; Robillard L.; Mole S. E.; Chapman H. A. Murine cathepsin F deficiency causes neuronal lipofuscinosis and late-onset neurological disease. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 2309-2316 (2006)
55. Brasch F.; Ten Brinke A.; Johnen G.; Ochs M.; Kapp N.; Muller K. M.; Beers M. F.; Fehrenbach H.; Richter J.; Batenburg J. J.; Buhling F. Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **26**, 659-670 (2002)
56. Cimerman N.; Mesko Brguljan P.; Krasovec M.; Suskovic S.; Kos J. Serum concentration and circadian profiles of cathepsins B, H and L, and their inhibitors, stefins A and B, in asthma. *Clinica Chimica Acta* **310**, 113-122 (2001)
57. Waghray A.; Keppler D.; Sloane B. F.; Schuger L.; Chen Y. Q. Analysis of a truncated form of cathepsin H in human prostate tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 11533-11538 (2002)
58. Frade R.; Rodrigues-Lima F.; Huang S.; Xie K.; Guillaume N.; Bar-Eli M. Procathepsin-L, a proteinase that cleaves human C3 (the third component of complement), confers high tumorigenic and metastatic properties to human melanoma cells. *Cancer Research* **58**, 2733-2736 (1998)
59. Amuthan G.; Biswas G.; Zhang S. Y.; Klein-Szanto A.; Vijayasarathy C.; Avadhani N. G. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO Journal* **20**, 1910-1920 (2001)
60. Benavides F.; Starost M. F.; Flores M.; Gimenez-Conti I. B.; Guenet J. L.; Conti C. J. Impaired hair follicle morphogenesis and cycling with abnormal epidermal differentiation in nackt mice, a cathepsin L-deficient mutation. *American Journal of Pathology* **161**, 693-703 (2002)
61. Tobin D. J.; Foitzik K.; Reinheckel T.; Mecklenburg L.; Botchkarev V. A.; Peters C.; Paus R. The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *American Journal of Pathology* **160**, 1807-1821 (2002)
62. Stypmann J.; Glaser K.; Roth W.; Tobin D. J.; Petermann I.; Matthias R.; Monnig G.; Haverkamp W.; Breithardt G.; Schmahl W.; Peters C.; Reinheckel T. Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 6234-6239 (2002)
63. Nakagawa T.; Roth W.; Wong P.; Nelson A.; Farr A.; Deussing J.; Villadangos J. A.; Ploegh H.; Peters C.; Rudensky A. Y. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-453 (1998)

64. Velasco G.; Ferrando A. A.; Puente X. S.; Sanchez L. M.; Lopez-Otin C. Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 27136-27142 (1994)
65. Tolosa E.; Li W.; Yasuda Y.; Wienhold W.; Denzin L. K.; Lautwein A.; Driessen C.; Schnorrer P.; Weber E.; Stevanovic S.; Kurek R.; Melms A.; Bromme D. Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 517-526 (2003)
66. Santamaria I.; Velasco G.; Cazorla M.; Fueyo A.; Campo E.; Lopez-Otin C. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. *Cancer Research* **58**, 1624-1630 (1998)
67. Sioud M. in Hansen M. H. Profiling the immune response in patients with breast cancer by phage-displayed cDNA libraries. *European Journal of Immunology* **31**, 716-725 (2001)
68. Linnevers C.; Smeekens S. P.; Bromme D. Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8+ T-lymphocytes. *FEBS Letters* **405**, 253-259 (1997)
69. Wex T.; Buhling F.; Wex H.; Gunther D.; Malfertheiner P.; Weber E.; Bromme D. Human cathepsin W, a cysteine protease predominantly expressed in NK cells, is mainly localized in the endoplasmic reticulum. *Journal of Immunology* **167**, 2172-2178 (2001)
70. Jevnikar Z.; Obermajer N.; Bogyo M.; Kos J. The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *Journal of Cell Science* **121**, 2652-2661 (2008)
71. Wendt W.; Zhu X. R.; Lubbert H.; Stichel C. C. Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Experimental Neurology* **204**, 525-540 (2007)
72. Mason R. W. Interaction of lysosomal cysteine proteinases with alpha 2-macroglobulin: conclusive evidence for the endopeptidase activities of cathepsins B and H. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **273**, 367-374 (1989)
73. Abrahamson M.; Alvarez-Fernandez M.; Nathanson C. M. Cystatins. *Biochemical Society Symposia* **70**, 179-199 (2003)
74. Rawlings N. D. in Barrett A. J. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *Journal of Molecular Evolution* **30**, 60-71 (1990)
75. Turk V.; Stoka V.; Turk D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Frontiers in Bioscience* **13**, 5406-5420 (2008)
76. Lenarcic B. in Bevec T. Thyropins--new structurally related proteinase inhibitors. *Biological Chemistry* **379**, 105-111 (1998)
77. Bevec T.; Stoka V.; Pungercic G.; Dolenc I.; Turk V. Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 1331-1338 (1996)
78. Mihelic M.; Dobersek A.; Guncar G.; Turk D. Inhibitory fragment from the p41 form of invariant chain can regulate activity of cysteine cathepsins in antigen presentation. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 14453-14460 (2008)
79. Al-Khunaizi M.; Luke C. J.; Askew Y. S.; Pak S. C.; Askew D. J.; Cataltepe S.; Miller D.; Mills D. R.; Tsu C.; Bromme D.; Irving J. A.; Whisstock J. C.; Silverman G. A. The serpin SQN-5 is a dual mechanistic-class inhibitor of serine and cysteine proteinases. *Biochemistry* **41**, 3189-3199 (2002)
80. Nagase H. in Fushimi K. Elucidating the function of non catalytic domains of collagenases and aggrecanases. *Connective Tissue Research* **49**, 169-174 (2008)
81. Nagase H.; Visse R.; Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* **69**, 562-573 (2006)
82. Murphy G. in Nagase H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nature Clinical Practice. Rheumatology* **4**, 128-135 (2008)
83. Kadoglou N. P. in Liapis C. D. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Current Medical Research and Opinion* **20**, 419-432 (2004)
84. Lindsey M. L. MMP induction and inhibition in myocardial infarction. *Heart Failure Reviews* **9**, 7-19 (2004)
85. Cataldo D. D.; Gueders M. M.; Rocks N.; Sounni N. E.; Evrard B.; Bartsch P.; Louis R.; Noel A.; Foidart J. M. Pathogenic role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteinases inhibitors. *Cellular and Molecular Biology* **49**, 875-884 (2003)
86. Carney D. E.; McCann U. G.; Schiller H. J.; Gatto L. A.; Steinberg J.; Picone A. L.; Nieman G. F. Metalloproteinase inhibition prevents acute respiratory distress syndrome. *Journal of Surgical Research* **99**, 245-252 (2001)

87. Cunningham L. A.; Wetzel M.; Rosenberg G. A. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* **50**, 329-339 (2005)
88. Burrage P. S.; Mix K. S.; Brinckerhoff C. E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Frontiers in Bioscience* **11**, 529-543 (2006)
89. Gonzalez-Avila G.; Iturria C.; Vadillo F.; Teran L.; Selman M.; Perez-Tamayo R. 72-kD (MMP-2) and 92-kD (MMP-9) type IV collagenase production and activity in different histologic types of lung cancer cells. *Pathobiology* **66**, 5-16 (1998)
90. Kugler A.; Hemmerlein B.; Thelen P.; Kallerhoff M.; Radzun H. J.; Ringert R. H. Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma. *Journal of Urology* **160**, 1914-1918 (1998)
91. Nawrocki B.; Polette M.; Marchand V.; Monteau M.; Gillery P.; Tournier J. M.; Birembaut P. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses. *International Journal of Cancer* **72**, 556-564 (1997)
92. Sutinen M.; Kainulainen T.; Hurskainen T.; Vesterlund E.; Alexander J. P.; Overall C. M.; Sorsa T.; Salo T. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *British Journal of Cancer* **77**, 2239-2245 (1998)
93. Visse R. in Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* **92**, 827-839 (2003)
94. Martin I.; Jakob M.; Schafer D.; Dick W.; Spagnoli G.; Heberer M. Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Osteoarthritis and Cartilage* **9**, 112-118 (2001)
95. Lin Z.; Willers C.; Xu J.; Zheng M. H. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Engineering* **12**, 1971-1984 (2006)
96. Buckwalter J. A. in Mankin H. J. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instructional Course Lectures* **47**, 487-504 (1998)
97. Buckwalter J. A. in Mankin H. J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional Course Lectures* **47**, 477-486 (1998)
98. Knudson C. B. in Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **12**, 69-78 (2001)
99. Watanabe H.; Yamada Y.; Kimata K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *Journal of Biochemistry* **124**, 687-693 (1998)
100. Aigner T. in Stove J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 1569-1593 (2003)
101. Kean W. F.; Kean R.; Buchanan W. W. Osteoarthritis: symptoms, signs and source of pain. *Inflammopharmacology* **12**, 3-31 (2004)
102. Ge Z.; Hu Y.; Heng B. C.; Yang Z.; Ouyang H.; Lee E. H.; Cao T. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis & Rheumatism* **55**, 493-500 (2006)
103. Goldring M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* **43**, 1916-1926 (2000)
104. Hunter D. J. in Felson D. T. Osteoarthritis. *BMJ* **332**, 639-642 (2006)
105. Sandell L. J. in Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy* **3**, 107-113 (2001)
106. Wieland H. A.; Michaelis M.; Kirschbaum B. J.; Rudolphi K. A. Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nature Reviews. Drug Discovery* **4**, 331-344 (2005)
107. Kramer I.; Wibulswas A.; Croft D.; Genot E. Rheumatoid arthritis: targeting the proliferative fibroblasts. *Progress in Cell Cycle Research* **5**, 59-70 (2003)
108. Smolen J. S. in Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2**, 473-488 (2003)
109. Pap T.; Muller-Ladner U.; Gay R. E.; Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy* **2**, 361-367 (2000)
110. Yasuda Y.; Kaleta J.; Bromme D. The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 973-993 (2005)
111. Hashimoto Y.; Kakegawa H.; Narita Y.; Hachiya Y.; Hayakawa T.; Kos J.; Turk V.; Katunuma N. Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **283**, 334-339 (2001)
112. Konttinen Y. T.; Mandelin J.; Li T. F.; Salo J.; Lassus J.; Liljestrom M.; Hukkanen M.; Takagi M.; Virtanen I.; Santavirta S. Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the

- superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* **46**, 953-960 (2002)
113. Silver I. A.; Murrills R. J.; Etherington D. J. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Experimental Cell Research* **175**, 266-276 (1988)
  114. Martel-Pelletier J.; Cloutier J. M.; Pelletier J. P. Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research* **8**, 336-344 (1990)
  115. Martel-Pelletier J.; Welsch D. J.; Pelletier J. P. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Practice and Research. Clinical Rheumatology* **15**, 805-829 (2001)
  116. Miller E. J.; Harris E. D., Jr.; Chung E.; Finch J. E., Jr.; McCroskery P. A.; Butler W. T. Cleavage of Type II and III collagens with mammalian collagenase: site of cleavage and primary structure at the NH<sub>2</sub>-terminal portion of the smaller fragment released from both collagens. *Biochemistry* **15**, 787-792 (1976)
  117. Jones G. C.; Riley G. P.; Buttle D. J. The role of proteases in pathologies of the synovial joint. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1199-1218 (2008)
  118. Cawston T. E. in Wilson A. J. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Practice and Research. Clinical Rheumatology* **20**, 983-1002 (2006)
  119. Li Z.; Hou W. S.; Bromme D. Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates. *Biochemistry* **39**, 529-536 (2000)
  120. Kirschke H.; Kembhavi A. A.; Bohley P.; Barrett A. J. Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates. *Biochemical Journal* **201**, 367-372 (1982)
  121. Tang B. L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33**, 33-44 (2001)
  122. Nguyen Q.; Mort J. S.; Roughley P. J. Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsin B. *Biochemical Journal* **266**, 569-573 (1990)
  123. Barksby H. E.; Milner J. M.; Patterson A. M.; Peake N. J.; Hui W.; Robson T.; Lakey R.; Middleton J.; Cawston T. E.; Richards C. D.; Rowan A. D. Matrix metalloproteinase 10 promotion of collagenolysis via procollagenase activation: implications for cartilage degradation in arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **54**, 3244-3253 (2006)
  124. Lemaire R.; Huet G.; Zerimech F.; Grard G.; Fontaine C.; Duquesnoy B.; Flipo R. M. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *British Journal of Rheumatology* **36**, 735-743 (1997)
  125. Riese R. J.; Wolf P. R.; Bromme D.; Natkin L. R.; Villadangos J. A.; Ploegh H. L.; Chapman H. A. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* **4**, 357-366 (1996)
  126. Rengel Y.; Ospelt C.; Gay S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Research and Therapy* **9**, 221 (2007)
  127. Gyorgy B.; Toth E.; Tarcsa E.; Falus A.; Buzas E. I. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, 1662-1677 (2006)
  128. Suzuki A.; Yamada R.; Yamamoto K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1108**, 323-339 (2007)
  129. Vossenaar E. R.; Zendman A. J.; van Venrooij W. J.; Pruijn G. J. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays* **25**, 1106-1118 (2003)
  130. Utz P. J.; Gensler T. J.; Anderson P. Death, autoantigen modifications, and tolerance. *Arthritis Research and Therapy* **2**, 101-114 (2000)
  131. Asaga H.; Yamada M.; Senshu T. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**, 641-646 (1998)
  132. Gan S. Q.; McBride O. W.; Idler W. W.; Markova N.; Steinert P. M. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry* **29**, 9432-9440 (1990)
  133. Hagiwara T.; Nakashima K.; Hirano H.; Senshu T.; Yamada M. Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**, 979-983 (2002)
  134. Masson-Bessiere C.; Sebbag M.; Girbal-Neuhauser E.; Nogueira L.; Vincent C.; Senshu T.; Serre G. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *Journal of Immunology* **166**, 4177-4184 (2001)
  135. Pritzker L. B.; Joshi S.; Gowan J. J.; Harauz G.; Moscarello M. A. Deimination of myelin basic protein. 1. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion by cathepsin D. *Biochemistry* **39**, 5374-5381 (2000)
  136. Cuthbert G. L.; Daujat S.; Snowden A. W.; Erdjument-Bromage H.; Hagiwara T.; Yamada M.;

