

KRATKA NAVODILA

SHORT INSTRUCTION

Celotna doktorska disertacija, vključno s prilogami, naj ne bi obsegala več kot 200 strani.

Vsako glavno poglavje se mora pričeti na lihi strani.

Poglavja si morajo slediti v zaporedju, predpisanem s predlogo.

V kolikor so v delo vključeni algoritmi in/ali slike in/ali tabele, so kazala zanje obvezna.

Pri navajanju virov in literature je potrebno upoštevati pravila, opisana v dokumentu Navajanje virov.doc.

V prilogi je obvezno naštet lastne objave iz disertacije.

Complete doctoral dissertation including appendices should not exceed 200 pages.

NE BRIŠI

DON'T DELETE

Each main chapter should begin on an odd page.

The chapters should follow as prescribed in the template.

When the work contains algorithms and/or figures and/or tables their indexes are obligatory.

The references should consider the rules as described in the document Citation style.doc.

Publications of the candidate from the dissertation must be listed in appendix.

Špela Konjar

**VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV
PRI PROCESIRANJU, AKTIVACIJI IN
IN AKTIVACIJI PERFORINA**
Doktorska disertacija

**ROLE OF CYSTEINE CATHEPSINS IN
THE PROCESSING, ACTIVATION AND
DEACTIVATION OF PERFORIN**
Doctoral Dissertation

Mentor: doc. dr. Nataša Kopitar-Jerala

Somentor: prof. ddr. Boris Turk

Marec, 2010

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL

Ljubljana, Slovenija



Kazalo

Povzetek	IX
Abstract	XI
Seznam kratic	XIII
1 Uvod	1
1.1.1 Proteinaze	1
1.1.2 Cisteinske proteinaze.....	2
1.1.3 Cisteinski katepsini.....	2
1.1.3.1 Študiji katepsinov v celicah NK in CTL	3
1.1.4 Katepsin L	4
1.1.4.1 Interakcije katepsina L s stefinom B in histoni v jedru.....	4
1.2 Naravna in specifična imunost.....	5
1.2.1 Citotoksični limfociti T (CTL)	8
1.2.2 Prepoznavanje tarčnih celic pri CTL	9
1.2.3 Mehanizmi pobijanja tarčnih celic z eksocitozo sekretornih granul CTL/celic NK.....	10
1.2.3.1 Sekretorne granule	11
1.2.3.2 Proteini udeleženi pri eksocitozi sekretornih granul	13
1.2.3.2.1 Perforin	13
1.2.3.2.1.1 Perforin in družina porinov	13
1.2.3.2.1.2 Perforin; struktura in funkcija posameznih domen	14
1.2.3.2.1.3 Perforin in njegova vloga pri bolezni	16
1.2.3.2.2 Grancimi	18
1.2.3.2.3 Seriglicin.....	19
1.2.3.2.4 Predlagani mehanizmi sinergije med grancimom B in perforinom pri lizi tarčnih celic.....	20
1.2.4 Vloga interleukina 2 (IL-2) pri aktivaciji celic NK in CTL.....	21
2 Namen dela	23
3 Materiali in metode	25
3.1 Celične linije	25
3.2 Miši	25
3.3 Priprava primarnih mišjih citotoksičnih limfocitov T (CTL) in celic NK iz OT-1 transgene miši	26
3.4 <i>In vitro</i> cepitve rekombinantnega mišjega perforina z rekombinantnimi mišjim katepsini	26
3.5 <i>In vitro</i> inhibicije rekombinantnega mišjega katepsina L s stefinom B in histoni	27
3.6 Liza membrane ovčjih eritrocitov	27
3.7 Imunodetekcija in protitelesa	28
3.8 Merjenje aktivnosti katepsinov	29
3.9 Označevanje aktivnega mesta katepsinov v celičnih ekstraktih z biotinilirano probo DCG-04	29
3.10 Merjenje aktivnosti grancimov	29
3.11 Fluorescenčna mikroskopija	30
3.12 Metoda citotoksičnih testov na osnovi sproščanja izotopa ⁵¹ Cr iz tarčnih celic	30

3.13	Pretočna citometrija	31
3.13.1	Določitev viabilnosti celic.....	31
3.13.2	Metoda citotoksičnih testov na osnovi pretočne citometrije	31
3.13.3	Fenotipizacija CTL in celic NK	32
3.13.4	Degranulacijski test na CTL.....	32
3.14	Transfekcija perforina v OT-1 CTL, izoliranih iz miši z izbitim genom za perforin.....	32
3.15	Transfekcija perforina v celice RBL	33
4	Rezultati	35
4.1	<i>In vitro</i> študije cepitev perforina s cisteinskimi katepsini	35
4.1.1	<i>In vitro</i> cepitve mišjega rekombinantnega perforina z rekombinantnimi mišjimi	35
4.1.2	Liza membran ovčjih eritrocitov s perforinom in perforinom, cepljenim s katepsini.....	36
4.2	Kolokalizacijske študije katepsinov, perforina, PDI in lamp-1 v celični liniji YT NK.....	37
4.3	Vpliv cisteinskih katepsinov na procesiranje perforina.....	40
4.3.1	Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na procesiranje perforina v celičnih linijah NK	40
4.3.2	Vpliv tunikanamicina in inhibitorjev cisteinskih katepsinskih na procesiranje perforina	42
4.3.3	<i>In vitro</i> cepitve perforina s katepsinom L	43
4.4	Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na citotoksičnost celic NK-92 in YT 5 celic NK.....	45
4.5	Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na aktivnost katepsinov in grancimov	49
4.6	Študije OT-1 CTL, izoliranih iz miši divjega tipa ter iz miši z izbitim genom za katepsin L.....	52
4.6.1	Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na citotoksičnost OT-1 CTL, izoliranih miši divjega tipa.....	52
4.6.2	Študije OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši	54
4.6.2.1	Fenotipizacija in genotipizacija OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši	54
4.6.3	Citotoksični testi OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši.....	56
4.6.4	Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na citotoksičnost OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši 58	
4.6.5	Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na degranulacijo OT-1 CTL.....	59
4.6.6	Aktivnost katepsinov v OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši.....	61
4.7	Študije celic NK katepsin L ničelnih miši in miši divjega tipa	62
4.7.1	Priprava celic NK iz miši OT-1 divjega tipa.....	62
4.7.2	Citotoksični testi s celicami NK katepsin L ničelnih miši.....	64
4.7.3	Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na citotoksičnost celic NK katepsin L ničelnih miši 64	
4.7.4	Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na procesiranje perforina v celicah NK pri miših divjega tipa in katepsin L ničelnih miših	65
4.8	Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na perforin transficiran v celice RBL in OT-1 CTL perforin ničelne miši	67
4.9	Vpliv IL-2 na aktivnost katepsinov v celicah YT in izražanje perforina v mišjih celicah NK	69
4.10	Povečana lokalizacija cistatina F v sekretornih granulah celic YT po stimulaciji z IL-2	70
4.11	<i>In vitro</i> inhibicija rekombinantnega človeškega katepsina L s človeškim stefinom B.....	72
4.12	Kolokalizacija katepsina L in serpina A3G v jedru mišjih makrofagov	73
5	Razprava	76
6	Zaključki	84
7	Zahvale	86
8	Literatura in viri.....	87
	Kazalo slik	101

Povzetek

Naravne celice ubijalke (celice NK) in citotoksični limfociti T (CTL) prepoznajo z virusi okužene ali maligno spremenjene celice (tarčne celice) in jih uničijo preko dveh neodvisnih mehanizmov. Smrt tarčnih celic se lahko sproži na dva načina: preko receptorjev smrti ali s sprostitvijo sekretornih granul. Sekretorne granule se zberejo na mestu kontakta med efektorsko celico (celico NK ali CTL) in tarčno celico, kjer se formira imunološka sinapsa. V imunološki sinapsi se membrana sekretornih granul zlije z membrano efektorske celice, vsebina sekretornih granul pa se sprosti v imunološko sinapso. Sekretorne granule imajo nizek pH in membransko sestavo, ki je značilna za lizosome. Vsebujejo perforin in serinske proteaze grancime, kot tudi različne lizosomske proteine (Lamp 1 in 2, CD63, katepsin B, D, in L).

Perforin je od kalcija odvisen protein, ki tvori pore na plazemski membrani in omogoči vstop grancimov v citoplazmo tarčnih celic, kjer nato grancimi cepijo določene substrate ter sprožijo celično smrt. Miši z izbitim genom za perforin imajo zmanjšano sposobnost obrambe pred bakterijskimi in virusnimi okužbami, ne zavračajo transplantiranih tumorjev ter s staranjem spontano razvijejo limfome B-celic.

V sekretornih granula se s C-terminalnega dela perforina odcepi 12–20 aminokislin. Cepitev lahko preprečimo z inkubacijo z inhibitorjem cisteinskih katepsinov E-64, inhibitorjem cisteinskih in serinskim proteinaz leupeptinom ter amonijevim kloridom, kar kaže na potencialno vlogo cisteinskih katepsinov v tem procesu. Nizek pH sekretornih granul (pH 5,1–5,5) je ugoden za interakcije med perforinom in proteoglikani.

Z našimi študijami smo želeli pojasniti vlogo cisteinskih katepsinov pri regulaciji procesiranja in degradacije perforina. Naše začetne *in vitro* študije so pokazale, da katepsini B, K, L in S cepijo in inaktivirajo perforin. Z uporabo specifičnih protiteles, ki prepoznajo C-terminalni del perforina, smo pokazali, da katepsin L preferenčno odcepi C-terminalni del perforina *in vitro*.

Pri inkubacijah človeških celic NK (NK-92, YT 5, KHGY1) z inhibitorjema cisteinskih katepsinov E-64d in L1 smo pokazali, da ta inhibitorja blokirata procesiranje perforina. Pri študijah procesiranja perforina z inhibitorjema cisteinskih katepsinov E-64d in L1 in inhibitorjem N-glikozilacije, tunikanamicinom, pa smo pokazali, da katepsini procesirajo C-

terminalni del perforina, ki je glikoziliran. Nato smo pokazali, da inhibicija cisteinskih katepsinov z E-64d in L1 v človeških celicah NK in primarnih mišjih CTL zmanjša njihovo učinkovitost pri ubijanju tarčnih celic. S kolokalizacijskimi študijami na celicah YT in celicah NK-92 smo potrdili, da se perforin nahaja v sekretornih granulah in ne v endoplazemskem retikulumu. Poleg tega smo ugotovili, da je perforin delno kolokaliziran s katepsinom L, ne pa tudi s katepsinoma B in S. Ključno vlogo katepsina L smo želeli potrditi tudi z poskusi na celicah NK in CTL katepsin L ničelnih miši. Dokazali smo razlike v procesiranju perforina pri katepsin L ničelnih miših in miših divjega tipa. Inhibitorji cisteinskih katepsinov so preprečili procesiranje perforina. CTL in celice NK katepsin L ničelnih miši, pa so pobijale tarčne celice enako učinkovito ali celo bolj kot celice NK in CTL, izolirane iz miši divjega tipa. Inhibicija cisteinskih katepsinov z E-64d in L1 je zmanjšala učinkovitost CTL katepsin L ničelnih miši pri pobijanju tarčnih celic, vendar ni vplivala na učinkovitost celic NK katepsin L ničelnih miši pri pobijanju tarčnih celic. Sklepali smo, da so granularno vezani katepsini nujni za procesiranje perforina v aktivno obliko, da je katepsin L pomemben, vendar ni edini, ki lahko sodeluje v tem procesu, temveč so lahko udeleženi tudi ostali katepsini.