- Schneider R.; Gregory P. D.; Tempst P.; Bannister A. J.; Kouzarides T. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**, 545-553 (2004)
137. Tarcsa E.; Marekov L. N.; Mei G.; Melino G.; Lee S. C.; Steinert P. M. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 30709-30716 (1996)
138. Cantaert T.; De Rycke L.; Bongartz T.; Matteson E. L.; Tak P. P.; Nicholas A. P.; Baeten D. Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient! *Arthritis & Rheumatism* **54**, 3381-3389 (2006)
139. Schellekens G. A.; de Jong B. A.; van den Hoogen F. H.; van de Putte L. B.; van Venrooij W. J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *Journal of Clinical Investigation* **101**, 273-281 (1998)
140. Klareskog L.; Stolt P.; Lundberg K.; Kallberg H.; Bengtsson C.; Grunewald J.; Ronnelid J.; Harris H. E.; Ulfgren A. K.; Rantapaa-Dahlqvist S.; Eklund A.; Padyukov L.; Alfredsson L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis & Rheumatism* **54**, 38-46 (2006)
141. Uysal H.; Bockermann R.; Nandakumar K. S.; Sehnert B.; Bajtner E.; Engstrom A.; Serre G.; Burkhardt H.; Thunnissen M. M.; Holmdahl R. Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 449-462 (2009)
142. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 411-421 (1999)
143. Kuhelj R.; Dolinar M.; Pungercar J.; Turk V. The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *FEBS Journal* **229**, 533-539 (1995)
144. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970)
145. Barrett A. J.; Kembhavi A. A.; Brown M. A.; Kirschke H.; Knight C. G.; Tamai M.; Hanada K. L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochemical Journal* **201**, 189-198 (1982)
146. Tchvetverikov I.; Ronday H. K.; Van El B.; Kiers G. H.; Verzijl N.; TeKoppele J. M.; Huizinga T. W.; DeGroot J.; Hanemaaijer R. MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **63**, 881-883 (2004)
147. Zhang Z.; Li G.; Shi B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* **90**, 23-28 (2006)
148. Leikina E.; Merts M. V.; Kuznetsova N.; Leikin S. Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1314-1318 (2002)
149. Li Z.; Yasuda Y.; Li W.; Bogyo M.; Katz N.; Gordon R. E.; Fields G. B.; Bromme D. Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 5470-5479 (2004)
150. Selent J.; Kaleta J.; Li Z.; Lalmanach G.; Bromme D. Selective inhibition of the collagenase activity of cathepsin K. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 16492-16501 (2007)
151. Kirschke H.; Barrett A. J.; Rawlings N. D. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* **2**, 1581-1643 (1995)
152. Keyszer G.; Redlich A.; Haupl T.; Zacher J.; Sparmann M.; Engethum U.; Gay S.; Burmester G. R. Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis & Rheumatism* **41**, 1378-1387 (1998)
153. Esser R. E.; Angelo R. A.; Murphey M. D.; Watts L. M.; Thornburg L. P.; Palmer J. T.; Talhouk J. W.; Smith R. E. Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **37**, 236-247 (1994)
154. Schurig U.; Stopfel N.; Huckel M.; Pfirschke C.; Wiederanders B.; Brauer R. Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Research and Therapy* **7**, R174-188 (2005)
155. Weidauer E.; Yasuda Y.; Biswal B. K.; Cherny M.; James M. N.; Bromme D. Effects of disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) on the activities of rheumatoid arthritis-associated cathepsins K and S. *Biological Chemistry* **388**, 331-336 (2007)
156. Kirschke H.; Wiederanders B.; Bromme D.; Rinne A. Cathepsin S from bovine spleen. Purification,

- distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochemical Journal* **264**, 467-473 (1989)
157. Berardi S.; Lang A.; Kostoulas G.; Horler D.; Vilei E. M.; Baici A. Alternative messenger RNA splicing and enzyme forms of cathepsin B in human osteoarthritic cartilage and cultured chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* **44**, 1819-1831 (2001)
158. Mort J. S. in Recklies A. D. Interrelationship of active and latent secreted human cathepsin B precursors. *Biochemical Journal* **233**, 57-63 (1986)
159. Rozman J.; Stojan J.; Kuhelj R.; Turk V.; Turk B. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett* **459**, 358-362 (1999)
160. Caglic D.; Pungercar J. R.; Pejler G.; Turk V.; Turk B. Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 33076-33085 (2007)
161. Gabrijelcic D.; Annan-Prah A.; Rodic B.; Rozman B.; Cotic V.; Turk V. Determination of cathepsins B and H in sera and synovial fluids of patients with different joint diseases. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* **28**, 149-153 (1990)
162. Mort J. S.; Magny M. C.; Lee E. R. Cathepsin B: an alternative protease for the generation of an aggrecan 'metalloproteinase' cleavage neoepitope. *Biochemical Journal* **335** ( Pt 3), 491-494 (1998)
163. Buck M. R.; Karustis D. G.; Day N. A.; Honn K. V.; Sloane B. F. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochemical Journal* **282** ( Pt 1), 273-278 (1992)
164. Cunnane G.; FitzGerald O.; Hummel K. M.; Gay R. E.; Gay S.; Bresnihan B. Collagenase, cathepsin B and cathepsin L gene expression in the synovial membrane of patients with early inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 34-42 (1999)
165. van Meurs J.; van Lent P.; Holthuysen A.; Lambrou D.; Bayne E.; Singer I.; van den Berg W. Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for stromelysin-1 in cartilage destruction. *Journal of Immunology* **163**, 5633-5639 (1999)
166. van Meurs J. B.; van Lent P. L.; Holthuysen A. E.; Singer, II; Bayne E. K.; van den Berg W. B. Kinetics of aggrecanase- and metalloproteinase-induced neoepitopes in various stages of cartilage destruction in murine arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **42**, 1128-1139 (1999)
167. Mitchell P. G.; Magna H. A.; Reeves L. M.; Lopresti-Morrow L. L.; Yocum S. A.; Rosner P. J.; Geoghegan K. F.; Hambor J. E. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *Journal of Clinical Investigation* **97**, 761-768 (1996)
168. Lindy O.; Kontinen Y. T.; Sorsa T.; Ding Y.; Santavirta S.; Ceponis A.; Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis & Rheumatism* **40**, 1391-1399 (1997)
169. Shi J.; Schmitt-Talbot E.; DiMattia D. A.; Dullea R. G. The differential effects of IL-1 and TNF-alpha on proinflammatory cytokine and matrix metalloproteinase expression in human chondrosarcoma cells. *Inflammation Research* **53**, 377-389 (2004)
170. Kagari T.; Doi H.; Shimozato T. The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *Journal of Immunology* **169**, 1459-1466 (2002)
171. Abdulghani S.; Caetano-Lopes J.; Canhao H.; Fonseca J. E. Biomechanical effects of inflammatory diseases on bone-rheumatoid arthritis as a paradigm. *Autoimmunity Reviews* **8**, 668-671 (2009)
172. Steffen C. Consideration of pathogenesis of rheumatoid arthritis as collagen autoimmunity. *Zeitschrift für Immunitätsforschung, Allergie und Klinische Immunologie* **139**, 219-227 (1970)
173. Ohnishi Y.; Tsutsumi A.; Sakamaki T.; Sumida T. T cell epitopes of type II collagen in HLA-DRB1\*0101 or DRB1\*0405-positive Japanese patients with rheumatoid arthritis. *International Journal of Molecular Medicine* **11**, 331-335 (2003)
174. Jaalinoja J.; Nissila M.; Kauppi M. J.; Hakala M.; Laiho K.; Karttunen R.; Horkko S.; Ala-Kokko L. Serum antibodies against intact human collagen IX are elevated at onset of rheumatoid arthritis but are not related to development of erosions. *Journal of Rheumatology* **35**, 745-751 (2008)
175. Cook A. D.; Rowley M. J.; Stockman A.; Muirden K. D.; Mackay I. R. Specificity of antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* **21**, 1186-1191 (1994)
176. Cook A. D.; Rowley M. J.; Mackay I. R.; Gough A.; Emery P. Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. Correlation with disease progression. *Arthritis & Rheumatism* **39**, 1720-1727 (1996)
177. Nielen M. M.; van Schaardenburg D.; Reesink H. W.; van de Stadt R. J.; van der Horst-Bruinsma I. E.; de Koning M. H.; Habibuw M. R.; Vandenbroucke J. P.; Dijkmans B. A. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis*

- & Rheumatism* **50**, 380-386 (2004)
178. Forslind K.; Ahlmen M.; Eberhardt K.; Hafstrom I.; Svensson B. Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Annals of the Rheumatic Diseases* **63**, 1090-1095 (2004)
  179. Dubucquoi S.; Solau-Gervais E.; Lefranc D.; Marguerie L.; Sibia J.; Goetz J.; Dutoit V.; Fauchais A. L.; Hachulla E.; Flipo R. M.; Prin L. Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases* **63**, 415-419 (2004)
  180. van Gaalen F.; Ioan-Facsinay A.; Huizinga T. W.; Toes R. E. The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology* **175**, 5575-5580 (2005)
  181. Yoshida M.; Tsuji M.; Kurosaka D.; Kurosaka D.; Yasuda J.; Ito Y.; Nishizawa T.; Yamada A. Autoimmunity to citrullinated type II collagen in rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology* **16**, 276-281 (2006)
  182. Cao L.; Goodin R.; Wood D.; Moscarello M. A.; Whitaker J. N. Rapid release and unusual stability of immunodominant peptide 45-89 from citrullinated myelin basic protein. *Biochemistry* **38**, 6157-6163 (1999)
  183. Khouri H. E.; Plouffe C.; Hasnain S.; Hiramata T.; Storer A. C.; Menard R. A model to explain the pH-dependent specificity of cathepsin B-catalysed hydrolyses. *Biochemical Journal* **275** ( Pt 3), 751-757 (1991)
  184. Lauer-Fields J. L.; Tuzinski K. A.; Shimokawa K.; Nagase H.; Fields G. B. Hydrolysis of triple-helical collagen peptide models by matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 13282-13290 (2000)



## Kazalo slik

Slika 1: <i>Shematski prikaz strukture endopeptidaze in eksopeptidaz. Katepsin L kot endopeptidaza, katepsin H kot aminopeptidaza in katepsin X kot karboksipeptidaza z ustreznimi peptidnimi substrati (povzeto po [1]).</i> .....	1
Slika 2: <i>Definicija vezavnih mest za substrat (povzeto po [11]).</i> .....	2
Slika 3: <i>Strukturne posebnosti eksopeptidaz [4]. Na sliki so prikazani katepsin B (modro), katepsin C (rdeče), katepsin H (svetlo modro) in katepsin X (zeleno) na površini katepsina L (1ICF.pdb, siva površina). Slika je narejena s programom PyMOL.</i> .....	4
Slika 4: <i>Shematski prikaz zgradbe metaloproteaz zunajceličnega matriksa. (S – signalni peptid; Pro – domena propeptida; Cat – katalitska domena; Zn<sup>2+</sup> - cinkov ion v aktivnem mestu; Hpx – hemopeksinska domena; Fn – fibronektinska domena; V – vitronektinski vključek; I – transmembranska domena tipa I; II – transmembranska domena tipa II; G – GPI sidro; Cp – citoplazemska domena; Ca – regija cisteinske mreže; Ig – IgG domena; cepitveno mesto furina pa je prikazano v črni barvi med domeno propeptida in katalitsko domeno).</i> .....	7
Slika 5: <i>Shematski prikaz sestave sklepnega hrustanca.</i> .....	9
Slika 6: <i>Shematski prikaz značilnosti zdravega in osteoartritičnega sklepa (povzeto po [105]).</i> .....	10
Slika 7: <i>Shematski prikaz značilnosti zdravega in revmatičnega sklepa (povzeto po [107]).</i> .....	11
Slika 8: <i>Proteaze in sklepna obolenja (povzeto po [125] ). Na shemi so prikazane proteaze, ki sodelujejo pri razvoju osteoartritoze in revmatoidnega artritisa. (ADAM – disintegrinu in metaloproteazi podobna proteaza; ADAMTS – ADAM-trombospondin; IL-1 – interleukin-1; MMP – metaloproteaza zunajceličnega matriksa; MT – membranski tip; TNF – dejavnik tumorske nekroze).</i> .....	13
Slika 9: <i>Encimska pretvorba aminokislinskega preostanka arginina v citrulin s peptidilarginin deiminazo (PAD) ob prisotnosti Ca<sup>2+</sup> ionov.</i> .....	14
Slika 10: <i>Možni vplivi citrulinacije (povzeto po [128]).</i> .....	15
Slika 11: <i>Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (12.5 % gel) pripravljenih bakterijskih lizatov pred in po indukciji izražanja gena za prokatepsin B. (M – označevalec velikosti; 1 in 5 – pred indukcijo izražanja; 2 in 6 – ena ura po indukciji; 3 in 7 – dve uri po indukciji; 4 in 8 – tri ure po indukciji).</i> .....	31
Slika 12: <i>Absorpcijska spektra rekombinantnega katepsina B in prokatepsina B.</i> .....	32
Slika 13: <i>Poliakrilamidna gelska elektroforeza izoliranih rekombinantnih proteinov v prisotnosti NaDS (12.5 % gel). (M – označevalci velikosti; 1 – rekombinanten katepsin B; 2 – rekombinanten prokatepsin B)</i> .....	32
Slika 14: <i>Titracija aktivnega mesta rekombinantnega katepsina B z ireverzibilnim inhibitorjem E-64.</i> .....	32
Slika 15: <i>Aktivnosti izbranih cisteinskih katepsinov na različne sintetične fluorogene substrate v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA (bela barva) ali OA (siva barva). Slika prikazuje minimalno in maksimalno vrednost ter kvartile za posamezno skupino meritev, pri čemer horizontalna črta predstavlja mediano. Statistično značilna razlika je na sliki prikazana z * (P &lt; 0.05). Z-FR-AMC smo uporabili kot splošen katepsinski substrat, za določitev aktivnosti katepsina B smo izbrali Z-RR-AMC ter Bz-FVR-AMC za določitev aktivnosti katepsina S.</i> .....	33
Slika 16: <i>Aktivnosti izbranih metaloproteaz zunajceličnega matriksa (MMP) na različne sintetične fluorogene substrate v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA (bela barva) ali OA (siva barva). Slika prikazuje minimalno in maksimalno vrednost ter kvartile za posamezno skupino meritev, pri čemer horizontalna črta predstavlja mediano. Statistično značilna razlika je na sliki prikazana z ** (P &lt; 0.01).</i> .....	34

Slika 17: <i>Western analiza izražanja proteinov za katepsina B in S v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA ali OA. Zrela oblika rekombinantnega katepsina B (CatB) ali S (CatS) je označena z M, prooblika katepsina B (pCatB) pa s P.</i> .....	35
Slika 18: <i>Western analiza izražanja proteina za cistatin C v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA in OA. Rekombinantno izražen cistatin C (CystC) je označen z R.</i> .....	36
Slika 19: <i>Western analiza izražanja proteinov za MMP-1 in MMP-3 v kliničnih vzorcih sinovijske tekočine bolnikov z RA in OA. Zrela oblika rekombinantne MMP-1 je označena z M, prekursorška oblika pa s P. Pri MMP-3 je kontrola označena s CD, ki predstavlja rekombinantno katalitsko domeno tega encima.</i> .....	36
Slika 20: <i>Razgradnja kolagenov tipa I in tipa II s tripsinom pri 37 °C (CTRL – kolagen tipa I ali tipa II; T – kolagen tipa I ali tipa II z dodanim tripsinom; T+I - kolagen tipa I ali tipa II z dodanim tripsinom in inhibitorjem serinskih proteaz AEBSF)</i> .....	38
Slika 21: <i>Western analiza citrulinacije želatine kolagena tipa I pri 37 °C. Nativna oblika kolagena tipa I je označena z NK, citrulinirana oblika pa s CK.</i> .....	38
Slika 22: <i>Western analiza citrulinacije želatine kolagena tipa II pri 37 °C. Nativna oblika kolagena je označena z NK.</i> .....	39
Slika 23: <i>Prikaz in vitro razgradnje obeh oblik želatine kolagena tipa I s katepsinom B pri 37 °C (CatB – katepsin B; CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).</i> .....	40
Slika 24: <i>Prikaz in vitro razgradnje obeh oblik želatine kolagena tipa I s katepsinom K pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).</i> .....	40
Slika 25: <i>Prikaz in vitro razgradnje obeh oblik želatine kolagena tipa I s katepsinom S pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).</i> .....	40
Slika 26: <i>Prikaz razgradnje citrulinirane želatine kolagena tipa I s katepsinom B z uporabo protiteles proti citruliniranim peptidom (CK – citrulinirana želatina kolagena tipa I; NK - želatina kolagena tipa I).</i> .....	41
Slika 27: <i>Prikaz in vitro razgradnje/procesiranja obeh oblik želatine kolagena tipa I z MMP-1 pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).</i> .....	41
Slika 28: <i>Prikaz in vitro razgradnje/procesiranja obeh oblik želatine kolagena tipa I z MMP-3 pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).</i> .....	41
Slika 29: <i>Prikaz in vitro razgradnje nativnega kolagena tip II - želatine s katepsinom S pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov; PAD - peptidilarginin deiminaza).</i> .....	42
Slika 30: <i>Prikaz in vitro procesiranja nativne oblike kolagena tipa II s katepsinom B in hondroitin sulfatom A pri 37 °C (CatB – katepsin B; CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov).</i> .....	42
Slika 31: <i>Prikaz in vitro procesiranja nativne oblike kolagena tipa II s katepsinom K in hondroitin sulfatom A pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov).</i> .....	43
Slika 32: <i>Prikaz in vitro procesiranja nativne oblike kolagena tipa II s katepsinom S in hondroitin sulfatom A pri 37 °C (CatS – katepsin S; CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov).</i> .....	43
Slika 33: <i>Prikaz in vitro razgradnje nativnega kolagena tipa II z MMP-1 pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov).</i> .....	43
Slika 34: <i>Prikaz in vitro razgradnje nativnega kolagena tipa II z MMP-3 pri 37 °C (CTRL - kontrola; M - označevalec velikosti proteinov).</i> .....	44

## Kazalo tabel

Tabela 1: <i>Razvrstitev proteaz</i> (IUB Nomenclature Committee, 1984) .....	2
Tabela 2: <i>Klani cisteinskih proteaz</i> . Poleg števila družin, ki so uvrščene v posamezen klan, so v tabeli prikazana še zaporedja ohranjenih aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu [12].....	3
Tabela 3: <i>Poimenovanje in katalitske lastnosti človeških lizosomskih cisteinskih proteaz</i> [14].....	4
Tabela 4: <i>Metaloproteaze zunajceličnega matriksa in njihovi znani substrati</i> (povzeto po [80, 92]). V tabeli je prikazanih vseh 6 skupin MMP-jev in njihovi člani, njihova trivialna imena in skupni znani substrati. Posamezne proteaze ne delujejo le na skupne substrate, ki so prikazani v tabeli, temveč imajo tudi vsaka svoje tarče, ki so specifične za posamezen encim. ....	8
Tabela 5: <i>Splošne in klinične značilnosti bolnikov s sklepnimi obolenji</i> . (CRP – C-reaktivni protein; SF – sinovijska tekočina; SR – sedimentacija; n.p. – ni podatka) .....	21
Tabela 7: Sestava 8 %, 12,5 % oz. 15 % ločevalnega poliakrilamidnega gela in 5 % koncentracijskega poliakrilamidnega gela. ....	26
Tabela 8: Prikaz delovnih koncentracij uporabljenih primarnih protiteles. ....	27
Tabela 6: Prikaz različnih masnih razmerij za cepitve citruliniranih in necitruliniranih modelnih proteinov s cisteinskim katepsini B, K in S ter MMP-1 in MMP-3 (cdMMP-3 je okrajšava za katalitsko domeno MMP-3). Pri kolagenu tipa II smo pri reakciji s cisteinskimi katepsini uporabili tudi dodatek hondroitin sulfata A. ....	29
Tabela 9: <i>Povprečne koncentracije proteinov katepsina S, IL-6, IL-1<math>\beta</math> in TNF-<math>\alpha</math> v kliničnih vzorcih sinovialne tekočine</i> . Rezultati so podani kot povprečna vrednost. Statistično značilna razlika je prikazana z ** (P < 0.01); n.d. – nezaznavno; # določen samo pri enem bolniku z RA. ....	37



## Priloge

V času doktorskega dela sta bila objavljena dva raziskovalna članka:

ROZMAN PUNGERČAR, Jerica, CAGLIČ, Dejan, SAJID, Mohammed, DOLINAR, Marko, VASILJEVA, Olga, POŽGAN, Urška, TURK, Dušan, BOGYO, Matthew, TURK, Vito, TURK, Boris. Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity. *FEBS journal*, 2009, vol. 276, 660-668.

POŽGAN, Urška, CAGLIČ, Dejan, ROZMAN, Blaž, NAGASE, Hideaki, TURK, Vito, TURK, Boris. Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Chem*, 2010 (accepted: 18<sup>th</sup> of December 2009)



## Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity

Jerica Rozman Pungerčar<sup>1,\*</sup>, Dejan Caglič<sup>1,\*</sup>, Mohammed Sajid<sup>3</sup>, Marko Dolinar<sup>2</sup>, Olga Vasiljeva<sup>1</sup>, Urška Požgan<sup>1</sup>, Dušan Turk<sup>1</sup>, Matthew Bogyo<sup>4</sup>, Vito Turk<sup>1</sup> and Boris Turk<sup>1</sup>

1 Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia

2 Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Slovenia

3 Biochemistry and Molecular Biology Core, Sandler Center for Basic Research in Parasitic Diseases, University of California, San Francisco, CA, USA

4 Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, CA, USA

### Keywords

autoactivation; DCG-04; lysosomal cysteine protease; procathepsin B; processing

### Correspondence

B. Turk, Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jožef Stefan Institute, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenia

Fax: +386 1 477 3984

Tel: +386 1 477 3772

E-mail: boris.turk@ijs.si

\*These authors contributed equally to this work

(Received 17 September 2008, revised 13 November 2008, accepted 24 November 2008)

doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06815.x

Cathepsin B (EC 3.4.22.1) and other cysteine proteases are synthesized as zymogens, which are processed to their mature forms autocatalytically or by other proteases. Autocatalytic processing was suggested to be a bimolecular process, whereas initiation of the processing has not yet been clarified. Procathepsin B was shown by zymography to hydrolyze the synthetic substrate 7-*N*-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginylamide-4-methylcoumarin (Z-Arg-Arg-NH-MEC), suggesting that procathepsin B is catalytically active. The activity-based probe DCG-04, which is an E-64-type inhibitor, was found to label both mature cathepsin B and its zymogen, confirming the zymography data. Mutation analyses in the linker region between the propeptide and the mature part revealed that autocatalytic processing of procathepsin B is largely unaffected by mutations in this region, including mutations to prolines. On the basis of these results, a model for autocatalytic activation of cysteine cathepsins is proposed, involving propeptide dissociation from the active-site cleft as the first step during zymogen activation. This unimolecular conformational change is followed by a bimolecular proteolytic removal of the propeptide, which can be accomplished in one or more steps. Such activation, which can be also facilitated by glycosaminoglycans or by binding to negatively charged surfaces, may have important physiological consequences because cathepsin zymogens were often found secreted in various pathological states.

Cysteine cathepsins comprise a group of papain-like cysteine proteases found predominantly in lysosomes. Cathepsin B (EC 3.4.22.1) is one of the most abundant and thoroughly studied. It plays an important role in nonselective protein degradation inside lysosomes, and is involved in the processing of other proteins and hormones such as trypsinogen and thyroglobulin [1–3]. Secreted cathepsin B is often associated with pathological conditions such as cancer progression [3–5], rheumatoid arthritis and osteoarthritis [3,6].

Cysteine cathepsins, including cathepsin B, are synthesized as inactive proenzymes, which are activated by other proteases or by autocatalytic processing in the acidic environment of late endosomes and lysosomes [1,2]. From the crystal structures of procathepsins B and L, it is evident that the propeptide, which is removed during activation, blocks access to the active site that is already formed in the proenzyme [7–10]. The propeptide forms a predominantly  $\alpha$ -helical domain, which is positioned as a 'hook' at the top of

### Abbreviations

Z-Arg-Arg-NH-MEC, 7-*N*-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginylamide-4-methylcoumarin.

the catalytic site, where it interacts with the mature part, strengthening the interaction [9]. The propeptide chain then continues in an extended conformation across the active-site cleft and towards the N-terminus of the mature enzyme in the direction opposite to that of substrate binding, thereby serving as a linker between the 'hook' domain and the N-terminus of the mature enzyme. This N-terminal-linker-'hook' arrangement, with its reverse orientation compared to substrate binding, strongly resembles the 'sinker'-linker-'hook' arrangement in the X-inhibitor of apoptosis protein, which is known to block the executioner caspases [11].

The pH optimum for *in vitro* autocatalytic processing of procathepsin B, as well as of some other cathepsins, is approximately 4.5 [12–14]. At lower pH, the interaction between the propeptide and the mature part is weakened [15–17], resulting in a looser conformation of the proenzyme. This is followed by intermolecular cleavage of the procathepsin B propeptide [14]. However, initiation of the activation process has remained an unsolved question, although it has been suggested that proenzymes may exhibit minor catalytic activity, which could potentially initiate the chain reaction [14,18–20]. Although processing can be very rapid at higher concentrations of the proenzyme [14], it is not clear whether propeptide removal is accomplished in a single step or through one or more intermediates, as has been suggested elsewhere [21].

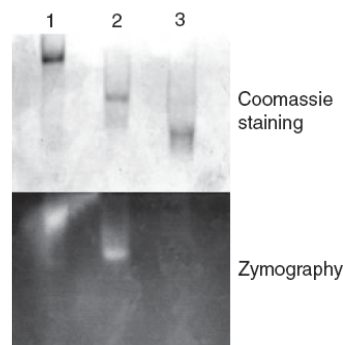
To address these questions, we studied the autocatalytic activation of recombinant human procathepsin B in the presence and absence of various small molecules under different conditions, and by performing mutation analysis. Procathepsin B was shown to exhibit low catalytic activity, which is sufficient to trigger autocatalytic activation of the zymogen. In addition, autocatalytic activation of procathepsin B was found to be largely insensitive to mutations in the cleavage-site region and could proceed at neutral pH when bound to heparin and other negatively charged surfaces, which may account for an extracellular physiological role of cathepsins.