V nasprotju z našimi pričakovanji, so celice NK in CTL katepsin L ničelnih miši prve dni po diferenciaciji ubijale tarčne celice bolj učinkovito kot kontrolne celice NK, izolirane iz miši divjega tipa. Ker ima katepsin L tudi številne funkcije v jedru celice, sklepamo, da je učinek povezan z jedrnimi funkcijami katepsina L. Pokazali smo, da je aktivnost katepsina L v jedru regulirana tudi z endogenimi inhibitorji: stefinom B (Čeru et al., 2010) in serpinom A3G (Konjar et al., 2010).

Abstract

Natural killer (NK) cells and cytotoxic T lymphocytes (CTLs) recognize virus-infected or malignant transformed cells and destroy them through two independent mechanisms. Apoptotic target-cell death can be triggered by the engagement of death-receptors or by the release of cytotoxic granules. Cytotoxic granules gather at the site of contact between the effector cell (NK cell or CTL) and the target cell where the immunological synapse is formed. At the immunological synapse, the cytotoxic granules membrane fuses with the cell membrane and releases its contents. Cytotoxic granules have secretory lysosome characteristics, including an electron-dense core found in secretory organelles and a vesicular surrounding region typical of lysosomes. They contain perforin and serine proteases; granzymes, as well as several lysosomal proteins (Lamp 1 and 2, CD63, cathepsins B, D and L).

Perforin, a calcium-dependent pore forming protein, facilitates entry of granzymes into the cytoplasm of a target cell, where they access their substrates to trigger cell death. Perforin-deficient mice had decreased ability to clear bacterial and viral infections, fail to reject transplanted tumors and as they age, spontaneously develop B cell lymphoma.

In the secretory granules the 12–20 residues from the C-terminal are cleaved from the perforin. The cleavage is inhibited by incubation with inhibitor of cysteine proteases E-64, inhibitor of cysteine and serine proteases leupeptin and ammonium chloride indicating a possible role of cysteine cathepsins in this process. The low pH of cytotoxic granules (pH 5,1-5,5) favor the interaction of perforin with the proteoglycans.

The aim of our study was to elucidate the role of cysteine cathepsins in regulation of perforin processing and degradation. Our initial studies showed that *in vitro* cathepsins B, K, L and S cleave and deactivate perforin. With the use of specific antibodies for the C-terminal of perforin we showed that *in vitro* cathepsin L preferentially cleaves C-terminal part of perforin.

Incubations of human NK cells (NK-92, YT, YT 5, KHGY1) with inhibitors of cysteine cathepsins E-64d and L1 showed that inhibitors of cysteine cathepsins blocks processing of perforin. With the use of inhibitors of cysteine cathepsins E-64d and L1 and inhibitor of N-glycosylation tunicamycin we showed cathepsins processed the C-terminal part, which is

glycosylated. Further, we showed that inhibition of cysteine cathepsins in human NK cells and primary mouse CTLs decrease significantly killing of the target cells. With co-localization studies in YT NK cell and NK-92 cells we confirmed that perforin is mainly localized in secretory granules and not in endoplasmic reticulum. We also showed that perforin partially co-localize with cathepsins L, but does not co-localize with cathepsin B or cathepsin S. We wanted to confirm the role of cathepsin L with the experiments on NK cells and CTL isolated from cathepsin L knockout mice. We showed differences in the processing of perforin in cathepsin L knockout mice and wild type. Inhibitors of cysteine cathepsins blocked processing of perforin. But killing of the target cells by CTLs and NK cells from mouse deficient in cathepsins L was normal, comparable to CTL and NK cells from wild type. Inhibition of cysteine cathepsins with E-64d and L1 decrease target cell killing of CTL of cathepsin L knockout mice, but at the same time did not affect target cell killing of NK cells from cathepsin L knockout mice. We concluded that granule-bound cathepsins are indeed essential for processing perforin to its active form, and that cathepsin L is important, but not exclusive participant in this process.

Contrary to our results, NK cells and CTL from cathepsin L knockout mouse killed target cells more efficiently as NK cells and CTL from wild type mouse first days of the differentiations. Since cathepsin L has also many functions in the nucleus of the cells, we conclude that this effect is connected with the function of cathepsin L in the nucleus. We showed, that activity of cathepsin L is regulated with endogenous inhibitors: stefin B (Čeru et al., 2010) and serpin A3G (Konjar et al., 2010).

Seznam kratic

aneksin V-PE	=	aneksin V-pikoeritrin
AEP	=	asparagil endopeptidaza
Ag	=	antigen
APC	=	antigen predstavitvena celica
APS	=	amonijev persulfat
Bcl-2	=	protein 2 iz limfoma B-celic; (ang. <u>B-cell lymphoma 2</u>)
Bid	=	protein smrti, ki reagira z domeno BH-3; (ang. <u>BH-3 interacting domain death protein</u>)
celice NK	=	naravne celice ubijalke
CFSE	=	karboksifluorescein diacetat sukcinimidilni ester
CTL	=	citotoksični limfociti T (ang. <u>cytotoxic T lymphocytes</u>)
dH ₂ O	=	destilirana voda
DC	=	dendritične celice
DMEM	=	po Dulbeccu spremenjen medij Eagle; (ang. <u>Dulbecco's modified Eagle medium</u>)
DMSO	=	dimetil sulfoksid
DNA	=	deoksiribonukleinska kislina
DT	=	miš divjega tipa
DTT	=	ditiotreitol
E-64d	=	L-trans-epoksisukcinil (OEt)-Leu-3-metilbutilamid
ECL	=	povečana kemoluminiscenca; (ang. <u>enhanced chemoluminescence</u>)
EGTA	=	etilen glikol – bis (β-aminoetil eter) – N, N, N', N'-tetraacetat
ER	=	endoplazmatski retikulum
FasL	=	ligand receptorja smrti Fas
FBS	=	fetalni goveji serum; (ang. <u>fetal bovine serum</u>)
FHL	=	družinska hemofagocitorna limfohistiocitoza
GFP	=	ang. green fluorescence protein
HLH	=	ang. hemophagocytic lymphohistiocytosis

IFN- γ	=	interferon γ
Kat ^{-/-}	=	miš z izbitim genom za katepsin L, katepsin L ničelne miši
KatL ^{+/+}	=	miš divjega tipa iste družine (singenskega tipa)
LPS	=	lipopolisaharid
LCMV	=	ang. lymphocytic choriomeningitis virus
MACPF	=	ang. membrane attack complex components/perforin signature
MAC	=	ang. membrane attack complex
ml	=	mililiter
MP	=	manoza-6-fosfat
MPR	=	manoza-6-fosfat-receptor
mRNA	=	sporočevalna ribonukleinska kislina
MTOC	=	mikrotubularni organizacijski center
PAGE	=	poliakrilamidna gelska elektroforeza; (ang. polyacrylamide gel electrophoresis)
PAMP	=	ang. pathogen-associated molecular pattern, s patogeni povezani
molekularni vzorci		
PBS	=	s fosfatom zapufrana raztopina soli; (ang. phosphate buffer saline)
PCR	=	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PFN	=	perforin
pH	=	negativni desetiški logaritem aktivnosti ionov H ⁺
PHK I	=	poglavitni histokompatibilnosti kompleks prvega razreda
PI	=	propidijev jodid
PFT	=	ang. pore forming toxin
RPMI	=	celično gojišče, razvito na Roswell Park Memorial Institut
RBL	=	levkemija podganjih bazofilcov (ang. rat basophilic leukemia)
SDS	=	sodium dodecilsulfat
TCR	=	T-celični receptor
TEMED	=	N, N, N', N'- tetrametilendiamin
TNF α	=	dejavnik tumorske nekroze α (ang. tumor necrosis factor α)
TRAIL	=	ligand receptorja smrti TRAIL-R, (ang. tumor necrosis factor (TNF) apoptosis inducing factor)
μ l	=	mikroliter
μ M	=	mikromolarna koncentracija
z-Phe-Arg-AMC	=	benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-arginil-4-metil-7-kumarilamid

1 Uvod

1.1.1 Proteinaze

Proteinaze (proteaze) so encimi, ki razgrajujejo peptidne vezi v proteinih. Prisotne so v vseh živih organizmih in jim omogočajo preživetje, saj uravnavajo katabolizem celičnih proteinov, sodelujejo pri procesih rasti ter staranja, apoptozi, nekrozi, razgradnji zunajceličnega materiala, aktivaciji neaktivnih encimskih (prebavni encimi, strjevanje krvi, ...) in hormonskih prekurzorjev (npr. inzulin) itd. Nepravilno delovanje proteinaz je povezano s številnimi bolezenskimi stanji, kot so mišična distrofija, multipla skleroza, artritis, osteoartritis, Alzheimerjeva bolezen in različne oblike rakastih obolenj (Turk, 2006). Aktivnost proteinaz na ravni celice ter celotnega organizma je skrbno regulirana. Najpogostejši način regulacije njihove encimske aktivnosti je s proteinskimi inhibitorji, subcelično lokalizacijo (npr. lizosomi) ali aktivacijo proencimov.

Glede na izvor so proteinaze lahko živalske, rastlinske in mikrobiološke, glede na mesto cepitve ekso- in endopeptidaze, glede na lokalizacijo zunaj- ter znotrajcelične. Leta 1993 sta Rawlings in Barrett predlagala delitev, ki je temeljila na evolucijski podobnosti in mehanizmu delovanja ter manj na mestu cepitve peptidne vezi, ki je osnova EC-sistema. Na evolucijsko povezanost kažeta homologija aminokislinskega zaporedja (celotnega ali samo v aktivnem mestu) in terciarna struktura. Proteinaze so razvrščene v družine. Družine so razvrščene v klane, klani pa glede na katalitični mehanizem. Glede na katalitični tip delimo proteinaze na (MEROPS; <http://merops.sanger.ac.uk/>, Rawlings in Barrett, 2006):

- serinske (klani SB, SC, SE, SF, SH, SJ, SK, SP, SQ, SR, SS, ST, S-);
- treoninske (klan T-);
- cisteinske (klani CA, CD, CE, CF, CH, CL, CM, CN, C-);
- glutamatne (klan GA);
- aspartatne (klani AA, AB, AC, AD, AE, AF, A-);
- metaloproteinaze (klani MA, MC, MD, ME, MF, MG, MH, MJ, MK, MM, MN, MO, MP, MQ, M-);

- mešani katalitski tip (klani PA, PB, PC);
- neznani katalitski tip (klan UX).