## Results

### Procathepsin B is active on a small synthetic substrate

In a previous study, a low catalytic activity against the substrate 7-*N*-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginylamide-4-methylcoumarin (Z-Arg-Arg-NH-MEC) was detected during the early stages of autocatalytic activation of procathepsin B, although it was not clear

whether this activity belonged to the zymogen [14]. To address this question, the possible activity of procathepsin B on this substrate was investigated by zymography. Recombinant human procathepsin B and cathepsin B were produced in *Escherichia coli* and thus represented nonglycosylated enzymes. Initially, procathepsin B, cathepsin B and inactive cathepsin B, obtained by a 2 h incubation at pH 7.6 and 37 °C [22], were applied to native PAGE. Electrophoresis was performed at pH 7.4, where procathepsin B retains its stability and cannot autoactivate [14], whereas prolonged exposure to this pH results in inactivation and unfolding of mature cathepsin B [22]. Therefore, inactive unfolded cathepsin B was used as a negative control. As expected, procathepsin B migrated as a single band, excluding the processing during electrophoresis (Fig. 1). In addition, cathepsin B migrated as a single band with a completely different mobility from unfolded cathepsin B, excluding unfolding of the enzyme during electrophoresis. In the next step, zymography was performed at pH 6.0 (i.e. a condition where no autoactivation of procathepsin B can be detected) [14]. Both cathepsin B and procathepsin B exhibited catalytic activity (Fig. 1), suggesting that procathepsin B is catalytically active. By contrast, inactivated unfolded cathepsin B did not show any activity against the fluorogenic substrate (Fig. 1). In another experiment, procathepsin B was found to hydrolyze the synthetic substrate Z-Arg-Arg-NH-MEC *in vitro* under the same conditions (i.e. pH 7.6), consistent with the zymography results. However, the hydrolysis rate was approximately 100-fold lower compared to the mature enzyme. By contrast, under these conditions, procathepsin B was unable to hydrolyze denatured

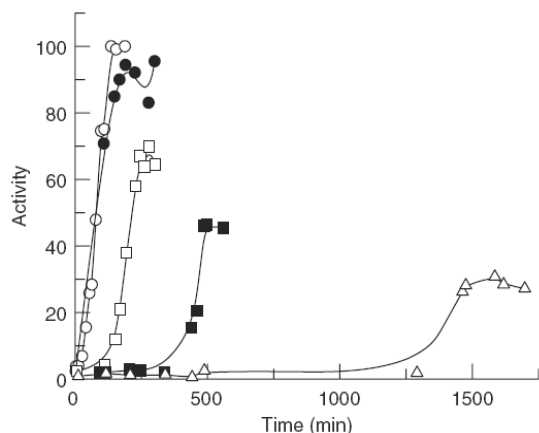


**Fig. 1.** Analysis of procathepsin B activity on Z-Arg-Arg-NH-MEC with zymography (bottom) and native PAGE (top) at pH 7.4: (1) procathepsin B; (2) cathepsin B; and (3) cathepsin B, previously inactivated by a 2 h incubation at pH 7.6 and 37 °C. Further details are provided in the Experimental procedures.

collagen type I, which was efficiently hydrolyzed by mature cathepsin B (data not shown). This is in agreement with the general idea that procathepsin B and other procathepsins cannot autocatalytically process at neutral pH due to the inhibitory role of the propeptide, although the active site is already formed and capable of hydrolyzing the substrates.

### Autocatalytic processing of procathepsin B is delayed in the presence of small molecule inhibitors

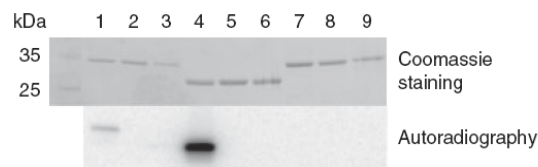
To further understand the initial steps of procathepsin B autocatalytic processing, we attempted to inhibit procathepsin B processing by addition of E-64, a broad spectrum inhibitor of cysteine proteases. The inhibitor concentrations were varied over a range that was 5–20% of the molar concentration of procathepsin B. Because processing of procathepsin B is typically 45–50% efficient, a higher inhibitor concentration would completely abolish any catalytic activity of the enzyme, thereby preventing detection of cathepsin B activity. All processing curves were sigmoid, showing a bimolecular process with negligible procathepsin B activity compared to the activity of the mature cathepsin B (Fig. 2). As demonstrated, autocatalytic processing of procathepsin B was significantly delayed in the presence of E-64, suggesting that E-64 primarily inhibited the mature enzyme. However, from this



**Fig. 2.** Autocatalytic processing of 0.17  $\mu\text{M}$  procathepsin B in the presence of 0 ( $\circ$ ), 1.7 ( $\bullet$ ), 8.5 ( $\square$ ), 17 ( $\blacksquare$ ) and 34 ( $\triangle$ )  $\mu\text{M}$  E-64 at pH 4.5 and 37  $^{\circ}\text{C}$ . Aliquots were taken from the reaction mixtures and added to 10  $\mu\text{M}$  Z-Arg-Arg-NH-MEC substrate solution. Fluorescence of the released 7-amino-4-methylcoumarin was followed continuously with a spectrofluorimeter at the excitation and emission wavelengths of 370 nm and 460 nm, respectively. Further details are provided in the Experimental procedures.

experiment, it was not possible to conclude whether E-64 could bind also to procathepsin B. Thus, to address this question, E-64 was replaced with the radioactively labelled analogue DCG-04 ( $^{125}\text{I}$ -DCG-04) [23]. The major advantage of this inhibitor is the possibility of detecting the radioactively labelled proteins by autoradiography. Samples of procathepsin B and cathepsin B were incubated in the presence of  $^{125}\text{I}$ -DCG-04 at pH 5.8 because processing was not expected to occur at this pH [14]. As shown in Fig. 3B (lower panel), both the proform and the mature form of cathepsin B were found to bind  $^{125}\text{I}$ -DCG-04, suggesting that both species are catalytically active. However, labelling of the zymogen was much weaker, suggesting a substantially slower binding of the probe to the zymogen compared to the mature enzyme.

To confirm the specific nature of interaction between DCG-04 and cathepsin B species, the enzyme samples were incubated with E-64 prior to labelling with DCG-04. E-64 at a concentration of 5  $\mu\text{M}$  completely abolished binding of  $^{125}\text{I}$ -DCG-04 to both cathepsin B species (Fig. 3, lanes 2 and 5), confirming the specific binding of the activity-based probe to the enzyme. In an additional experiment, the inactive procathepsin B Cys29Ser mutant did not label with the probe, thereby excluding nonspecific binding of the probe to the enzyme (Fig. 3, lanes 7–9). This is in agreement with specific labelling of cathepsin B and procathepsin B as the two active cathepsin species (Fig. 3, lanes 1 and 4). In the last control experiment, preheated cathepsin B samples incubated with  $^{125}\text{I}$ -DCG-04 did not label with the probe, consistent with its binding being specific (Fig. 3, lanes 3, 6 and 9).



**Fig. 3.** Labelling of procathepsin B by  $^{125}\text{I}$ -DCG-04. Five micrograms of recombinant protein (*pCatB*, procathepsin B; *CatB*, cathepsin B; *pCatB C29S*, catalytic procathepsin B mutant) were diluted into acetate buffer (pH 5.6) and incubated in the absence or presence of 5  $\mu\text{M}$  E-64 (*E-64*) for 40 min at 25  $^{\circ}\text{C}$  followed by the addition of  $^{125}\text{I}$ -DCG-04. In the control experiment, procathepsin B was pre-heated to 95  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min (*P.H.*). Samples were resolved by SDS/PAGE (10–20% gradient gel). Gels were subsequently stained with Coomassie brilliant blue R250 (upper panel) or analysed by autoradiography (lower panel). Lanes: 1, *pCatB*; 2, *pCatB* + E-64; 3, *pCatB P.H.*; 4, *CatB*; 5, *CatB* + E-64; 6, *CatB P.H.*; 7, *pCatB C29S*; 8, *pCatB C29S* + E-64; 9, *pCatB C29S P.H.*

### Identification of cleavage sites during procathepsin B autocatalytic processing

After demonstrating that the zymogen can exhibit catalytic activity, we next aimed to validate the zymogen activity on other substrates. Therefore, we performed a mutation analysis of the cleavage region between the propeptide and the mature enzyme around Met56-Phe57, which is a conserved cleavage site during processing [13,24]. All the mutants (Table 1) except the C29S variant contain a common R54N replacement in the putative P3 position, which was designed on the basis of E-64 binding to cathepsin B, where the positively charged agmatine group, structurally related to arginine, binds into the S3 substrate binding site [25]. The other mutations were focused on the P1 Met56 residue and/or on the P1'-P4' residues (Phe57Thr58-Glu59Asp60). Although the deletion mutants were expected to increase tension in the flexible C-terminal propeptide region and thus prevent cleavage in this segment, the other mutants were expected to prevent or delay cleavage due to diminished affinity [26].

Initially, processing of procathepsin B mutants was analysed by SDS/PAGE. Proenzymes were clearly present on the gel as 36 kDa bands (data not shown). After a 3 h incubation of procathepsin B mutants in the presence or absence of dextran sulfate prior to electrophoresis, 29 kDa bands corresponding to mature cathepsin B were observed (data not shown). The cleavage sites were determined by N-terminal sequencing of the mature enzymes after processing (Table 1). Most of the mutants were cleaved after Met56 (Ala56), with some additional cleavages occurring in the mutated regions with several Ala residues. However, introducing Pro in the P1 or P1' position abolished cleavage at Met56 and resulted in alternative cleavages upstream and/or downstream from the original cleavage site, thereby preventing the formation of a noncleavable procathepsin B mutant.

Next, we evaluated the activity of the mature forms resulting from the processing of procathepsin B mutants. All these forms of cathepsin B with different N-terminal extensions exhibited similar activity against Z-Arg-Arg-NH-MEC (not shown), in agreement with the idea that the neo N-terminus of mature cathepsin B is not important for its catalytic activity. Finally, the processing rates of the procathepsin B mutants were compared. To ensure equal starting concentrations, the procathepsin B variants were subjected to processing in the presence of dextran sulfate to complete the process reasonably quickly (approximately 1 h) and to prevent possible inactivation. Mature cathepsin B generated was then active-site titrated by

E-64 directly in the processing mixture to determine the processing efficiency. The processing rates of procathepsin B mutants and native procathepsin B (equal concentrations) were then determined in the presence and absence of dextran sulfate (Table 1). The R54N procathepsin B variant, which served as a basis for all other mutations, was processed at a rate almost three-fold lower than the wild-type procathepsin B, supporting the proposed important role of Arg54 in substrate recognition. Most of the other mutants were processed somewhat faster than the R54N variant. The exceptions were the T58AΔED and E59A/D60A mutants, which were processed approximately five-fold faster than the wild-type zymogen, and the F57A and F57A/T58A/E59A/D60A mutants, which were processed approximately two-fold slower. Surprisingly, the F57P mutant was processed substantially faster than the F57A mutant, probably due to different cleavage sites, which could result from stepwise processing.

Because Quraishi and Storer [21] detected a processing intermediate starting with L41, R40A and K39A/R40A mutants on the wild-type background were generated. However, the processing of these mutants, which appear to have a role in GAG binding, was up to two-fold faster than the processing of the wild-type variant ( $t_{1/2} = 28$  versus 55 min, respectively) [27]. This suggests that the Arg40-Leu41 cleavage may not be essential for processing because Arg is the preferred residue in the S1 position of cysteine cathepsins [26].

### Discussion

Zymogen activation is one of the crucial steps in regulating the activity of proteases [28,29]. Although there have been a number of attempts to explain the mechanism of autocatalytic activation of cysteine cathepsins [1,30], none have succeeded in explaining the initial activity of the proteases, which was observed at the very beginning of processing [14,18–20,27]. In addition, it has been suggested that processing may proceed through several intermediate steps, although their importance for the actual processing was not evaluated [21]. The results obtained in the present study demonstrate that the initial activity observed during processing belongs to the activity of the cathepsin B zymogen, as detected by a small synthetic substrate and affinity labelling by the activity-based probe  $^{125}\text{I}$ -DCG-04. As seen in the crystal structure of the cathepsin zymogens [7–10], the propeptide binds in the active site in a direction opposite to that of the substrate, thereby preventing substrate hydrolysis. The data thus suggest that substrate hydrolysis can be explained by the

**Table 1.** Processing of procathepsin B variants. Estimates of processing half-times of procathepsin B variants in the absence (–DS) and presence (+DS) of 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dextran sulfate, obtained by a discontinuous method, are given together with the respective SEM. The proenzyme concentration was 0.37  $\mu\text{M}$  in all the experiments. The cleavage sites determined by N-terminal amino acid sequencing after autocatalytic processing of proenzyme variants in the absence of DS are marked with arrows. Partial propeptide sequence (residues 46 to 62 of the propeptide) is given in the first line. Further details are given in the Experimental procedures.

Procathepsin B variant	–DS $t_{1/2}$ (min)	+DS $t_{1/2}$ (min)	Cleavage site
Partial propeptide sequence			<sup>46</sup> L G G P K P P Q R V M F T E D L L <sup>62</sup> K
Wild-type	60 ± 5	15 ± 1	
pcathB (R54N)	155 ± 20	16 ± 1	↓ <sup>57</sup> F T E D L
pcathB (R54N; T58AΔED)	37 ± 5	40 ± 3	↓ <sup>57</sup> F A L K L ↓ <sup>58</sup> A L K L
pcathB (R54N; ED59AA)	28 ± 5	15 ± 1	↓ <sup>57</sup> F T A A L
pcathB (R54N; TED58AAAA)	85 ± 10	17 ± 1	↓ <sup>57</sup> F A A A L
pcathB (R54N; F57A)	300 ± 50	33 ± 3	↓ <sup>57</sup> A T E D L ↓ <sup>58</sup> T E D L
pcathB (R54N; FTED56AAAA)	300 ± 50	18 ± 1	↓ <sup>55</sup> V M A T E A L ↓ <sup>57</sup> A A A L ↓ <sup>58</sup> A A A L ↓ <sup>59</sup> A A L
pcathB (R54N; M56A)	90 ± 10	16 ± 1	↓ <sup>57</sup> F T E D L
pcathB (R54N; M56P)	125 ± 40	90 ± 5	
pcathB (R54N; F57P)	80 ± 30	118 ± 5	↓ <sup>46</sup> L G G P K P P ↓ <sup>48</sup> G P K P P
pcathB (R54N; T58AΔED, M56P)	65 ± 5	41 ± 3	↓ <sup>59</sup> E D L K L P ↓ <sup>60</sup> D L K L P
pcathB (R54N; T58AΔED, M56P)	50 ± 20	50 ± 3	↓ <sup>61</sup> L K L P A ↓ <sup>61</sup> L K L P A

flexibility of the propeptide, which is presumably greatly increased at acidic pH. This is supported by *in vitro* studies of the interaction between the propeptide and mature enzymes, which demonstrated a substantially weaker affinity of the propeptides at acidic than at neutral pH [15–17].

The major outcome of the mutagenesis studies was that cathepsin B is not a very specific enzyme and is capable of cleaving procathepsin B at different sites, which is in agreement with the general broad specificity of the cathepsins [26]. Although the preferential cleavage site appears to be at the Met56-Phe57 bond, mutating Met56 or Phe57 to Pro leads to new N-terminal variants (Table 1). This prevented us from making a catalytically active, nonprocessed or partially processed zymogen, suggesting that the same probably holds true for processing of other cysteine cathepsins.

On the basis of the results obtained in the present study, as well as those of previous studies [14,17,21,27], a common mechanism for the autocatalytic processing of papain-like cysteine endoproteases is proposed. Initially, the pH change facilitates propeptide movement from its normal position within the active-site cleft in the zymogen, thereby converting the latter into an active form. This appears to be a dynamic equilibrium, which is shifted towards the inactive form at neutral pH and towards the active form at acidic pH, consistent with the inability of procathepsin B to cleave a macromolecular proteinaceous substrate at neutral pH. Moreover, this conformational change, which is the only unimolecular step of the mechanism, is not accompanied by any larger structural changes, such as unfolding of the 'hook' domain, as demonstrated previously using the catalytic Cys29-Ser procathepsin B mutant [14].

When two procathepsin B molecules come into close contact, one active zymogen molecule cleaves the propeptide from the second molecule. It is very likely that propeptide removal occurs in at least two consecutive steps, with the first one comprising the 'hook' removal, as Quraishi and Storer [21] detected several intermediate forms starting downstream of the 'hook' region (Leu41 and Cys43 from the propeptide). These shortened zymogen forms, with presumably higher enzymatic activity, facilitate the removal of the rest of the propeptide from the interacting procathepsin B molecules. Fully active mature cathepsin B molecules then enter the cycle and process the majority of the intact or partially processed zymogen molecules. It is possible that, at least initially, intermediate forms and intact zymogens are also cleaved by activated intact and partially processed zymogens. This is in agreement with the findings of a study [31] demonstrating that the trun-

cated procathepsin B zymogens, resulting from a gene lacking exons 2 and 3 and with a propeptide shortened by 34 residues, possess substantial catalytic activity. Glycosaminoglycans, which can facilitate autocatalytic activation of cysteine cathepsins, were shown to induce a conformational change in procathepsin B upon binding, resulting in propeptide removal from the active site cleft and conversion of the zymogen into a better substrate for mature cathepsin B [27]. Moreover, such procathepsin B processing was observed during a purification step on heparin Sepharose, even at pH 7.6, demonstrating their extreme efficiency (data not shown). In addition to glycosaminoglycans, other charged surfaces were found to enable autocatalytic processing at neutral pH because the processing of procathepsin B during filtration through microcon cellulose membrane at pH 7.6 was also observed (data not shown). The molecular mechanism of cathepsin activation induced by pH lowering and/or by glycosaminoglycans is probably similar in both cases, with the only difference being that glycosaminoglycans and other negatively charged surfaces are much more efficient and can facilitate processing also at a higher pH. Therefore, it is proposed that this unimolecular conformational change has a dual role: first, it converts the zymogen into an active form and, second, it converts the zymogen into a better substrate, although the latter may be more applicable to glycosaminoglycans [27].

*In vivo* processing of cysteine cathepsins is probably more complex. The relative insensitivity of procathepsin B processing to mutations in the linker region suggests that cathepsins are well adapted to the cellular environment, and explains why they can be activated by multiple proteases [1,30,32]. All these different pathways of activation may thus account for the presence of active cathepsin or procathepsin species outside lysosomes, which, under normal conditions, are held under the control of endogenous inhibitors, such as cystatins and serpins [33]. However, the existence of extralysosomal and extracellular cathepsins in disease is not only linked to the secretion of various cathepsin forms from lysosomes and subsequent processing at the membranes, but also likely results from differential trafficking and synthesis because different splice variants of cathepsins are found primarily in cancer [3,5,31]. Moreover, the fact that cathepsin zymogens are very resistant towards pH-induced inactivation, combined with their ability to be readily activated even under unfavourable conditions, poses a persistent threat to the system, which cannot be so easily eliminated because zymogens are resistant to inhibition by endogenous inhibitors.

In conclusion, procathepsin B was found to be an active species, suggesting that autocatalytic activation of cysteine cathepsins is a multi-step process, starting with a unimolecular conformational change of the zymogen, which unmasks the active site and, in the presence of negatively charged molecules/surfaces, also converts the zymogen into a better substrate. This is followed by the bimolecular proteolytic removal of the propeptide, which can be accomplished in one or more steps. Such active cathepsin species could have important roles in physiology, including the development of several diseases such as cancer and arthritis.

## Experimental procedures

### Materials

Restriction enzymes were obtained from MBI Fermentas (Burlington, Canada) and New England Biolabs (Stevenage, UK); T4 DNA ligase was obtained from Roche (Basel, Switzerland); polynucleotide T4 kinase was obtained from MBI Fermentas; and *Vent* DNA polymerase was obtained from New England Biolabs. Oligonucleotides were obtained from MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). Z-Arg-Arg-NH-MEC was obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland); E-64 was obtained from the Peptide Research Institute (Osaka, Japan); and dextran sulfate was obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). DCG-04 was prepared as described previously [23].

Procathepsin B and its mutants were synthesized in *E. coli* and purified as described previously [12]. The recombinant proteins were nonglycosylated as a consequence of the expression system. However, all the potential glycosylation sites are located on the surface of the protein pointing towards the solvent and thus do not interfere with glycosaminoglycan binding, autocatalytic activation of the zymogen or activity of the mature enzyme [9,13,27]. All proteins were verified by SDS/PAGE and N-terminal amino acid sequence analysis. Protein concentrations were determined from absorption spectra according to Pace *et al.* [34]. The active proenzyme concentrations were determined by activation and active-site titration of the resulting enzyme with E-64 [35].

### Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis was performed using PCR as described by Michael [36]. The plasmid and outer primer oligonucleotides used were constructed by Kuhelj *et al.* [12]. The mutagenic oligonucleotides (5'-CCACCCAGAACGTATGTTTACCG-3' and 5'-GCTCCTCTGGCCTT-3') were used to introduce the R54N and C29S substitutions, respectively (where the C29S mutation substituted active-site Cys29 on the mature part of the enzyme to a serine

residue). Additional mutants were prepared using a vector with cDNA for *pcatB*(R54N) as a template and the following mutagenic oligonucleotides: 5'-CCAGAACGTTATGTTTGCAGTGAAGCTGCCTGC-3' (for the T58A $\Delta$ ED mutant: R54N, T58A, deletion of E59 and D60); 5'-GAACGTTATGTTTACCGCAGCTCTGAAGCTGCCTGC-3' (for the ED59AA mutant: R54N, E59A, D60A); 5'-CCAGAACGTTATGTTTGCAGCTGCACTGAAGCTGCCTGC-3' (for the TED58AAA mutant: R54N, T58A, E59A, D60A); 5'-CCCAGAACGTTATGGCTGCAGCTGCACTGAAGCTGCCTGC-3' (for the FTED57AAAA mutant: R54N, F57A, T58A, E59A, D60A); 5'-CCAGAACGTTATGGCTACCGAGGACCTGAAGC-3' (for the F57A mutant: R54N, F57A); 5'-CCAGAACGTT(GC)CGTTTACCGAGG-3' (a degenerate primer for M56A and M56P mutants: R54N, M56A and R54N, M56P, respectively); and 5'-GAA CGTTATGCCGACCGAGGACC-3' (for F57P mutant: R54N, F57P). The second set of mutants were prepared using the vector with cDNA for *pcatB* (R54N, T58A, deletion of E59 and D60) as a template and mutagenic primers: 5'-CCAGAACGTTCCGTTTGCAGTGA-3' (for T58A $\Delta$ ED\_M56P mutant: R54N, M56P, T58A, deletion of E59 and D60) and 5'-GAACGTTATGCCGCACTGAGCT-3' (for T58A $\Delta$ ED\_F57P mutant: R54N, F57P, T58A, deletion of E59 and D60). Mutagenic oligonucleotides were phosphorylated by T4 polynucleotide kinase prior to the mutagenesis reaction. Each PCR mixture (100  $\mu$ L) contained 500 ng of a plasmid template, 50 pmol of each of the three oligonucleotides (the two outer and a mutagenic one), 20 nmol of each of the four deoxynucleoside triphosphates, Taq DNA ligase buffer, 5 U of *Vent* DNA polymerase and 5 U of Taq DNA ligase. After 35 cycles of PCR amplification (94 °C for 60 s; 50 °C for 60 s; 65 °C for 240 s), the PCR products were cleaned by the QIAEX II extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and cloning was carried out as described previously [12]. Propeptide numbering is used throughout, unless stated otherwise.

### Kinetic measurements

Processing of procathepsin B and its mutants was examined at 37 °C and pH 4.5 (0.1 M acetate buffer, containing 1 mM EDTA and 5 mM dithiothreitol) as described by Rozman *et al.* [14]. Proenzyme (0.17–1.33  $\mu$ M) was incubated in 1 mL of the processing buffer. Aliquots of 5, 10 or 20  $\mu$ L were taken from the reaction mixtures at appropriate times and added to 2.495–2.48 mL of 10  $\mu$ M Z-Arg-Arg-NH-MEC substrate solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 1 mM EDTA and 0.1% (w/v) polyethylene glycol 6000 (Serva, Wichita Falls, TX, USA). Fluorescence of the released 7-amino-4-methylcoumarin was followed continuously with a C-61 spectrofluorimeter (Photon Technology International, Birmingham, NJ, USA) at the excitation

and emission wavelengths of 370 and 460 nm, respectively. When specified, processing was accelerated by the addition of dextran sulfate (25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) or decelerated by the addition of E-64 in the processing buffer. The final concentration of procathepsin B variants in the processing buffer was 0.37  $\mu\text{M}$  throughout.

#### Detection of $^{125}\text{I}$ -DCG-04-labelled proteins

Proteins (1.7  $\mu\text{g}$ ) were incubated in 50 mM sodium acetate (pH 5.8) containing 5 mM dithiothreitol, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA in the presence or absence of 5  $\mu\text{M}$  E-64 for 40 min at 25 °C, followed by the addition of small amounts of radioactive probe  $^{125}\text{I}$ -DCG-04 and an additional 40 min of incubation under the same conditions. In a control experiment, protein sample was incubated for 5 min at 95 °C prior to the addition of  $^{125}\text{I}$ -DCG-04. The samples were then separated by SDS/PAGE and stained with Coomassie brilliant blue R250 or visualized by autoradiography using a Typhoon Trio (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) as described previously [23].

#### N-terminal amino acid analysis

Procathepsin B variants (1.0–3.15  $\mu\text{g}$ ) were incubated in the processing buffer at 37 °C for 3 h. The products were separated by SDS/PAGE under reducing conditions on 12.5% gels and electroblotted to poly(vinylidene difluoride) membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The protein bands were subjected to Edman degradation on an Procise 492A protein sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### Native polyacrylamide gel electrophoresis and zymography

Native PAGE was performed on a 7% gel at pH 7.4 as described by McLellan [37]. After electrophoresis, the gel was incubated for 5 min in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 10 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 0.1% (w/v) polyethylene glycol 6000, and covered by 5 mL of 40  $\mu\text{M}$  substrate Z-Arg-Arg-NH-MEC in the same buffer. Fluorescence of the released product was monitored under an UV lamp. The gel was stained subsequently with Coomassie brilliant blue R250.

#### Acknowledgements

We thank Adrijana Leonardi for N-terminal amino acid sequencing and Professor Roger H. Pain for critical reading of the manuscript. The work was supported by grants (P0140 and J1-6488) to B.T. and V.T. from the Slovenian Ministry of Higher Education, Science and Technology and by the Human Frontier

Science Project Grant RGP0024/2006-C to B.T. and M.B. The work was further supported by National Institutes of Health National Technology Center for Networks and Pathways grant U54 RR02084 to M.B. and Sandler Family Supporting Foundation grant to M.S.

#### References

- 1 Turk B, Turk D & Turk V (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 98–111.
- 2 Turk V, Turk B & Turk D (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* **20**, 4629–4633.
- 3 Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk V & Turk B (2007) Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des* **13**, 387–403.
- 4 Kos J & Lah TT (1998) Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep* **5**, 1349–1361.
- 5 Mohamed MM & Sloane BF (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 764–775.
- 6 Baici A, Lang A, Horler D, Kissling R & Merlin C (1995) Cathepsin B in osteoarthritis: cytochemical and histochemical analysis of human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* **54**, 289–297.
- 7 Coulombe R, Grochulski P, Sivaraman J, Menard R, Mort JS & Cygler M (1996) Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J* **15**, 5492–5503.
- 8 Cygler M, Sivaraman J, Grochulski P, Coulombe R, Storer AC & Mort JS (1996) Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure* **4**, 405–416.
- 9 Podobnik M, Kuhelj R, Turk V & Turk D (1997) Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen. *J Mol Biol* **271**, 774–788.
- 10 Turk D, Podobnik M, Kuhelj R, Dolinar M & Turk V (1996) Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Å resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett* **384**, 211–214.
- 11 Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC & Salvesen GS (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* **104**, 791–800.
- 12 Kuhelj R, Dolinar M, Pungercar J & Turk V (1995) The preparation of catalytically active human cathepsin