1.1.2 Cisteinske proteinaze

Cisteinske proteinaze so zelo razširjena skupina proteinaz, saj člane najdemo v evkariontih, prokariontih in virusih. V človeškem genomu je bilo identificiranih 561 genov za proteinaze, od tega 148 genov kodira cisteinske proteinaze (Puente et al., 2003).

Skupna značilnost cisteinskih proteinaz je katalitski par Cys-His, kjer se cistein kot nukleofil približa peptidni vezi, histidin pa služi kot elektrofil za sprejem protona (Polgar, 1974). Cisteinske proteinaze so razdeljene v 9 klanov, klani pa se med seboj razlikujejo po sestavi in vrstnem redu aminokislin v aktivnem mestu. Najobsežnejši klan je CA (vsebuje C1 – papainovo in C2 – kalpainovo družino, ki sta najbolj raziskani), za katerega so značilne katalitske aminokislino Cys, His ter Asn (ali Asp).

1.1.3 Cisteinski katepsini

Cisteinski katepsini so skupina proteinaz, ki jih najdemo v lizosomu in lizosomom podobni organelih, kot so sekretorne granule. Njihova primarna naloga je razgradnja proteinov do krajših peptidov ali posameznih aminokislin. Največ katepsinov spada med peptidaze, ki imajo v aktivnem mestu aminokislino cistein (katepsini B, C, F, H, K, L, S, V, W, X), eden izmed njih ima v aktivnem mestu serin (katepsin G) dva pa aspartat (katepsina D in E) (Turk in Smith, 1974). Pri človeku poznamo 11 cisteinskih katepsinov (B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, W) (Turk et al., 2002; Turk et al., 2001). Katepsini so optimalno aktivni v kislem pH-ju, v nevtralnem območju pa le krajši čas, katepsin L le nekaj minut, katepsini B, H in K dalj časa, katepsin S pa je aktiven celo pri vrednostih pH nad 8 (Turk et al., 2001). Molska masa katepsinov je približno 20–35 kDa, z izjemo katepsina C, ki je oligomeren encim z molsko maso približno 200 kDa. Večina katepsinov je endopeptidaz (katepsini B, L, S, K, F, D, V, H), nekateri so eksopeptidaze (katepsini B, C, H, X), dva pa sta aminopeptidazi (katepsin C in H) (Turk et al., 2001). Katepsini imajo široko specifičnost z določenimi preferencami za hidrofobne ali bazične aminokislino na mestu P2.

Katepsini se sintetizirajo kot prekurzorji z N-končnimi propeptidi ter signalnimi (pre)

peptidi. Propeptid sterično blokira aktivno mesto, prepreči dostop substrata in tako inhibira aktivnost proencima. Pri prehodu skozi Golgijev aparat poteče fosforilacija manoze na mestu 6, kar omogoči vezavo na ustrezne receptorje ter njihov transport v endosomski sistem (von Figura et al., 1986). Odcepitev N-končnega propeptida z avtoaktivacijo v kislem pH-ju omogoči nastanek aktivnega encima, eksopeptidazi katepsina C in X pa za svojo aktivacijo potrebuje prisotnost drugih cisteinskih endopeptidaz, npr. katepsina L ter S (Dahl et al., 2001).

Cisteinske katepsine so dolgo povezovali le z vlogo končne razgradnje proteinov v lizosomih. Ta pogled se je dramatično spremenil v zadnjih 10 letih, ko so zasledili vpletenost cisteinskih katepsinov v številne celične procese, kot so razgradnja proteinov (Turk et al., 2001), reprodukcija (Robker et al., 2000), antigenska predstavitev na molekulah PHK II. razreda (PHK II) (Rudensky in Beers, 2006), resorpcija kosti (Chapman et al., 1997), apoptoza (Stoka et al., 2005) in diferenciacija keratinocitov (Benavides et al., 2002). Z njimi so povezane tudi bolezni, kot so rak (Lah in Kos, 1998), vnetja (Buhling et al., 2004), nevrodegeneracija (Felbor et al., 2002), ateroskleroza (Liu et al., 2006), artritis (Lang et al., 2000), periodontitis (Eley in Cox, 1998) ter akutni pankreatitis (Halangk et al., 2000).

1.1.3.1 Študiji katepsinov v celicah NK in CTL

V CTL ter celicah NK so proučevali vlogo katepsinov B, C, G, W. Do sedaj je bilo pokazano, da je katepsin W prisoten le v CD8⁺ T-celicah in celicah NK, vendar je le malo znano o njegovi funkciji ter regulaciji. Ker ima katepsin W omejeno izražanje v celicah NK in CTL, so njegovo vlogo povezovali s citotoksičnostjo, a so dokazi za to omejeni oziroma nasprotujoči si (Wex et al., 2003, Ondr et al., 2004, Stoeckle et al., 2007). Preučevali so tudi vlogo serinske proteinaze katepsina G v celicah NK. Te študije so pokazale, da je encimska aktivnost katepsina G pomembna za povečanje citotoksičnosti celic NK (Yamazaki et al., 1998). Med degranulacijo CTL so na površini CTL našli encimsko aktiven katepsin B (Bajali et al., 2002). Avtorji pa so predlagali, da lahko katepsin B cepi in inaktivira molekule perforina, ki difundirajo na membrano na površini CTL. Kasnejše študije na CTL, izoliranih iz miši z izbitim genom za katepsin B, so to hipotezo ovrgle (Baran et al., 2006). Za katepsin C je bilo pokazano, da aktivira serinski proteinazi grancima A in B v hematopoetskih celicah preko cepitve N-terminalnega dipeptida (Kummer et al., 1996, Pham et al., 1998). Nedavno so pokazali, da CTL, izolirani iz miši z izbitim genom za katepsin C, učinkovito pobijajo tarčne celice preko perforina, tako kot CTL miši divjega tipa. Imajo pa CTL, izolirani iz miši z

izbitim genom za katepsin C nekoliko znižano aktivnost grancima B in minimalno aktivnost grancima A, kar kaže, da so verjetno prisotne tudi druge proteinaze, ki sodelujejo pri aktivaciji grancimov (Sutton et al., 2007).

1.1.4 Katepsin L

Katepsin L se sintetizira kot neaktiven preproencim (McGrath et al., 1999). Proregija katepsina L je sestavljena iz 96 aminokislinskih preostankov (Coulombe et al., 1996). Zrela aktivna oblika katepsina L je enoverižna (30 kDa) ali dvoverižna, sestavljena iz 24/25 kDa težke verige, ki je povezana s 5 kDa lahko verigo z disulfidno vezjo (McGrath et al., 1999). Prevladuje dvoverižna oblika katepsina L. V antigen predstavitvenih celicah (APC) je katepsin L reguliran s PHK razreda II vezano invariantno verigo Ii (Lennon-Dumenil et al., 2001).

Poročali so, da ima eno leto stara miš z izbitim genom za katepsin L bolezn srca in podobne znake bolezni, kot so prisotni pri bolezni srčnih mišic pri človeku (kardiomiopatiji) (Stypmann et al., 2002). Popolno pomanjkanje katepsina L pri miših povzroči fibrozo v srčni mišici, podvojevanje jeder v celicah srčnih mišic, histološke spremembe srčnih mišic ter poslabšanje krčenja srčnih mišic pri starosti 12 mesecev. Pred kratkim so potrdili, da pomanjkanje katepsina L v srcu vpliva na lizosomski sistem, tako da se poveča število in spremeni morfologija kisljih organelov, čeprav pri tem ne pride do akumulacije specifičnih lizosomskih proteinov (Petermann et al., 2006). Poleg tega ti defekti v srčnih mišicah povzročijo kompleksno biokemijsko in celično spremembo, ki vodi do izgube citoskeletnih proteinov ter poslabšano delovanje mitohondrijev (Petermann et al., 2006), kar vodi v bolezen srčnih mišic. Miši z izbitim genom za katepsin L periodično izgubljajo dlake, pri čemer pride do tanjšanja epidermisa (Roth et al., 2000, Tobin et al., 2002). Do takšnega fenotipa naj bi prišlo zaradi kritične vloge katepsina L v endosomski/lizosomski fazi signaliziranja rastnih faktorjev v keratinocitih (Reinheckel et al., 2005). Nadalje so pri miši z izbitim genom za katepsin L opazili zmanjšano število CD4⁺ T-celic zaradi reducirane pozitivne selekcije v timusu in zmanjšanega volumna kostnega mozga (Nakagawa et al., 1998, Potts et al., 2004).

1.1.4.1 Interakcije katepsina L s stefinom B in histoni v jedru

Nedavno je bilo objavljeno, da je katepsin L aktiven v jedru, kjer cepi CUX1 transkripcijski faktor. To pa pospeši prehod celice v fazo S celičnega cikla (Goulet et al., 2004). Pomankanje

katapsina L povzroči preureditev celotne strukture kromatina in ponovne prerazporeditve specifično spremenjenih histonov (Bulyanko et al., 2006). Poleg tega so odkrili, da katapsin L cepi varianto histona H3 v jedru med diferenciacijo embrijomskih matičnih celic (Duncan et al., 2008).

In vitro katapsin L inhibirajo cistatini (Turk et al., 2001, Kopitar-Jerala, 2006), tiropini (Lenarčič in Turk, 1999) in nekateri izmed serpinov (Schick et al., 1998). Cistatini tipa I, ali stefini so večinoma znotrajcelični, medtem ko so cistatini tipa 2 v večini primerov zunajcelični (Abrahamson et al., 2003). Stefin B je lokaliziran v citosolu in jedru celic, ki se proliferirajo (Riccio et al., 2001). Pri pacientih z Unverricht- Lundborgovo boleznijo (EPM1) so odkrili mutacije v genu za stefin B, vendar mehanizem delovanja pri patogenzi te bolezni še ni do kraja pojasnjen (Lalioti et al. 1997). Poleg cistatinov so našli v jedru tudi nekatere druge inhibitorje proteinaz. MENT (ang. myeolid erythroid nuclear termination stage-specific protein), eden izmed inhibitorjev serinskih proteinaz (serpini), interagira z histoni in DNA in vpliva na razporeditev heterokromatina (Grigoryev et al., 1999).

1.2 Naravna in specifična imunost

Imunost izvira iz latinske besede *immunitas*, ki je pomenila zaščito rimskim senatorjem pred sodnimi postopki v času trajanja njihove funkcije. Zgodovinsko je imunost pomenila zaščito pred infekcijskimi boleznimi. Celice in molekule, ki so odgovorne za imunost, so del imunskega sistema, kateri odgovori na vnos tujih snovi v telo z imunskim odzivom (Abbas in Lichtman, 2003).

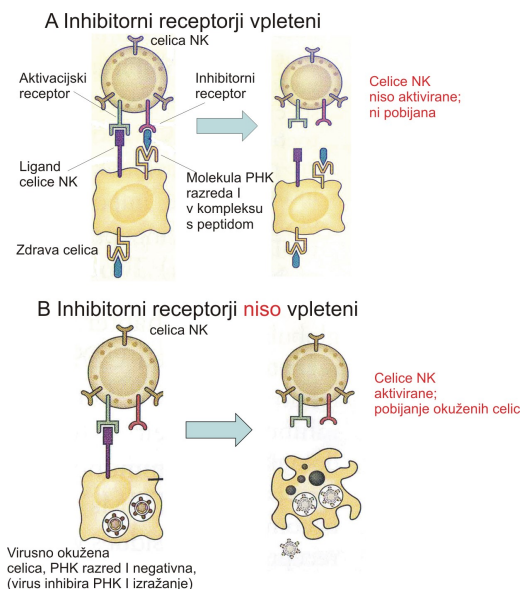
Imunski sistem ščiti organizem pred infekcijami z obrambo na več nivojih. Najbolj preprosta oblika – fizična prepreka preprečuje vstop patogenov, kot so bakterije in virusi, v organizem. Če patogen vdre preko te prepreke, naravni imunski sistem zagotovi hiter, a nespecifičen odgovor. Naravni imunski odziv je prisoten pri vseh rastlinah ter živalih (Litman et al., 2005), pogosto mu rečemo tudi prirojena imunost. Predstavljajo ga fizične in kemijske prepreke, kot so epitelij ter protimikrobne snovi, ki jih proizvajajo celice epitelija, fagocitne celice (nevtrofilci, makrofagi), naravne celice ubijalke (celice NK, ang. natural killer cells), komplementni sistem in številni citokini, ki uravnavajo aktivnost celic naravne imunosti.

Če se patogen uspešno izmuzne naravnemu imunskemu odzivu, vretenčarji odgovorijo še s tretjim nivojem obrambe, in sicer s specifičnim imunskim odzivom, ki mu največkrat rečemo pridobljena imunost. Pri tem imunski sistem prilagodi svoj odgovor med infekcijo, tako da

izboljšša prepoznavo patogenov. Ta izboljššan odgovor se potem obdrži, tudi ko se patogen odstrani, pri čemer se oblikuje imunološki spomin, ki omogoča specifičnemu imunskemu sistemu, da odgovori hitreje in intenzivneje, če se infekcija s specifičnim patogenom zopet ponovi. Imunski odziv pridobljene imunosti lahko razdelimo na celičnega in humoralnega. Efektorske celice humoralnega imunskega odziva so limfociti B, ki proizvajajo protitelesa, katerih naloge so prepoznavanje mikrobnih antigenov ter označevanje mikrobov za odstranitev z različnimi efektorskimi mehanizmi. Ta del imunskega odziva je namenjen odstranjevanju zunajceličnih mikroorganizmov. Pri celičnem imunskem odzivu imunski sistem prilagodi svoj odgovor med infekcijo, tako da izboljšša prepoznavo patogenov. Celični imunski odziv spodbudi uničenje fagocitiranih mikrobov v makrofagih

1.21 Naravne celice ubijalke (celice NK)

Celice NK delujejo kot primarni odgovor organizma na okužbe. So podvrsta citotoksičnih limfocitov, ki so sposobni lizirati maligno spremenjene ter z virusi okužene celice (Moretta et al., 2002). Izvirajo iz kostnega mozga in se aktivirajo s citokini, vzorci povezani s patogeni (PAMP, ang. pathogen-associated molecular pattern) ali s prepoznavo tarčnih celic, ki izražajo ligande za receptorje celic NK (Bottino et al., 2005). Nekateri inhibitorni receptorji celic NK prepoznajo molekule PHK razreda I, ki so prisotne na vseh zdravih celicah in preprečuje celicam NK, da bi napadle zdrave celice. Z virusi okužene ali maligno spremenjene celice izgubljajo molekule PHK razreda I, kar lahko vodi do aktivacije celic NK, pri čemer so udeleženi aktivacijski receptorji (Ljunggren et al., 1990) (Slika 1). Pri aktivaciji celice NK direktno lizirajo tarčne celice z eksocitozo perforina in grancimov, Fas liganda ali pa producirajo citokin IFN- γ , ki aktivira makrofage.



Slika 1: *Funkcija inhibitornih receptorjev celic NK*. A: Inhibitorni receptorji celic NK prepoznajo molekule PHK razreda I v kompleksu s peptidom, kar zagotavlja, da celice NK ne napadejo zdravih gostiteljskih celic B: Celice NK se aktivirajo ob stiku z okuženimi celicami, pri katerih je izražanje molekul PHK razreda I zmanjšano. Pri pomanjkanju molekul PHK razreda I inhibitorni receptorji niso udeleženi, so pa udeleženi aktivacijski receptorji. Rezultat je, da celice NK v tem primeru pobijejo okužene celice.

Celice NK se bojujejo proti virusom, tako da ubijejo z virusi okužene celice, vendar obstaja vse več raziskav, katere potrjujejo, da so celice NK vedno bolj sposobne kontrolirati in oblikovati specifični imunski odziv, ki je primarno sprožen z virusno infekcijo, tumorjem, transplantacijo ali avtoimunostjo (Andoniou et al., 2008). Vse več dokazov obstaja, da interakcije celic NK z dendritičnimi celicami (DC) igrajo ključno vlogo pri formiranju specifičnega imunskega odziva (Castillo et al. 2009). V številnih modelnih študijah okužb so pokazali, da celice NK lahko inducirajo zorenje DC preko $\text{TNF-}\alpha$ ali $\text{IFN-}\gamma$ in hkrati spodbudijo aktivacijo ter ekspanzijo CTL (Colonna, 2008). Pokazali so tudi, da regulatorne celice T zavirajo celice NK, tako da jih pobijejo preko citotoksične poti, sprožene s perforinom in grancimi (Zimmer et al., 2008).

Splošno se celice NK predstavlja kot citotoksične limfocite, ki se razvijejo iz prekurzorjev v kostnem mozgu, vendar obstaja vse več dokazov, da celice NK spadajo v podvrste z različno lokacijo, funkcijo in izvorom.

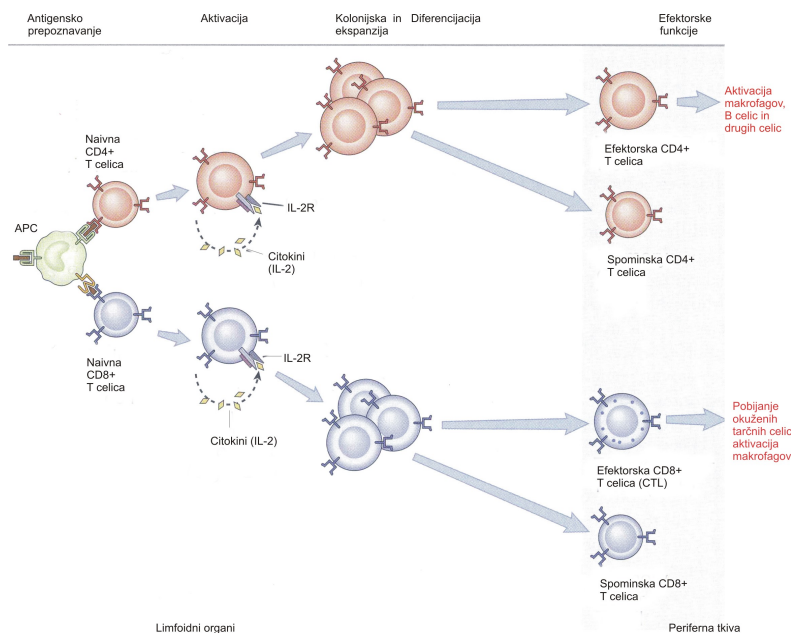
Moderno razumevanje mehanizmov funkcije in regulacije celic NK je omogočilo veliko novih pristopov v tumorski imunologiji, kot npr. aktivacijo endogenih celic NK;

- blokado inhibitornih receptorjev celic NK,

- aktivacijo dendritičnih celic in plazmocitoidnih dendritičnih celic preko receptorjev TLR, tako da lahko dendritične celice aktivirajo celice NK,
- odstranitev ali supresijo regulatornih T-celic,
- terapije z citokini, kot so IL-2, IL-15, IL-21, ki pospešeno aktivirajo celice NK,
- terapije z zdravil, ki sprožijo ekspresijo NKG2D-ligandov na tumorskih celicah (Chan et al., 2008).

1.2.1 Citotoksični limfociti T (CTL)

Tako kot celice NK imajo citotoksični limfociti T (CTL ali $CD8^+$ T celice) pomembno vlogo v imunskem sistemu; sposobni so prepoznavati in uničiti virusi okužene ali maligne spremenjene celice. Citotoksični limfociti T (CTL) se aktivirajo v perifernih limfnih organih s prepoznavo antigena na površini antigen predstavljajoče celice (APC). Pri tem se antigeni specifične T-celice pretvorijo iz naivnih T-celic v efektorske $CD8^+$ T-celice (CTL). Prepoznavna na antigen predstavljajoči celici (APC) je odvisna od prisotnosti molekul PHK razreda I, ki se vežejo z znotrajceličnimi antigenskimi peptidi in jih nato predstavijo na površini celice. Pri aktivaciji T celic sodelujejo tudi številne kostimulatorne molekule. CTL po aktivaciji prepoznajo enako molekulo PHK razreda I na površini z virusi okužene ali maligno spremenjene celice. Pri prvem srečanju CTL z antigenom pride do ekspanzije klona CTL. Aktivacija lahko traja nekaj dni. Po prvem srečanju CTL z antigenom je to podprto še s produkcijo spominskih $CD8^+$ T- celic, ki zagotavljajo hitrejši ter bolj efektiven odgovor, v primeru da se okužba z istim antigenom zopet pojavi (Cullen et al., 2007, Abbas in Lichtman, 2007) (Slika 2).