- B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *Eur J Biochem* **229**, 533–539.
- 13 Mach L, Mort JS & Glossl J (1994) Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J Biol Chem* **269**, 13030–13035.
  - 14 Rozman J, Stojan J, Kuhelj R, Turk V & Turk B (1999) Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett* **459**, 358–362.
  - 15 Carmona E, Dufour E, Plouffe C, Takebe S, Mason P, Mort JS & Menard R (1996) Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* **35**, 8149–8157.
  - 16 Fox T, de Miguel E, Mort JS & Storer AC (1992) Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* **31**, 12571–12576.
  - 17 Quraishi O, Nägler DK, Fox T, Sivaraman J, Cygler M, Mort JS & Storer AC (1999) The occluding loop in cathepsin B defines the pH dependence of inhibition by its propeptide. *Biochemistry* **38**, 5017–5023.
  - 18 Baker KC, Taylor MA, Cummings NJ, Tunon MA, Worboys KA & Connerton IF (1996) Autocatalytic processing of pro-papaya proteinase IV is prevented by crowding of the active-site cleft. *Protein Eng* **9**, 525–529.
  - 19 Mason RW, Gal S & Gottesman MM (1987) The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L. *Biochem J* **248**, 449–454.
  - 20 McQueney MS, Amegadzie BY, D'Alessio K, Hanning CR, McLaughlin MM, McNulty D, Carr SA, Ijames C, Kurdyla J & Jones CS (1997) Autocatalytic activation of human cathepsin K. *J Biol Chem* **272**, 13955–13960.
  - 21 Quraishi O & Storer AC (2001) Identification of internal autoproteolytic cleavage sites within the prosegments of recombinant procathepsin B and procathepsin S. Contribution of a plausible unimolecular autoproteolytic event for the processing of zymogens belonging to the papain family. *J Biol Chem* **276**, 8118–8124.
  - 22 Turk B, Dolenc I, Žerovnik E, Turk D, Gubenšek F & Turk V (1994) Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site. *Biochemistry* **33**, 14800–14806.
  - 23 Greenbaum D, Medzihradzky KF, Burlingame A & Bogyo M (2000) Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chem Biol* **7**, 569–581.
  - 24 Rowan AD, Mason P, Mach L & Mort JS (1992) Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J Biol Chem* **267**, 15993–15999.
  - 25 Turk D, Podobnik M, Popovič T, Katunuma N, Bode W, Huber R & Turk V (1995) Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-Å resolution: a basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors. *Biochemistry* **34**, 4791–4797.
  - 26 Turk D, Gunčar G, Podobnik M & Turk B (1998) Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem* **379**, 137–147.
  - 27 Caglič D, Pungerčar JR, Pejler G, Turk V & Turk B (2007) Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *J Biol Chem* **282**, 33076–33085.
  - 28 Neurath H (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**, 350–357.
  - 29 Turk B (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 785–799.
  - 30 Bromme D, Nallaseth FS & Turk B (2004) Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods* **32**, 199–206.
  - 31 Mehtani S, Gong Q, Panella J, Subbiah S, Peffley DM & Frankfater A (1998) In vivo expression of an alternatively spliced human tumor message that encodes a truncated form of cathepsin B. Subcellular distribution of the truncated enzyme in COS cells. *J Biol Chem* **273**, 13236–13244.
  - 32 Dalet-Fumeron V, Boudjennah L & Pagano M (1996) Competition between plasminogen and procathepsin B as a probe to demonstrate the in vitro activation of procathepsin B by the tissue plasminogen activator. *Arch Biochem Biophys* **335**, 351–357.
  - 33 Turk B, Turk D & Salvesen GS (2002) Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des* **8**, 1623–1637.
  - 34 Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G & Gray T (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411–2423.
  - 35 Turk B, Križaj I, Kralj B, Dolenc I, Popovič T, Bieth JG & Turk V (1993) Bovine stefin C, a new member of the stefin family. *J Biol Chem* **268**, 7323–7329.
  - 36 Michael SF (1994) Mutagenesis by incorporation of a phosphorylated oligo during PCR amplification. *Biotechniques* **16**, 410–412.
  - 37 McLellan T (1982) Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. *Anal Biochem* **126**, 94–99.

**Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis**

Urška Požgan<sup>1</sup>, Dejan Caglič<sup>1</sup>, Blaž Rozman<sup>2</sup>, Hideaki Nagase<sup>3</sup>, Vito Turk<sup>1</sup> and Boris Turk<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jožef Stefan Institute, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup>Department of Rheumatology, University Medical Centre Ljubljana, Vodnikova cesta 62, 1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>3</sup>Kennedy Institute of Rheumatology Division, Imperial College London, London W6 8LH, United Kingdom

<sup>4</sup>Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Aškerčeva cesta 5, 1000 Ljubljana, Slovenia

\*Corresponding author: Fax: +386 1 477 3984, Tel.: +386 1 477 3772, E-mail: [boris.turk@ijs.si](mailto:boris.turk@ijs.si)

Running title: Proteases in arthritic synovial fluids

## Abstract

Cysteine cathepsins and matrix metalloproteases are considered to play important roles in the development of arthritic diseases. Their accumulation in synovial fluid of primarily rheumatoid arthritis patients is also well documented. However, a detailed comparison between the protease levels and activities between rheumatoid arthritis samples and osteoarthritis samples has never been made. Here we report that both cysteine cathepsins B and S and matrix metalloproteases-1, -3 and -13 have been detected in patient synovial fluid samples with significantly higher levels detected in rheumatoid arthritis patients. Among the proteases, cathepsin S was found to be significantly elevated, consistent with its critical role in the immune response. These results suggest that cysteine cathepsins have a major role in inflammation at least in RA. In addition to proteases, interleukin-6 was detected at significant levels in most samples, suggesting that proinflammatory cytokines may be involved in the stimulation of expression of these proteases during inflammation.

## Keywords

Cysteine cathepsins; matrix metalloproteinases; osteoarthritis; proinflammatory cytokines; rheumatoid arthritis; synovial fluid

## Abbreviations

Abu (2-aminobutyric acid); Abz (aminobenzoic acid); AMC (7-(4-methyl)coumarylamide); Bz (benzoyl); Cha (D-cyclohexylalanine); Cys(Me) (cysteine methyl ester); Dpa ((2,4-dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl); Dnp (2,4-dinitrophenol); IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ); IL-6 (interleukin-6); MCA (7-methoxy-coumarin-4-yl)acetyl); Me (methyl); MMP (matrix metalloproteinase); N-Me-Abz (N-methylanthranilic acid); Nva (norvaline); OA (osteoarthritis); P (probability); RA (rheumatoid arthritis); TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ ); Z (benzyloxycarbonyl)

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) are two major types of joint diseases in humans. RA is characterized by a chronic proliferative synovitis, which is caused by abnormal immunological reactions and exhibits hyperplasia of the synovial lining cells, inflammatory cell

infiltration and angiogenesis. Moreover, synovitis was shown to play a key role in the destruction of articular cartilage and bone in RA (Kramer et al., 2003). On the other hand, OA is primarily a disease of cartilage that is characterized by degradation of the articular cartilage by proteases released from the articular chondrocytes. Inflammation in the adjacent synovial membrane is not prominent during early stages of the disease, although in the advanced stages of the disease synovitis may have been observed resulting in the production of proteases and modulation of the chondrocyte function (Wieland et al., 2005).

The irreversible joint changes are mediated by the excessive protease activities resulting from the increased expression of various proteases, in particular cysteine cathepsins and metalloproteases, including matrix metalloproteases (MMPs) and aggrecanases, and/or altered equilibrium between these proteases and their endogenous inhibitors (Keyszer et al., 1998; Murphy and Nagase, 2008; Vasiljeva et al., 2007). Both cysteine cathepsins and MMPs were shown to be involved in the degradation of extracellular matrix (ECM) components such as different types of collagens, proteoglycans, elastin, fibronectin and laminin (Maciewicz et al., 1987; Murphy and Nagase, 2008; Rengel et al., 2007; Trabandt et al., 1991). However, an increasing number of expression profiling of synovial tissues and synovial fluids from patients with RA, and analyses of experimental arthritis, such as collagen-induced arthritis or the TNF-transgenic model, have shown important insights into the mechanisms of rheumatoid joint destruction with the pivotal role of cysteine cathepsins in the development of arthritis (Ibrahim et al., 2002; Schurigt et al., 2005). Levels of cathepsins B and L have been found to be increased in the RA synovial membrane, particularly at the sites of bone and cartilage erosion. Cathepsin S, on the other hand, is the major enzyme involved in the major histocompatibility complex class II antigen processing and presentation (Riese et al., 1998; Turk et al., 2002b). Moreover, cathepsin S knock-out mice exhibited decreased susceptibility to collagen-induced arthritis and impaired processing of invariant chain in both dendritic cells and B cells, consistent with the critical role of the enzyme in the immune response (Nakagawa et al., 1999).

In addition to their ability to cleave almost all components of the ECM and thus contribute to the development and progression of different types of arthritis, MMPs were also found to process other proteases and protease inhibitors (Murphy and Nagase, 2008). They are produced by chondrocytes as well as synoviocytes, especially when stimulated by IL-1 (Nakamura et al., 2006). Among them, MMP-1, MMP-3 and MMP-13 have been most often linked with different arthritic diseases

(Murphy and Nagase, 2008). Moreover, due to its preferential degradation of the type II collagen over the type I and the type III collagen, MMP-13 was suggested to be the most important enzyme for the degradation of collagen within cartilage (Cawston and Wilson, 2006).

Besides proteases, various proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ ) and IL-6 (interleukin-6), are key players in the progression and development of arthritic diseases. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are both expressed in synovial lining cells and have been reported to be present in the serum of patients with RA and OA. Furthermore, they were shown to induce expression and/or secretion of various matrix-degrading proteases, such as MMPs and cysteine cathepsins (Feldmann et al., 1996; Goldring and Goldring, 2004; Shi et al., 2004).

Despite the clear role of selected proteases and proinflammatory cytokines in both RA and OA, little or no comparison has been made between the two diseases. In order to address this question, we have focused on the levels and activities of several cysteine cathepsins and MMPs in synovial fluid samples. Proteases have been detected in all samples with significantly higher levels and activities detected in patients with rheumatoid arthritis when compared to patients with osteoarthritis, suggesting that proteases may play important roles in different types of arthritis and that they are suitable markers and/or therapeutic drug targets in these diseases.

## Results

### *Clinical characteristics of the patients*

Clinical characteristics of the patients with RA and OA are shown in Table 1. The majority of patients with either disease were females. The mean age of the representative group of patients with RA was (56.12  $\pm$  9.60) years and (57.71  $\pm$  17.33) years for patients with OA. All the patients were in the late stage of disease progression and most of them were receiving different treatments at the time of sampling.

### *Proteinase activity in synovial fluid samples*

As proteolytic activities have been previously found in the synovial fluids of RA patients, in the initial set of experiments the activities of selected cysteine cathepsins (B, L and S) and MMPs (MMP-1, MMP-3 and MMP-13), which had previously been shown to be involved in the development and/or progression of the arthritic diseases, were determined in the synovial fluid samples from patients with RA or OA (Figure 1 and 2). All synovial fluid samples efficiently hydrolyzed Z-Phe-Arg-AMC, which is a general substrate for all cysteine cathepsins, suggesting that active cysteine

cathepsins were present in the samples. In order to distinguish between the activities of different cathepsins, two more selective substrates have been used. Bz-Phe-Val-Arg-AMC, which is a considerably more selective cathepsin S substrate, was hydrolyzed with about the same efficiency as Z-Phe-Arg-AMC, suggesting that most of the activity could be predominantly attributed to cathepsin S, and not to cathepsins B or L. The latter two enzyme activities were confirmed by the measurements of Z-Arg-Arg-AMC hydrolysis, characteristic for cathepsin B activity, which was very low in comparison with the hydrolysis of the other two substrates. However, although the patterns were the same in both RA and OA samples, significantly higher ( $P < 0.05$  for all fluorogenic substrates) activities of cysteine cathepsins were detected in samples from RA patients than from OA patients. Moreover, the cathepsin activities were for an order of magnitude higher in the sample of one patient who refused the therapy (not shown), although this is not statistically significant.

Next, we measured the activities of selected MMPs, namely MMP-1, MMP-3 and MMP-13, which have been shown to have a major role in the ECM degradation. We found significantly ( $P < 0.01$ ) higher levels of MMP-3 and MMP-13 activities in RA patients when compared with OA patients. In contrast to the dramatically increased activities of cysteine cathepsins in the sample of the RA patient without treatment, the activities of MMPs in the same sample were comparable to the other samples. When the activity profiles of MMP-3 and MMP-13 were compared, no significant differences were observed (Figure 2), suggesting that they may equally contribute to ECM degradation during the disease development. Surprisingly, no MMP-1 activity was observed in the synovial fluid samples under our experimental conditions.

### *Expression levels of selected cysteine cathepsins, cystatin C and MMPs in SF samples*

Having found that several proteases were present in the samples, we next wanted to evaluate the amounts of these proteases in the samples by Western blot analysis. Major focus was on cathepsin S and MMP-3, for which the highest activities were observed. In addition, we also wanted to evaluate the levels of cathepsin B and MMP-1, which were previously reported to be present in synovial fluid (Hashimoto et al., 2001; Tchetcherikov et al., 2005), as well as the level of cystatin C, the major extracellular cathepsin inhibitor (Turk et al., 2002a). When the samples were probed for cathepsin S, only a single band of ~ 28 kDa was observed in all the samples, corresponding to mature cathepsin S (Figure 3A). However, more cathepsin S was observed in RA samples as compared with OA, in agreement with

the higher activities of cathepsin S measured in RA samples. Very interesting results were observed for cathepsin B. While a strong signal corresponding to procathepsin B (45 kDa; Figure 3B) was detected in the RA samples, only a faint band corresponding to the heavy chain of the mature cathepsin B (26 kDa; Figure 3B) was observed in the same samples. In contrast, virtually no signal corresponding to either pro or the mature cathepsin B was detected in OA samples (Figure 3B). This is consistent with the low activity of cathepsin B observed in the RA samples and essentially no activity detected in the OA samples. As cathepsin activities could also be affected by the extracellular endogenous inhibitors, the synovial fluid samples were also probed for cystatin C, the major extracellular inhibitor of the cathepsins. All samples were cystatin C-positive, but the levels did not differ markedly between the RA and the OA patients (Figure 3C).

As the highest activity among MMPs was observed for MMP-3, we also expected to determine relatively high levels of the MMP-3 protein, at least in the RA samples. However, whereas significant amount of pro-MMP-3 (~ 56 kDa) form was detected in all the patients (Figure 4B), surprisingly no mature form of the enzyme was observed in any of the samples. Despite the fact that no MMP-1 activity was detected, a strong signal corresponding to pro-MMP-1 (~ 54 kDa; Figure 4A) was observed in the RA patients and the signal was slightly less intense in the OA patients. The weaker signal at ~ 27 kDa in both groups of patients is a degradation product of MMP-1.

#### *Measurement of cathepsin S and cytokine concentrations in SF samples*

In order to quantify the amount of cathepsin S, which is the major proinflammatory cysteine cathepsin, and of selected proinflammatory cytokines in synovial fluids of the patients, different ELISA assays were performed. All data are summarized in Table 2. The cathepsin S protein was detected in all the patients with no significant differences ( $P = 0.41$ ) observed between the two diseases. An average concentration of 64.71 ng/ml of cathepsin S was found in the RA patients and 43.76 ng/ml in the OA patients. Interleukin-6 (IL-6) was also detected in all samples with significantly higher concentrations in the RA patients ( $P < 0.01$ ). An average concentration of IL-6 in patients with RA was 16.74 ng/ml and in patients with OA 2.0 ng/ml. In contrast, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), a major proinflammatory cytokine, was detected in a single synovial fluid sample (23.30 ng/mL) from the RA patient without therapy. Finally, detectable levels of another potent proinflammatory cytokine, tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), were observed in four RA patients only with the average concentration of 27.63 pg/mL. The low number of TNF- $\alpha$ -positive samples precluded any further statistical analyses.