Slika 2: *Stopnje aktivacije T-limfocitov*. Naivne T-celice prepoznajo antigeni peptid vezan na molekule PHK razreda I na APC (antigeni predstavitevni celici). T-celice se odzovejo, tako da producirajo citokine (npr. IL-2) in izražajo receptorje zanje. Rezultat je klonijska ekspanzija T-celic in diferenciacija v različne efektorske funkcije T-celic.

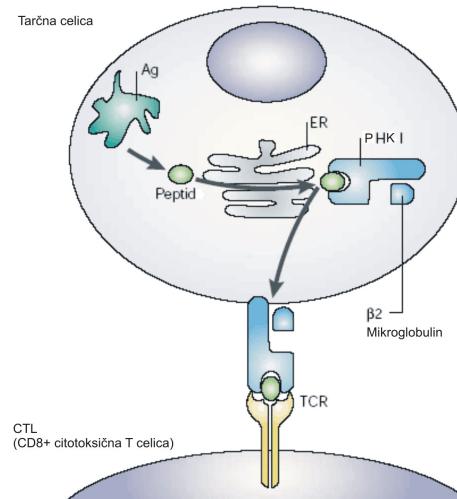
1.2.2 Prepoznavanje tarčnih celic pri CTL

Vsaka celica v organizmu mora imunskemu sistemu dovolj učinkovito pokazati, ali je bila okužena z intracelularnim patogenom (virusom ali bakterijo) oziroma je bila pod vplivom maligne spremembe. Ta proces se začne z razgradnjo tujih proteinov (antigenov) v manjše fragmente preko proteasoma; velikega cilindričnega multipodenotnega kompleksa. Proteasom je sestavljen iz večih podenot, ki imajo proteolitično aktivnost (Seemuller et al., 1996). S cepitvijo v proteasomu nastanejo peptidi, ki se nato aktivno transportirajo v endoplazmatski retikulum (ER). Tam se nato vežejo na ustrezne molekule PHK razreda I. Le-te se nahajajo v ER. Na koncu predstavitve se molekule PHK razreda I v kompleksu s antigenimi peptidi transportirajo preko Golgijevega aparata na površino celice.

CTL prepoznajo celice, ki izražajo antigen v kompleksu z molekulo PHK razreda I preko T-celičnega receptorja (TCR). Le-ta jim dovoljuje, da kontrolirajo skoraj vse celice v telesu in uničijo tiste celice, ki predstavljajo potencialno nevarnost za organizem.

Pri študijah T-celic se pogosto uporablja transgene miši, katerih T-celice izražajo specifični

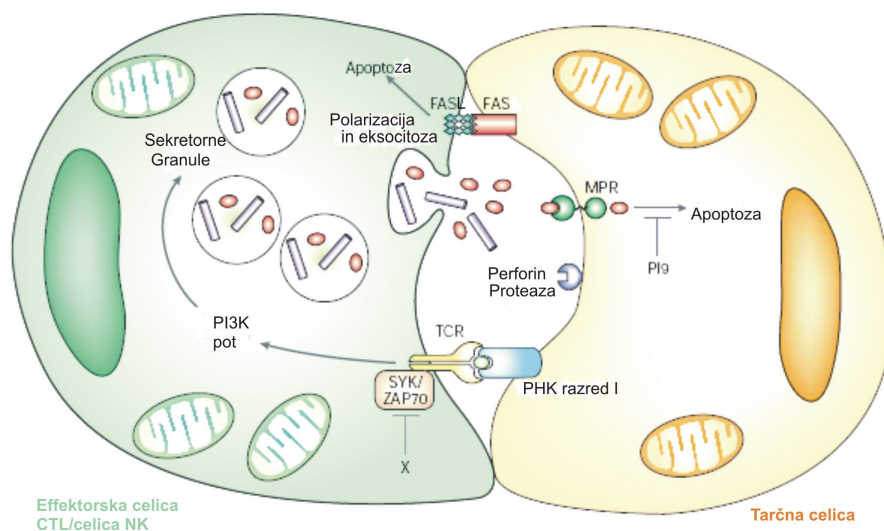
T-celični receptor. Eden najpogosteje uporabljenih mišjih transgenih TCR-modelov je OT-1 transgena miš, pri kateri CD8⁺ T-celice (CTL) izražajo ovalbumin (OVA) TCR, specifičen za peptid SIINFEKL, ki se predstavi na specifičnih molekulah PHK razreda I; H2 k^b na tarčnih celicah (Sterry et al., 1995).



Slika 3: *Prepoznavanje tarčnih celic pri CTL.* CTL izražajo T-celični receptor (TCR), ki prepozna antigeni peptid na površini tarčne celice. Le-ta je vezan na molekulo PHK razreda I. T-celični receptor prepozna na površini tarčne celice molekulo PHK razreda I in kratki antigeni peptid (9–10 aminokislin), ki sedi na površini molekule PHK razreda I. Celice na ta način lahko predstavijo antigeni peptid, katerega so pridobile z okužbo s paraziti ali virusi ali pri drugih malignih spremembah. Majhni antigeni peptidi se transportirajo v endoplazmatski retikulum (ER), kjer se vežejo z molekulo PHK razreda I in nato transportirajo na površje tarčne celice.

1.2.3 Mehanizmi pobijanja tarčnih celic z eksocitozo sekretornih granul CTL/celic NK

Citotoksični limfociti T in celice NK (skupaj jih imenujemo citotoksični limfociti) zaznajo okužene ali maligno spremenjene (skupaj jih imenujemo tarčne celice) in jih uničijo s pomočjo dveh mehanizmov, in sicer preko izločanja sekretornih granul (pot odvisna od perforina) ali preko receptorjev smrti; slednji mehanizem je sprožen preko Fas liganda, TNF (ang. tumour-necrosis factor) ali TRAIL (ang. TNF-related apoptosis inducing ligand). Prevladuje mehanizem preko izločanja sekretornih granul v imunološko sinapso, ki se tvori med efektorsko celico (CTL ali celico NK) ter tarčno celico (Griffiths et al., 2003). Pri CTL se granule sintetizirajo, ko celice prepoznajo specifičen antigen in se aktivirajo (Shresta et al., 1998), medtem ko se pri celicah NK granule sintetizirajo že med zorenjem.



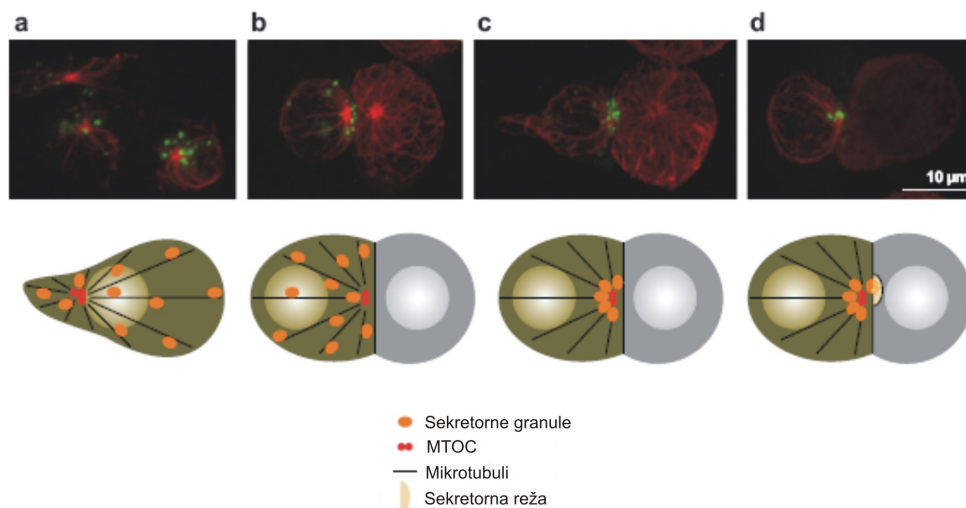
Slika 4: Smrt tarčne celice, sprožena preko sekretornih granul CTL/celice NK. Na sliki je prikazana interakcija T-celičnega receptorja (TCR) CTL z molekulami PHK razreda I in antigenim peptidom na tarčni celici, kar vodi do signalizacije preko fosfoinozitol kinaze 3 (PI3K). Le-ta sproži polarizacijo sekretornih granul ter eksocitozo granularnih toksinov. Pri tem pride do aktivacije Fas receptorja, ki sproži apoptozo v tarčnih celicah, ali pa do sproščanja vsebine sekretornih granul (perforina, grancimov in ostalih komponent), ki v tarčni celici sprožijo celično smrt.

1.2.3.1 Sekretorne granule

Sekretornim granulam pravimo tudi sekretorni lizosomi. Lizosome je prvič opisal Christian de Duve leta 1955 (de Duve, 2005). Nahajajo se v vseh celičnih tipih in vsebujejo lizosomske hidrolaze. Le-ti pri nizkem pH-ju lizosomov hitro razgradijo proteine v lizosomih. Zgodnje študije de Duva ter sodelavcev so pokazale prisotnost katepsina D v limfocitih (Bowers in de Duve 1967). Takrat so prvič opazili, da imajo lizosomi v limfoidnih celicah poleg razgradnje proteinov še neko dodatno vlogo, kar se je kasneje tudi izkazalo pri delovanju CTL. Dvojna vloga lizosomov pri CTL (Burkhard et al., 1990) je razvidna iz tega, da vsebujejo tako lizosomalne hidrolaze, ki so aktivne pri kislem pH, kot tudi sekretorne proteine kot je perforin, ki funkcioniira pri nevtralnem pH-ju. Sekretorne granule citotoksičnih limfocitov vsebujejo kompleksno mešanico citotoksičnih proteinov, in sicer perforin, grancime (družino serinskih proteinaz), kemokine ter strukturne elemente (npr. hondrotin sulfat proteoglikani), ki skupaj povzročijo smrt tarčne celice (Voskoboinik et al., 2006).

Ko CTL prepozna tarčno celico, pride do hitre polarizacije mikrotubulnega organizacijskega centra (ang. MTOC-microtubule organizing center) proti imunološki sinapsi (Kupfer et al., 1984), pri čemer se sekretorne granule hitro premikajo vzdolž mikrotubulov v smeri plazemske membrane (Kupfer et al., 1983) proti imunološki sinapsi, ki se tvori med

CTL oziroma celico NK in tarčno celico. Ko sekretorne granule prispejo na mesto sekrecije, se njihova vsebina sprosti v sekrecijsko režo, ki se tvori med efektorsko ter tarčno celico (Stinchcombe et al., 2001). Sekretorna reža ima obliko majhnega žepa med celicama, ki je nedostopen zunanemu okolju, kar zagotavlja, da so koncentracije citotoksičnih proteinov visoke, hkrati pa je onemogočeno izhajanje citotoksičnih proteinov iz sekretorne reže. Membrana granul je odporna na delovanje aktivnega perforina CTL. Obstaja možnost, da membrana granul štiti CTL pred škodljivim učinkom citotoksičnih proteinov.



Slika 5: Polarizacija sekretornih granul CTL pri stiku s tarčno celico. Imunofluorescenčne slike (zgoraj) in shema (spodaj) prikazujejo stopnje polarizacije mikrotubulov citoskeleta (označen z rdečo na zgornji sliki in s tankimi črnimi linijami na spodnji sliki) ter sekretorne granule (zgoraj zelene, spodaj oranžne) v CTL med tvorbo imunološke sinapse med CTL in tarčno celico. Iz slike je razvidno, da se v odsotnosti tarčnih celic MTOC (mikrotubularni organizacijski center; označen z rdečo) nahaja ob jedru. Ko CTL pride v stik s tarčno celico (b-d), se začnejo mikrotubuli in MTOC polarizirati proti slednji. Sekretorne granule na koncu sprostijo svojo vsebino v sekretorno režo (d).

1.2.3.2 Proteini udeleženi pri eksocitozi sekretornih granul

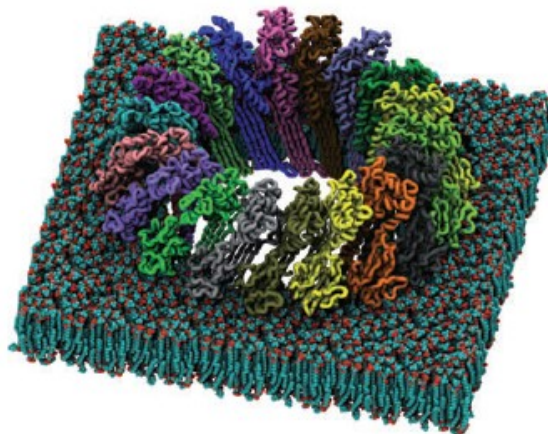
1.2.3.2.1 Perforin

1.2.3.2.1.1 Perforin in družina porinov

Perforin uvrščamo med proteine, ki tvorijo pore v celični membrani. Uvrščamo ga v družino porinov, med katerimi najdemo tako kratke peptide, kot velike globularne proteine. Zaradi njihove citolitične in pogosto toksične vloge jih imenujemo tudi toksini, ki tvorijo pore (ang. pore-forming toxins, PFT) (Saier et al., 2006). Proteini PFT predstavljajo eno tretjino vseh bakterijskih toksinov. Nahajajo se tako pri gram pozitivnih kot pri gram negativnih bakterijah, ožigalkarjih (cnidaria, aktinoporini), črvih (lizenin), glivah in rastlinah (Parker in Feil 2006).

Čeprav ima večina znanih proteinov iz družine PFT vlogo virulentnih faktorjev, ki omogočajo bakterijske okužbe, igrajo tudi pomembno vlogo pri evkariontih. Ena največjih sesalskih družin PFT je družina perforinu podobni proteinov, ki napadajo membrano (ang. MACPF, membrane attack complex/perforin-like proteins) (Tschopp et al., 1986). Sesalski proteini PFT imajo odločilno vlogo pri obrambi organizma pred bakterijskimi in virusnimi infekcijami, kot tudi pri nadzoru tumorjev (Smyth et al., 2000). Pomembna predstavnika evkariontskih proteinov PFT sta proteina imunskega sistema, protein C9 in perforin (Voskoboinik et al., 2006).

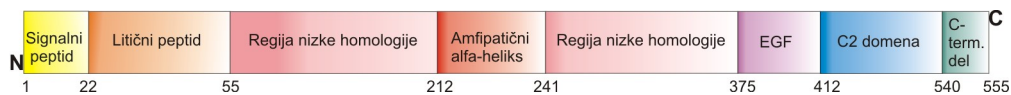
Konec 19. stoletja so identificirali komponente komplementa (C5b, C6, C7, C8 α - β - γ in C9), ki se zbirajo na površini Gram-negativnih bakterij in patogenih praživali (protozoa) in tvorijo proteinski kompleks, ki napada membrane, imenovan MAC (ang. membrane attack complex). Komponente C6, C7, C8 α , C8 β in C9 vsebujejo regijo, ki se imenuje MACPF. Biokemijske študije proteinov C8 α in C9 so pokazale, da je domena MACPF potrebna za vstavitve v membrano in tvorbo pore (Steckl et al., 1983). Leta 1984 so ugotovili, da ima perforin vlogo litičnega proteina PFT, ki se producira v celicah NK in CTL (Henkart et al., 1984). Ugotovili so, da perforin lahko sam povzroči lizo celic in posledično nekrotično celično smrt; omogoča pa tudi vnos proapoptotskih proteinaz (grancimov) v tarčno celico (Shiver et al., 1992). Na osnovi bioinformatičnih študij so predlagali, da se protein C9 in perforin vstavita v membrano z dvema amfipatskima α -heliksoma, ki sta locirana v najbolj ohranjeni regiji domene MACPF (pozicije 292-333 v aminokislinskem zaporedju; Peitsch et al., 1990).



Slika 6: Model pore, ki jo tvorijo proteini MACPF v lipidnem dvosloju (na osnovi strukture *Plu-MACPF*, PDB ID: 2QP2).

1.2.3.2.1.2 Perforin; struktura in funkcija posameznih domen

Perforin je bil prvič opisan leta 1985 in okarakteriziran kot protein, ki za svojo funkcijo potrebuje kalcij ter lahko tvori pore v membranah (Masson in Tschopp, 1985; Podack et al., 1985), zato ga uvrščajo v skupino citolitičnih proteinov. Perforin ima zelo majhno homologijo v aminokislinskem zaporedju z drugimi porini, njegovo zaporedje pa je zelo dobro ohranjeno v različnih organizmih, od rib do človeka (Hwang et al., 2004). Tako visoka stopnja ohranitve tekom 300 milijonov let evolucije kaže na bistveno in univerzalno biološko vlogo perforina. Za razliko od perforina so ostale komponente sekretornih granul, kot so grancimi, zastopani v različnih izooblikah pri različnih vrstah (Kaiserman et al., 2006). Izražanje perforina je med diferenciacijo limfocitov uravnavano z aktivacijo receptorjev (npr. TCR in NKG2D) in s citokini (IL-2, IL-15, IL-21). Izraža se v celicah NK, CTL, celicah T pomagalkah, T celicah $\gamma\delta^+$, celicah NKT, regulatornih celicah T in tudi v astrocitih (Gasque et al., 1998).



Slika 7: *Shematski prikaz funkcionalnih domen perforina*. Pri perforinu se najprej odcepi N-terminalni signalni peptid. Signalnemu peptidu sledi litični peptid (pozitivno nabiti N-terminalni peptid). Sledita regiji nizke homologije, katerih vloga še ni znana. Centralni del je amfipatični- α -heliks, domena, ki je zelo podobna proteinom MAC (ang. membrane attack complex), tej regiji pa sledita domena podobna epidermalnemu rastnemu faktorju, ki nima znane vloge pri perforinu in domena C2, ki je pomembna pri citotoksični aktivnosti in vezavi na membrano. Zadnjih 12-20 aminokislin na C-terminalnem delu se proteolitično odcepi pri aktivaciji perforina.

V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so opazili podobnost med porami, ki jih tvorijo perforin in komponente komplementa, ki vsebujejo MAC domeno, (ang. membrane attack complex), kot npr. C5b-C9, zato so predpostavljali bližnjo sekvenčno podobnost med perforinom in komponentami komplementa (Liu et al., 1995). Pred kratkim so določili strukturo domene MACPF, in sicer pri komponenti komplementa C8 α (Hadders et al., 2007) in proteinu Plu-MACPF iz bakterije *Photobacterium luminescens* (Rosado et al., 2007). Na osnovi znanih struktur so postavili model strukture perforina. Pri perforinu se domnevna domena MACPF nahaja približno v sredini zaporedja perforina. Predpostavljajo, da je strukturno ohranjena in tvori α -heliks, ki se vgradi v lipidni dvosloj. Nato si sledita dve daljši evolucijsko ohranjeni regiji, ki sta na obeh straneh α -heliksa domene MAC, ki sta prisotni le pri perforinu (Slika 7). Zaporedje skrajnega N-terminalnega konca (po odcepitvi signalnega peptida) je edinstveno za perforin (litični peptid). Sintetični peptidi pripravljene na osnovi te regije potrjujejo njeno litično aktivnost (Rochel et al., 1996).

Preostali del zaporedja perforina vsebuje dve domeni, ki sta bili že identificirani pri drugih družinah porinov: od kalcija odvisna membransko vezavna domena C2 in domena podobna epidermalnemu rastnemu faktorju. Najbolj raziskana domena perforina je domena C2, ki ima bližnjo homologijo z drugimi od kalcija odvisnimi proteini, ki so vpleteni v prenosu signalov in vezikularnemu transportu (Nalefski et al., 1996). Perforin potrebuje vsaj 100 μ M koncentracijo kalcija, da se učinkovito veže na membrano tarčne celice (Voskoboinik et al., 2005), poleg tega pa je perforin shranjen v granulah z nizko vrednostjo pH (< 5), kar povzroči protonacijo aspartatov odgovornih za vezavo kalcija v domeni C2. S tem je zagotovljena aktivacija perforina šele ob eksocitozi v imunološko sinapso (Voskoboinik et al., 2005).

Končnih 12–20 aminokislin predstavlja C-terminalni del, ki ni potreben za vezavo kalcija ali lizo celic. Pokazano je bilo, da se ta del odcepi od ostalega perforina skupaj z večjim N-

veznim glikanom (Uellner et al., 1997). Odstranitev glikana preko cepitve C-terminalnega dela bi bila lahko nujna za vezavo kalcija v domeno C2, poleg tega bi lahko glikan na C-terminalu ščitil pred toksičnostjo perforina, preden perforin pride v kislo okolje sekretornih granul. Proteaza, ki naj bi bila odgovorna za cepitev C-terminalnega dela, in cepitveno mesto še nista znana. Obstaja možnost, da so proteaze, odgovorne za ta proces, katepsini (Uellner et al., 1997, Konjar et al., 2010).

Aktivacija perforina je natančno reguliran proces s številnimi mehanizmi, ki preprečijo lizo CTL in celic NK. Domneva se, da se perforin deaktivira na določeni stopnji, in sicer s proteolizo, s čimer naj bi se citotoksični limfociti zaščitili pred aktivnim perforinom. Omenjen mehanizem naj bi zaščitil CTL pred delovanjem perforina. V nedavni študiji so pokazali, da se med eksocitozo sekretornih granul, na površini degranuliranih CTL nahaja encimsko aktiven katepsin B in ne katepsin L. Avtorji so sklepali, da katepsin B cepi in inaktivira perforin (Bajali et al., 2002), vendar so pred kratkim objavili, da CTL izolirani iz miši z izbitim genom za katepsin B pobijajo tarčne celice enako učinkovito kot CTL divjega tipa (Baran et al., 2006).