## Discussion

Progressive joint damage, mediated by excessive protease activities, is one of the most important predictors of the long-term outcome in RA and OA. Therefore, the proteases involved are suitable diagnostic markers for RA and OA and have also been validated as suitable drug targets for both diseases (Keyszer et al., 1998; Murphy and Nagase, 2008; Turk, 2006; Vasiljeva et al., 2007). Since prolonged synovitis is known to result in an excessive production of synovial fluid, the latter represents a rich source of proteases secreted from synovial lining cells or infiltrated inflammatory cells. In this study, cysteine cathepsins B and S and MMP-1, MMP-3 and MMP-13 were found to be differentially expressed and/or exhibited different activities in the synovial fluid samples of the late-stage patients with RA or OA. Higher expression levels and activities of all proteases tested were consistently observed in RA patients as compared with OA patients. This could be linked with the primarily inflammatory nature of RA, which is crucial for the disease progression, whereas it seems to be of lesser importance in OA. Since cysteine cathepsins, in particular cathepsin S, are known as critical mediators of the MHC class II-mediated immune response, which plays a major role in RA, their high activities are in agreement with this model (Nakagawa et al., 1999). Anti-inflammatory therapies are thus expected to at partially dampen protease activities and expression levels at least in RA. In agreement with this idea, the single RA patient who refused to receive any treatment, had largely increased cysteine cathepsin levels and activities (~ 10-fold), when compared to the other RA patients who received various anti-inflammatory therapies to ease the symptoms (Table 1). This pattern was not observed for the activities of matrix metalloproteinases, although they take part in the generation of the inflammation. Further more, our data are consistent with the important role of cysteine cathepsins in the generation of the inflammatory response. In contrast, in the group of OA patients the protease activities or levels were not significantly altered by the therapy, further supporting the lesser importance of inflammation for the progression of OA.

The important role of cysteine cathepsins in OA and RA has been further supported by a study in a mouse model of experimental inflammatory arthritis, where selective cysteine cathepsin inhibitors (peptidyl fluoromethyl ketones) decreased the severity of the disease (Esser et al., 1994). Consistent with this and the previous results on expression profiles of the proteases in a mouse model of collagen-induced arthritis (Schurigt et al., 2005), cathepsin S was, based on the activity data and expression levels, found to be the most

prominent among the cysteine cathepsins in synovial fluid samples. Furthermore, cathepsin S knock-out mice revealed a decrease in their susceptibility to collagen-induced arthritis and impaired invariant chain processing both in dendritic cells and B cells (Nakagawa et al., 1999). This suggests that cathepsin S is mediating antigen presentation in different immune cells and is the driving factor in maintaining the inflammatory nature of RA. This is further supported by the finding that several gold derivative DMARDs, which have been in clinics for a long time, efficiently inhibited cathepsins S and K *in vitro* and in cells (Weidauer et al., 2007). Although cathepsin B was also present in the synovial fluids of primarily RA patients, it was only found in the latent zymogen form, thereby suggesting being of lesser importance. Such latent procathepsin B forms have been found previously in human chondrocytes cultured from OA patients (Berardi et al., 2001), where they were suggested to be capable of further autoactivation in a proper milieu (Caglić et al., 2007; Mort and Recklies, 1986; Rozman et al., 1999). However, no active cathepsin B has been found in the samples of either RA or OA patients. Although this is in apparent contrast with some previous results on synovial fluid samples of patients with RA (Gabrijelčić et al., 1990; Hashimoto et al., 2001; Lenarčič et al., 1988), these data are consistent with the activity data showing almost no activity on the cathepsin B substrate Z-Arg-Arg-AMC. Nevertheless, due to the possibility that such latent precursor forms could be activated, they represent a permanent threat for the system, especially since cathepsin B has been found to activate MMP precursors such as procollagenase and prostromelysin and could thus accelerate the proteolytic events contributing to the progression of the disease (Cunnane et al., 1999). Although cystatin C, the major extracellular endogenous cysteine cathepsin inhibitor, has been found in samples of both RA and OA patients, its active role could not have been confirmed as significant cathepsin activity was detected in all the samples. In addition to cysteine cathepsins, the levels of the three major MMPs linked with inflammatory processes in OA and RA, MMP-1, MMP-3 and MMP-13, were also found to be increased in the samples. MMP-3 activity levels in synovial fluid samples were found to be considerably higher in patients with RA than in patients with OA, in agreement with the studies of MMP-3 knockout mice, which suggest that MMP-3 is an important activator of other MMPs, especially procollagenases in the cartilage and that the absence of MMP-3 significantly reduces tissue degradation in immune-mediated complex model of arthritis and in antigen-induced arthritis (van Meurs et al., 1999a; van Meurs et al., 1999b). Although we did not detect proteolytic activity of MMP-1,

the protein was present in synovial fluid samples, consistent with its important role in arthritic diseases (Cunnane et al., 1999). The increased activity of the third major MMP, MMP-13, is also supporting previous studies in human OA (Mitchell et al., 1996) and RA (Lindy et al., 1997), where MMP-13 was reported to be expressed by both chondrocytes and synoviocytes. These data collectively demonstrate that MMPs are, in addition to cysteine cathepsins, important factors contributing to the arthritic disease progression, in agreement with previous evidence.

The most likely explanation for the increased protease levels in synovial fluids samples of RA patients compared to OA is their transcriptional regulation by the proinflammatory cytokines as suggested earlier (Shi et al., 2004). Moreover, proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  that are preferentially up-regulated in RA, have been identified as key players in the rheumatoid inflammation and destruction of ECM in RA and OA (Feldmann et al., 1996; Goldring and Goldring, 2004). A plausible explanation for the detection of IL-6 only, but not IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , at significant levels in all patients, is that all the samples were withdrawn at a late stage of disease progression, while IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are known to be involved in the initiation of the immune response thereby being considered as early stage cytokines (Kagari et al., 2002). Moreover, the statistically significant almost 10-fold higher levels of IL-6 in RA as compared to OA are consistent with the primarily inflammatory nature of RA. The major importance of the proinflammatory cytokines for RA progression is well documented and blockade of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , preventing their binding to the receptor(s), by DMARDs (disease modifying antirheumatic drugs) is one of the major approaches currently used in anti-RA therapy (Smolen and Steiner, 2003), thereby supporting our results.

In conclusion, synovial fluids from RA and OA patients showed pronounced differences in protease activities and protein levels, suggesting that severe inflammation is primarily accompanying RA, but not OA. Especially cathepsin S was significantly upregulated, consistent with its crucial role in MHC-II mediated immune response. Cathepsin S and MMP-3 and -13, together with IL-6, can therefore be considered as suitable markers for RA and also OA, whereas selectively blocking cathepsin S is likely to be beneficial for diminishing the immune response in RA in humans as well.

## Materials and methods

### Reagents and proteins

Synthetic peptidic substrates for cysteine cathepsins Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC, Bz-Phe-Val-Arg-AMC and MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH<sub>2</sub> (substrate for MMP-3) were purchased from Bachem, Bubendorf, Switzerland; MCA-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH<sub>2</sub> (substrate for MMP-13) and DNP-Pro-Cha-Abu-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH<sub>2</sub> (substrate for MMP-1) were obtained from Calbiochem, Darmstadt, Germany. The general cysteine inhibitor E-64 was obtained from Peptide Institute, Osaka, Japan. Mouse monoclonal antibodies against MMP-1 (ab38923) and against MMP-3 (ab38907) were from Abcam, Cambridge, UK. Mouse monoclonal anti-cathepsin B (3E1), rabbit polyclonal anti-cathepsin S and rabbit polyclonal anti-cystatin C antibodies were prepared in our laboratory. All horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, United Kingdom; ECL WB detection reagent was purchased from GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Germany. Commercially available ELISA assays for cathepsin S and TNF- $\alpha$  were obtained from R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany, and for IL-1 $\beta$  and IL-6 from Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA. Recombinant cathepsin B (Kuhelj et al., 1995), cathepsin S (Mihelič et al., 2008), cystatin C (Cimerman et al., 1999), MMP-1 (Chung et al., 2000) and MMP-3 (Suzuki et al., 1998) were prepared according to published protocols.

### Patients' characteristics

Synovial fluid samples were obtained from knee joints of patients with either RA or OA. A total of 16 samples of SF were collected, including 9 samples from patients with RA and 7 samples from patients with OA. Synovial fluids were immediately centrifuged (300 x g, 15 min, 4°C) to remove the cells and the supernatants were then aliquoted and stored at -80°C until further use. Patients' characteristics, inflammatory parameters from the blood samples obtained and the type(s) of therapy at the time of sampling are shown in Table 1. Patients with RA, with the exception of the patient number 6, who refused to receive any therapy, were receiving one or more disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs), such as methotrexate, sulfasalazine and resochine, three of them in combination with the glucocorticoid methylprednisolone. A single RA patient was receiving only the TNF- $\alpha$  inhibitor infliximab. On the other hand, patients with OA were receiving either nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as meloxicam or diclofenac, or the

analgesic tramadol hydrochloride, whereas for three patients no therapy data are available.

### Quantitative determination of cathepsin S and cytokine concentrations in synovial fluid

Protein concentrations of cathepsin S, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 were determined using the commercially available ELISA assays according to the manufacturers' instructions with cut-off points of 15.6 pg/ml (for cathepsin S and TNF- $\alpha$ ) and 10.24 pg/ml (for IL-1 $\beta$  and IL-6).

### Gel electrophoresis and Western blot analysis for cathepsins B and S, cystatin C and matrix metalloproteinases -1 and -3

Synovial fluids were diluted 10-times in dH<sub>2</sub>O to a final volume of 100  $\mu$ l and SDS loading buffer was added. Aliquots of 20  $\mu$ l were separated on 12.5% or 15% SDS-PAGE gels and transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked in PBS, 0.1% Tween 20, 5% (w/v) dry milk for 1 h at the room temperature and then incubated with the mouse monoclonal anti-human cathepsin B antibody (1:1000), the rabbit polyclonal anti-human cathepsin S antibody (1:2000), the rabbit polyclonal anti-human cystatin C (1:800), the mouse monoclonal anti-human MMP-1 antibody (1:6000) or the mouse monoclonal anti-human MMP-3 antibody (1:3000) in PBS, 0.1% Tween 20, 5% (w/v) dry milk at 4°C overnight. Membranes were then incubated with the goat anti-mouse or the goat anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate (1:5000) in PBS, 0.1% Tween 20, 5% (w/v) dry milk for 1 h at room temperature. Proteins were visualized using ECL WB detection reagent (GE Healthcare) according to the manufacturer's specifications.

### Protease activity assays

Different AMC-derived fluorogenic substrates were used to measure cysteine cathepsin activities in synovial fluids. Synovial fluids (300  $\mu$ l) were diluted in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6, containing 3 mM EDTA, 5 mM DTT and 0.1% (w/v) polyethylene glycol 6000 to a final volume of 1 ml. General cysteine cathepsin activity (B, K, L and S) was measured using Z-Phe-Arg-AMC (20  $\mu$ M;  $k_{cat}/K_m$  (CatB) =  $1.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ;  $k_{cat}/K_m$  (CatS) =  $8.8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ;  $k_{cat}/K_m$  (CatL) =  $1.4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ), whereas cathepsin S and cathepsin B activities were measured using Bz-Phe-Val-Arg-AMC (20  $\mu$ M;  $k_{cat}/K_m$  =  $2.4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) and Z-Arg-Arg-AMC (20  $\mu$ M;  $k_{cat}/K_m$  =  $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ), respectively. All the activities were measured continuously using a C-61 fluorimeter (Photon Technology International, USA) with  $\lambda_{exc}$  = 370 nm and  $\lambda_{em}$  = 460 nm for 1 h at 25°C. Activity assays for the matrix metalloproteinases were performed as follows. Synovial fluids (95  $\mu$ l) were diluted in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, containing 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02%

(w/v) NaN<sub>3</sub> and 0.05% (w/v) Brij 35 to a final volume of 190  $\mu$ l. Increase in fluorescence for MMP-1, -3 and -13 was followed continuously at 25°C for 1.5 h using 10  $\mu$ M substrate in a total volume of 200  $\mu$ l on a Tecan Safire fluorescence 96-well plate reader (Tecan, Männerdorf, Switzerland). The MMP-1-like activity was measured using DNP-Pro-Cha-Abu-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH<sub>2</sub> ( $\lambda_{exc}$  = 365 nm,  $\lambda_{em}$  = 450 nm), the MMP-3-like activity using MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH<sub>2</sub> ( $\lambda_{exc}$  = 325 nm,  $\lambda_{em}$  = 395 nm;  $k_{cat}/K_m$  =  $2.18 \times 10^5$  s<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>) and the MMP-13-like activity using MCA-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH<sub>2</sub> ( $\lambda_{exc}$  = 325 nm,  $\lambda_{em}$  = 395 nm;  $k_{cat}/K_m$  =  $1.09 \times 10^6$  s<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>).

#### Statistical analysis

The results are given as average values. The nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to compare the differences between the two independent groups using SPSS 10.0 software. *P* values lower than 0.05 were considered to be significant.

#### Acknowledgements

The work has been supported by the grants P1-040 and J1-9359 to B.T. from the Slovene Research Agency, The European Commission FP6 grant LSHG-CT-2006-018830 "CAMP" to B.T. and H.N. and The Arthritis Research Campaign, UK, to H.N.