1.2.3.2.1.3 Perforin in njegova vloga pri bolezni

Pomen perforina pri vzdrževanju imunske homeostaze ter imunskega nadzora so poizkusili razložiti na podlagi razširjenih študij na miših z izbitim genom za perforin (Clark, 1994, Kagi et al., 1996). Te miši so zdrave, dokler živijo v sterilnem okolju. Tekom staranja razvijejo spontane agresivne B-celične limfome, če so izpostavljene patogenom ali virusom (Smyth et al., 2000). Ko so tumorje B-celic transplantirali v miši divjega tipa, so jih le-te zavrnilo, medtem ko miši z izbitim genom za perforin teh tumorjev niso zavrnilo. Miši z izbitim genom za perforin so tudi bolj dovzetne za kemično inducirane sarkome, nekatere izmed njih (10–15 %) razvijejo adenokarcinome med staranjem (Street et al., 2002). Pokazano je bilo, da celice NK prepoznajo in ubijejo maligne B celice (Smyth et al., 2000, Smyth et al., 1999). Perforin je najverjetneje ključna molekula pri ubijanju malignih B celic (Bolitho et al., 2009), vendar točen mehanizem, zakaj miši z izbitim genom za perforin razvijejo B-celične limfome, še ni poznan.

Miši z izbitim genom za perforin, ki so jih okužili z virusom LCMV so razvile hemofagocitno limfohistiocitozo (bolezen HLH), ki je podobna družinski hemofagocitni limfohistiocitozi FHL (ang. familial hemophagocytic lymphohistiocytosis) pri človeku (Stepp et al., 1999). Družinsko hemofagocitno limfohistiocitozo (FLH) so prvič opazili in

okarakterizirali 1950 (Farquhar et al., 1952), vendar genetska osnova tega sindroma takrat še ni bila znana. Leta 1999 je G. De Saint Basile s sodelavci objavila, da so pri pacientih s FHL prisotne mutacije v genu za perforinu (Stepp et al., 1999).

FHL je redka oblika pomanjkljivega imunskega sistema, pojavi se že pri dojenčkih ter otrocih. Simptomatski znaki so vročina, slabost, lahko se pojavijo motnje v razvoju otroka, hepatosplenomegalija, težave pri strjevanju krvi in nevrološki simptomi. Bolezen se lahko še poslabša z virusnimi infekcijami, čeprav ni znana direktna povezava s specifičnim patogenom. Bolezen je usodna, razen v primeru presaditve kostnega mozga (Henter et al., 2007). FHL se deduje avtosomalno recesivno.

Pri bolezni FHL CTL niso sposobni odstraniti antigen predstavitevni celic (APC), kar vodi do prekomerne oziroma nekontrolirane aktivacije in ekspanzije CTL ter makrofagov in močnega povišanja nivoja citokinov v plazmi, predvsem TNF- α ter interleukin-1 (Voskoboinik et al., 2006). V jetrih, vranici in kostnem mozgu pride do hemofagocitoze, pri čemer makrofagi fagocitirajo eritrocite (Fishman, 2000). Sklepajo, da pomankanje perforina vodi do prevelike populacije CTL. Posledica tega pa je povečano izražanje IFN- γ , ki aktivira makrofage (Menasche et al., 2005).

Tretjina pacientov z boleznijo FHL ima malo ali nič perforina v celicah NK in aktiviranih CTL. Odkrili so, da ima 30–40 % pacientov z boleznijo FHL mutacije na obeh alelih perforina (Fischer et al., 2007; Stepp et al., 1999). Številne mutacije v genu za perforin, povezane z boleznijo FHL, kažejo na to, da so citotoksične granule ključnega pomena pri vzdrževanju homeostaze imunskih celic, glavni akter pri tem pa je perforin. Mutacij, povezanih z boleznijo FHL, je v genu za perforin čez 50 (Menasche et al., 2005) in so razporejene vzdolž celotnega nukleotidnega zaporedja, večina pa se jih pojavi v delu, ki je homologen komponenti komplementa C9. Pokazano je bilo tudi, da 50 % pacientov z mutacijo na obeh alelih perforina razvije vsaj eno hematološko malignost v otroštvu ali adolescenci (Chia et al., 2009).

Odkrili so še nekaj drugih mutacij na genih, ki jih povezujejo z boleznijo FHL in sodelujejo pri eksocitozi granul CTL (Fischer et al., 2007). Pri 20 % pacientov z usodnimi posledicami bolezni FHL so našli mutacije na proteinu Munc13-4, ki je pomemben pri transportu sekretornih granul. Pokazali so tudi, da miši z izbitim genom za asparagil endopeptidazo (AEP) razvijejo klasične sindrome, ki so značilni za bolezen FHL (Chan et al., 2009), pri čemer je opazna tudi manjša aktivnost celic NK, kar bi lahko posledično kazalo na vpliv asparagil endopeptidaze pri regulaciji aktivnosti perforina.

Poleg pacientov s tipično obliko bolezni FHL (zgodnja oblika in minimalna aktivnost perforina), obstaja tudi pozna oziroma atipična oblika bolezni FHL. Pri atipični obliki se pri

nekaterih pacientih pojavlja točkovna mutacija, ki vodi v zamenjavo aminokislin, in sicer Ala91Val (Santoro et al. 2005). Različne študije so pokazale visoko alelna frekvenco za Ala91Val (~4–8 % zdrave populacije) (Molleran et al., 2004). Na osnovi teh študij se Ala91Val smatra kot nevtralen polimorfizem. Kar nekaj raziskav je pokazalo na povezavo med Ala91Val in bolezen FHL ali določeno obliko imunskega neravnovesja.

1.2.3.2.2 Grancimi

Grancimi so družina citotoksičnih serinskih proteinaz, ki se nahajajo v sekretornih granulah. Cepijo specifične substrate v citoplazmi, ter sprožijo programirano celično smrt. Perforin je ključna molekula, ki sodeluje pri transportu grancimov v tarčno celico (Russell in Ley, 2002).

Ljudje imamo 5 grancimov (A, B, H, K in M), medtem ko je pri miših prisotnih 11 grancimov (A, B, C, D, E, F, G, K, L, M, N) (Cullen in Martin, 2008). Razumevanje funkcije grancimov temelji večinoma na študijah miši z izbitim genom za posamezne grancime, ker študij, ki bi poročale o pomanjkanju ali disfunkciji grancimov pri človeku, trenutno ni (Russell in Ley, 2002).

Miši z izbitim genom za posamezne grancime nimajo tako izrazitega fenotipa kot miši z izbitim genom za perforin (Heusel et al., 1994). V sekretornih granulah sta najbolj zastopana grancima A in B, zato je bilo v preteklosti narejenih največ raziskav, osredotočenih na funkcijo teh dveh grancimov.

Med vsemi grancimi ima grancim B najizrazitejšo proapoptotsko funkcijo, saj je sposoben cepiti substrate za aspartatom kot kaspaze (znane cisteinske proteinaze, ki sodelujejo v apoptozi) (Sutton et al., 1997). Grancim B lahko direktno aktivira kaspaze pod določenimi pogoji v tarčni celici, vendar grancim B pogosteje sproži apoptozo preko intrinzične poti, ki se sproži s pomočjo mitohondrijev, pri tem grancim B učinkovito cepi protein BID iz družine proapoptotskih proteinov BH3 (BCL-2-homologne domene 3), lahko pa še nekatere druge substrate (Tabela 1). CTL iz miši z izbitim genom za grancim B sprožijo fragmentacijo DNA v tarčni celici počasneje kot divji tip miši, medtem ko CTL iz miši z izbitim genom za grancim A sprožijo apoptozo v tarčnih celicah enako učinkovito kot CTL miši divjega tipa.

Grancim A cepi substrate za bazičnimi aminokislinami in lahko inducira celično smrt, neodvisno od kaspaz s cepitvami posameznih komponent kompleksa SET. Po cepitvi se komponente kompleksa SET translocirajo v jedro ter inducirajo multiple enoverižne zarezne v DNK skozi aktivacijo nukleaze NM23-H1 (Lieberman et al., 2003).

Proapoptotske funkcije so bile opisane tudi za grancim C (proteolitska specifičnost še ni

znana) in grancim M (cepi za metioninom ter levcinom, izražen pa je v človeških in glodalskih celicah NK), medtem ko proapoptoske funkcije za grancima D in G (mišji), grancim H (mišji) ali grancim K (mišji in človeški) niso znane (Johnson et al., 2003; Kelly et al., 2004).

V preteklosti so raziskovanje usmerjali v proučevanje proapoptoskih funkcij grancimov, sodobnejši članki pa vedno pogosteje poročajo, da imajo grancimi tudi veliko drugih funkcij, ki so najverjetneje povezane z vnetji (Trapani et al., 1998; Devadas et al., 2006; Metkar et al., 2008).

Tabela 1 : *Seznam trenutno znanih grancimov (s podatki o njihovem specifičnem izražanju in specifičnosti njihovih substratov).*

Grancim	Vrsta	Specifičnost	Substrat
B	Človek/ Miš	Asp/Glu	BID Caspaza-3,-7,-8 ICAD alfa-Tubulin Rock II MCL-1 Lamin B PARP DNA-PK NuMa MI-2 Topoizomeraza 1 Hrutančni proteoglikan U1-70 kDa Neuronski glutamski receptor Humani homolog Ufd2p
A	Človek/ Miš	Arg/Lys	SET Ape 1 Histone H1 HMG2 Jederni histon Ku 70 lamins A-C
K	Človek/ Miš	Arg/Lys	BID SET
M	Človek/ Miš	Met/Leu	DFP45/ICAD PI-9
H	Miš	Phe/Leu (predpostavljeno)	Adenovirus DBP Adenovirus 100K AP
C	Miš	Asn/Ser (predpostavljeno)	Neznan
D	Miš	Phe/Leu (predpostavljeno)	Neznan
E	Miš	Phe/Leu (predpostavljeno)	Neznan
F	Miš	Phe/Leu (predpostavljeno)	Neznan
G	Miš	Phe/Leu (predpostavljeno)	Neznan

1.2.3.2.3 Seriglicin

Seriglicin je celični proteoglikan, ki je prisoten v hematopoetskih in endotelnih celicah (Kolest in Tveit, 2008). Zgrajen je iz osrednjega proteina, ki vsebuje 24 ponovitev Ser-Gly, na katere so vezani hondroitini sulfatni glikozaminoglikani (GAG) (Humpheris et al., 1992). Pomemben je pri nastajanju sekretornih granul ter vezavi vnetnih mediatorjev znotraj sekretornih granul (Kolset in Tveit, 2008).