#### References

- Berardi, S., Lang, A., Kostoulas, G., Horler, D., Vilei, E. M. and Baici, A. (2001). Alternative messenger RNA splicing and enzyme forms of cathepsin B in human osteoarthritic cartilage and cultured chondrocytes. *Arthritis Rheum.* *44*, 1819-1831
- Caglič, D., Pungerčar, J. R., Pejler, G., Turk, V. and Turk, B. (2007). Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *J. Biol. Chem.* *282*, 33076-33085
- Cawston, T. E. and Wilson, A. J. (2006). Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *20*, 983-1002
- Chung, L., Shimokawa, K., Dinakarandian, D., Grams, F., Fields, G. B. and Nagase, H. (2000). Identification of the (183)RWTFNFREY(191) region as a critical segment of matrix metalloproteinase 1 for the expression of collagenolytic activity. *J. Biol. Chem.* *275*, 29610-29617
- Cimerman, N., Prebanda, M. T., Turk, B., Popovič, T., Dolenc, I. and Turk, V. (1999). Interaction of cystatin C variants with papain and human cathepsins B, H and L. *J. Enzyme Inhib.* *14*, 167-174
- Cunnane, G., FitzGerald, O., Hummel, K. M., Gay, R. E., Gay, S. and Bresnihan, B. (1999). Collagenase, cathepsin B and cathepsin L gene expression in the synovial membrane of patients with early inflammatory arthritis. *Rheumatology* *38*, 34-42
- Esser, R. E., Angelo, R. A., Murphey, M. D., Watts, L. M., Thornburg, L. P., Palmer, J. T., Talhouk, J. W. and Smith, R. E. (1994). Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* *37*, 236-247
- Feldmann, M., Brennan, F. M. and Maini, R. N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 397-440
- Gabrijelčič, D., Annan-Prah, A., Rodič, B., Rozman, B., Cotič, V. and Turk, V. (1990). Determination of cathepsins B and H in sera and synovial fluids of patients with different joint diseases. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* *28*, 149-153
- Goldring, S. R. and Goldring, M. B. (2004). The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, S27-36
- Hashimoto, Y., Kakegawa, H., Narita, Y., Hachiya, Y., Hayakawa, T., Kos, J., Turk, V. and Katunuma, N. (2001). Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *283*, 334-339
- Ibrahim, S. M., Koczan, D. and Thiesen, H. J. (2002). Gene-expression profile of collagen-induced arthritis. *J. Autoimmun.* *18*, 159-167
- Kagari, T., Doi, H. and Shimozato, T. (2002). The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J. Immunol.* *169*, 1459-1466
- Keyszer, G., Redlich, A., Haupl, T., Zacher, J., Sparmann, M., Engetum, U., Gay, S. and Burmester, G. R. (1998). Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis Rheum.* *41*, 1378-1387
- Kramer, I., Wibulswas, A., Croft, D. and Genot, E. (2003). Rheumatoid arthritis: targeting the proliferative fibroblasts. *Prog. Cell Cycle Res.* *5*, 59-70
- Kuhelj, R., Dolinar, M., Pungerčar, J. and Turk, V. (1995). The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor

- expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* *229*, 533-539
- Lenarčič, B., Gabrijelčič, D., Rozman, B., Drobnič-Košorok, M. and Turk, V. (1988). Human cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors (CPIs) in inflammatory and metabolic joint diseases. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* *369 Suppl*, 257-261
- Lindy, O., Kontinen, Y. T., Sorsa, T., Ding, Y., Santavirta, S., Ceponis, A. and Lopez-Otin, C. (1997). Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* *40*, 1391-1399
- Maciewicz, R. A., Etherington, D. J., Kos, J. and Turk, V. (1987). Collagenolytic cathepsins of rabbit spleen: a kinetic analysis of collagen degradation and inhibition by chicken cystatin. *Coll. Relat. Res.* *7*, 295-304
- Mihelič, M., Doberšek, A., Gunčar, G. and Turk, D. (2008). Inhibitory fragment from the p41 form of invariant chain can regulate activity of cysteine cathepsins in antigen presentation. *J. Biol. Chem.* *283*, 14453-14460
- Mitchell, P. G., Magna, H. A., Reeves, L. M., Lopresti-Morrow, L. L., Yocum, S. A., Rosner, P. J., Geoghegan, K. F. and Hambor, J. E. (1996). Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* *97*, 761-768
- Mort, J. S. and Recklies, A. D. (1986). Interrelationship of active and latent secreted human cathepsin B precursors. *Biochem. J.* *233*, 57-63
- Murphy, G. and Nagase, H. (2008). Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* *4*, 128-135
- Nakagawa, T. Y., Brissette, W. H., Lira, P. D., Griffiths, R. J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J. D., Eastman, S. E., Howard, E. D., Clarke, S. R., Rosloniec, E. F., Elliott, E. A. and Rudensky, A. Y. (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* *10*, 207-217
- Nakamura, H., Tanaka, M., Masuko-Hongo, K., Yudoh, K., Kato, T., Beppu, M. and Nishioka, K. (2006). Enhanced production of MMP-1, MMP-3, MMP-13, and RANTES by interaction of chondrocytes with autologous T cells. *Rheumatol. Int.* *26*, 984-990
- Rengel, Y., Ospelt, C. and Gay, S. (2007). Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res. Ther.* *9*, 221
- Riese, R. J., Mitchell, R. N., Villadangos, J. A., Shi, G. P., Palmer, J. T., Karp, E. R., De Sanctis, G. T., Ploegh, H. L. and Chapman, H. A. (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J. Clin. Invest.* *101*, 2351-2363
- Rozman, J., Stojan, J., Kuhelj, R., Turk, V. and Turk, B. (1999). Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett.* *459*, 358-362
- Schurigt, U., Stopfel, N., Huckel, M., Pfirsche, C., Wiederanders, B. and Brauer, R. (2005). Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *7*, R174-188
- Shi, J., Schmitt-Talbot, E., DiMattia, D. A. and Dullea, R. G. (2004). The differential effects of IL-1 and TNF-alpha on proinflammatory cytokine and matrix metalloproteinase expression in human chondrosarcoma cells. *Inflamm. Res.* *53*, 377-389
- Smolen, J. S. and Steiner, G. (2003). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.* *2*, 473-488
- Suzuki, K., Kan, C. C., Hung, W., Gehring, M. R., Brew, K. and Nagase, H. (1998). Expression of human pro-matrix metalloproteinase 3 that lacks the N-terminal 34 residues in *Escherichia coli*: autoactivation and interaction with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1). *Biol. Chem.* *379*, 185-191
- Tchetverikov, I., Lohmander, L. S., Verzijl, N., Huizinga, T. W., TeKoppele, J. M., Hanemaaijer, R. and DeGroot, J. (2005). MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 694-698
- Trabandt, A., Gay, R. E., Fassbender, H. G. and Gay, S. (1991). Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *34*, 1444-1451
- Turk, B., Turk, D. and Salvesen, G. S. (2002a). Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr. Pharm. Des.* *8*, 1623-1637
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* *5*, 785-799
- Turk, V., Turk, B., Gunčar, G., Turk, D. and Kos, J. (2002b). Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv. Enzyme Regul.* *42*, 285-303
- van Meurs, J., van Lent, P., Holthuysen, A., Lambrou, D., Bayne, E., Singer, I. and van den Berg, W. (1999a). Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for stromelysin-1 in cartilage destruction. *J. Immunol.* *163*, 5633-5639
- van Meurs, J. B., van Lent, P. L., Holthuysen, A. E., Singer, I., Bayne, E. K. and van den Berg, W. B. (1999b). Kinetics of aggrecanase- and metalloproteinase-induced neopeptides in

various stages of cartilage destruction in murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 42, 1128-1139

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

Weidauer, E., Yasuda, Y., Biswal, B. K., Chemy, M., James, M. N. and Bromme, D. (2007). Effects of disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) on the activities of rheumatoid arthritis-associated cathepsins K and S. *Biol. Chem.* 388, 331-336

Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J. and Rudolphi, K. A. (2005). Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 331-344

#### Figure legend

##### FIGURE 1: Activity of synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis (RA) or osteoarthritis (OA) towards cathepsin-selective substrates.

Activity of cysteine cathepsins was monitored fluorimetrically in synovial fluid samples of patients with RA or OA (shown as box and whiskers plot; white for RA patients, gray for OA patients). Fluorogenic cathepsin-selective substrates used were Bz-FVR-AMC for cathepsin S, Z-FR-AMC as a general cathepsin substrate and Z-RR-AMC for cathepsin B. The box represents data from the 25<sup>th</sup> percentile to the 75<sup>th</sup> percentile, with a horizontal line showing the median. The whiskers show the range of data. \*P < 0,05, statistical significance of cysteine cathepsins activity between RA and OA group. Other experimental details are described in »Materials and methods« section.

##### FIGURE 2: Activity of synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis (RA) or osteoarthritis (OA) towards substrates selective for matrix metalloproteinases-3 and -13 (MMP-3 and -13).

Activity of matrix metalloprotease was monitored fluorimetrically in synovial fluid samples of patients with RA or OA (shown as box and whiskers plot; white for RA patients, gray for OA patients). MMP-3-like activity was measured using the MMP-3 selective fluorogenic substrate MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH<sub>2</sub>, whereas MMP-13-like activity was measured by the MMP-13 selective fluorogenic substrate MCA-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH<sub>2</sub>. The box represents data from the 25<sup>th</sup> percentile to the 75<sup>th</sup> percentile, with a horizontal line showing the median. The whiskers show the range of data. \*\*P < 0,01, statistical significance of MMP activity between RA and OA group. Other experimental

details are described in »Materials and methods« section.

##### FIGURE 3: Protein levels of cysteine cathepsins B and S, and cystatin C in synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis (RA) or osteoarthritis (OA).

A, Western blot analysis of cathepsin S (*CatS*) expression in synovial fluid samples. Purified recombinant cathepsin S was used as the positive control (*M*, mature form, *P*, proform). B, Western blot analysis of procathepsin B (*pCatB*) and cathepsin B (*CatB*) expression in synovial fluid samples. Purified recombinant cathepsin B was used as the positive control (*M*, mature form, *P*, proform). C, Western blot analysis of cystatin C (*CystC*) expression in synovial fluid samples. Purified recombinant cystatin C was used as the positive control (*R*). The molecular weight standards are shown on the left. Lanes 1 to 7 are from SDS-PAGE gel 1 and lanes 8 to 14 from SDS-PAGE gel 2.

##### FIGURE 4: Protein levels of matrix metalloproteinases-1 and -3 (MMP-1 and -3) in synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis (RA) or osteoarthritis (OA).

A, Western blot analysis of pro-matrix metalloproteinase-1 (*pMMP-1*) expression in synovial fluid samples. Purified recombinant MMP-1 was used as the positive control (*P*, proform, *M*, mature form). B, Western blot analysis of pro-matrix metalloproteinase-3 (*pMMP-3*) expression in synovial fluid samples. Purified recombinant catalytic domain (*CD*) of MMP-3 was used as the positive control. The molecular weight standards are shown on the left. Lanes 1 to 7 are from SDS-PAGE gel 1 and lanes 8 to 14 from SDS-PAGE gel 2.

Table 1: Patients' characteristics.

Patient	Diagnosis	Gender	Age	V <sub>SF</sub> (mL)	Treatment(s)	ESR	CRP
1	RA	F	58	25	methotrexate/methylprednisolone/sulfasalazine	64	64
2	RA	F	52	60	methotrexate/ressochine	35	8
3	RA	F	44	70	methotrexate	N/A	N/A
4	RA	F	44	30	infliximab	N/A	N/A
5	RA	F	66	25	methotrexate/methylprednisolone/sulfasalazine	N/A	N/A
6	RA	M	N/A	50	no treatment	34	44
7	RA	F	74	30	methotrexate/methylprednisolone	N/A	N/A
8	RA	F	57	20	meloxicam	45	98
9	RA	F	54	40	diclophenac	52	98
10	OA	F	45	35	sulfasalazine	27	<5
11	OA	F	76	60	tramadol hydrochloride	33	17
12	OA	F	56	40	N/A	16	<5
13	OA	M	27	90	N/A	3	N/A
14	OA	F	50	70	N/A	16	<5
15	OA	M	76	20	diclophenac	25	10
16	OA	F	74	15	diclophenac	32	<5

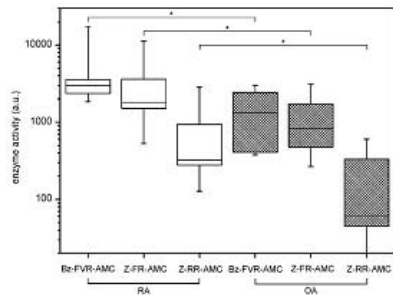
ESR – Erythrocyte sedimentation rate, CRP – C-reactive protein, N/A – not available, M – male, F – female, SF – synovial fluid

Table 2: Average concentrations of CatS protein, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in SF samples.

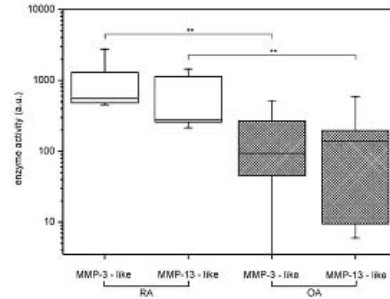
	RA patients		OA patients	
	concentration	range	concentration	range
CatS	64.71 ng/ml	(23.60 – 160.6) ng/ml	43.76 ng/ml	(4.19 – 93.05) ng/ml
IL-6	16.74 ng/ml **	(2.54 – 94.90) ng/ml	2.0 ng/ml	(0 – 10.06) ng/ml
TNF- $\alpha$	27.63 pg/ml	(10.99 – 54.78) pg/ml	nd	-
IL-1 $\beta$	23.30 ng/ml <sup>#</sup>	-	nd	-

CatS, cathepsin S; IL-6, interleukin-6; TNF- $\alpha$ , Tumour necrosis factor- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$ ; nd, not detected.  
 \*\* P < 0.01 ; <sup>#</sup> detected in a single patient with RA.

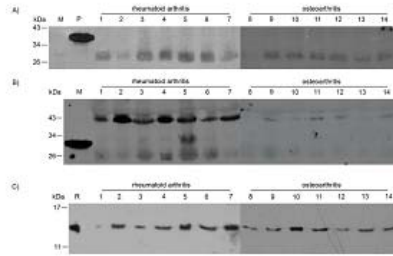
**Figure 1:**



**Figure 2:**



**Figure 3:**



**Figure 4:**