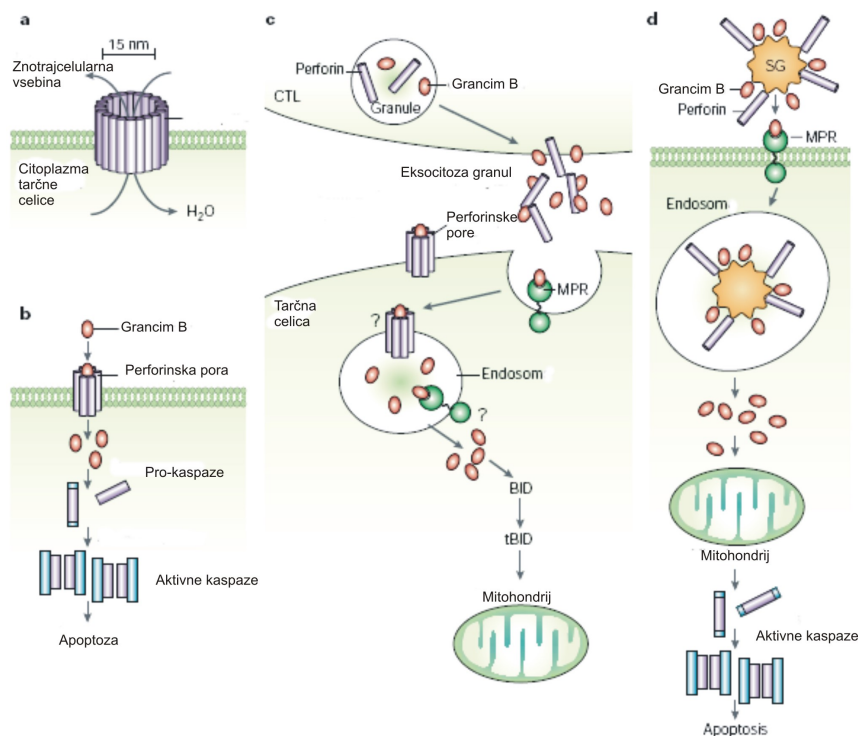
Vloga seriglicina pri citotoksičnosti je bila objavljena v več člankih (Metkar et al., 2002;

Raja et al., 2002), v katerih avtorji predlagajo, da se seriglicin, perforin in grancim skupaj vežejo v večji molekularni kompleks, ki vstopi skozi membrano ne da bi prišlo do nastanka por. Nedavna študija na miši z izbitim genom za seriglicin pa je pokazala, da seriglicin ni pomemben za dostavo grancima/perforina v tarčno celico. Namesto te vloge se predpostavlja, da ima seriglicin vlogo pri zorenju sekretornih granul ter shranjevanju grancima B (Grujic et al., 2005).

1.2.3.2.4 Predlagani mehanizmi sinergije med grancimom B in perforinom pri lizi tarčnih celic

Mehanizem sinergističnega delovanja med perforinom in grancimov še vedno ni popolnoma pojasnjen. Analize perforina v osemdesetih letih so pokazale, da očiščen perforin, dodan inertni membrani (npr. eritrocitom), povzroči poliperforinske pore, ki se inducirajo z osmotsko nestabilnostjo ter lizo tarčnih celic (Slika 8A). Ko so v devetdesetih odkrili proapoptotsko aktivnost grancima B, se je model dopolnil. Pore perforina naj bi omogočile pasivni prehod grancima skozi celično membrano, a za to hipotezo ni bilo nobenih oprijemljivih rezultatov (Slika 8B). Motyka in sodelavci so predlagali, da receptor manoza-6-fosfat (MPR) lahko deluje kot receptor za grancim B, preko katerega se nato grancim B dostavi v tarčno celico (Slika 8C) (Motyka et al., 2000). Metkar in sodelavci so predpostavili, da se grancim ter perforin skupaj vežeta na površini tarčne celice kot del makromolekularnega kompleksa, povezanega s seriglicinom (Slika 8D) (Metkar et al., 2002).

Trenutno obstajata dve delovni hipotezi, ki sta osnovani na membranolitičnih lastnostih perforina, razlikujeta pa se v napovedi mesta aktivnosti perforina. Prva teorija predlaga, da se perforin in grancimi vežejo na membrano tarčnih celic ter se hitro internalizirajo v endosom, ki ga perforin poškoduje, kar omogoči vstop grancima B v citosol tarčne celice. Druga teorija predlaga, da perforin permeabilizira plazemsko membrano, kar na nepojasnen mehanizem povzroči prehod grancimov v endosomom podoben vezikel (Keefe et al., 2005). Ne glede na predlagane mehanizme pa vse hipoteze predpostavljajo membranolitske sposobnosti perforina, na kar so se osredotočili pri prvih raziskavah v osemdestih letih.



Slika 8: Predlagani modeli celične smrti sprožene preko CTL/celic NK. A: Prvi model, ki je bil razvit v osemdesetih, ko je bil perforin prvič izoliran in takrat so tudi odrili membranolitične lastnosti perforina. Celica je umrla zaradi porušjenja homeostaze plazemske membrane, s čimer je v celico vdrla prekomerna količina vode. B: Ko so ugotovili, da perforin funkcioniira skupaj z grancim B, se je model dopolnil. Nova hipoteza je predlagala, da perforin naredi pore, skozi katere grancim B pasivno prehaja v citosol tarčne celice. C: V devetdesetih letih so odkritja predlagala, da grancim B vstopi v tarčno celico z endocitozo neodvisno od perforina. Poleg tega pa perforin v manjših količinah (skupaj z grancimom A in B) inducira hitro apoptozo v tarčni celici; pore perforina naj bi bile premajhne, da bi skozi njih učinkovito prehajali grancimi. Ni pa še bilo pojasnjeno, kako naj bi grancim B prišel iz endosoma v citosol. Domnevalo se je, da naj bi grancim B vstopil preko manoz-6-fosfatnega receptorja. D: Model je podoben prejšnjemu, s tem da predlaga vstop kompleksa seriglicina-perforina-grancima B v endosom.

1.2.4 Vloga interleukina 2 (IL-2) pri aktivaciji celic NK in CTL

Interleukin 2 (IL-2) je citokin, sestavljen iz 146 aminokislin. Poglavitni vir interleukina 2 so T-celice pomagalk, v manjših količinah pa ga sintetizirajo tudi druge imunske celice. Delovanje IL-2 se kaže v tem, da spodbudi limfocite T, B in celice NK ter omogoči njihovo razmnoževanje.

Pokazano je bilo, da IL-2 zviša nivo mRNA kakor tudi nivo proteina perforina, grancima A ter B v človeških levkocitih, pripravljenih iz periferne krvi (Liu et al., 1989). IL-2 inducira STAT 5, ki se veže na vezavno mesto v promotorski regiji perforina. (Yu et al., 1999), poleg tega lahko sproži izražanje citokinov (Farrar et al., 1981) in kontrolira rast in preživetje T-celic (Morgan et al., 1976). Poti signaliziranja, ki vodijo do teh efektov, še niso popolno razjasnjene, sestavljene so iz kompleksnih komunikacij med kinazami ter transkripcijskimi faktorji (Gaffen et al., 2001).

2 Namen dela

Mehanizem, kako perforin sodeluje pri ubijanju tarčnih celic, še ni povsem razjasnjen. Splošno velja, ko CTL/celica NK prepozna tarčno celico, se perforin in ostale komponente citotoksičnih granul sprostijo v imunološko sinapso. Perforin se sintetizira kot neaktiven prekurzor. K njegovi litični aktivnosti poleg nevtralnega pH in Ca^{2+} ionov prispeva tudi cepitev glikoziliranega C-terminalnega dela v kislem okolju sekretornih granul. Poročali so, da je ta cepitev inhibirana z E-64, kar nakazuje, da bi v procesu lahko bili vključeni papainu podobni katepsini ali kalpaini.

Namen dela je bil pojasniti vlogo katepsinov v življenjskem ciklu perforina. Bolj natančno, z našimi študijami smo hoteli ugotoviti, kateri izmed endosomalnih/lizosomalnih katepsinov je udeležen pri cepitvi C-terminalnega dela perforina in/ali degradaciji perforina.

Z eksperimenti na mešanih celičnih kulturah tarčnih celic in celic NK potrdili, da inhibicija cisteinskih katepsinov izrazito zmanjša ubijanje tarčnih celic. Z uporabo konfokalne mikroskopije smo pokazali, da je perforin delno kolokaliziran z katepsinom L, ne pa tudi z katepsini B, S, H in F v NK celičnih linijah YT in NK-92 in uspeli smo potrditi, da katepsin L odcepi C terminalni del perforina.

Naša delovna hipoteza je bila, da ima katepsin L pomembno vlogo pri procesiranju perforina ter citotoksičnosti celic NK, zato smo naredili poskuse na celicah NK in CTL katepsin L ničelnih miši. V nasprotju z našimi pričakovanji, so v prvih dneh po aktivaciji, celice NK katepsin L ničelnih miši še bolj učinkovito ubijale tarčne celice, kot kontrolne celice NK. Fenomena ta hip še ne znamo pojasniti, vendar s precejšno verjetnostjo lahko sklepamo, da so pri tem procesu pomembne funkcije katepsina L v jedru.

Poročali so, da katepsin L cepi v jedru transkripcijski faktor CUX1 (Goulet et al., 2004). Rezultati dela na celicah NK katepsin L ničelnih miši se navezujejo na regulacijo aktivnosti katepsina L v jedru z endogenimi inhibitorji. Namen dela pri tej temi je bil pojasniti interakcije med katepsinom L in inhibitorjema katepsina L stefinom B in serpinom A3G v jedru celic. Poročali smo, da lahko stefin B regulira aktivnost katepsina L v jedru celic T98G (Čeru et al., 2010) ter da serpin A3G kolokalizira s katepsin L v jedru makrofagov (Konjar et al., 2010).

3 Materiali in metode

3.1 Celične linije

Človeške celične linije; NK celične linije: celice YT (DSMZ, Nemška zbirka mikroorganizmov in celičnih kultur, Yodoi et *al.*, 1985), celice YT 5 (Dr. Mark Smith, Melbourne, Avstralija) smo gojili v gojišču RPMI (Invitrogen, ZDA). Celice NK-92 (Dr. Eric Vivier, Marseille, Francija, dr. Philph Bird, Melbourne, Avstralija) smo gojili v gojišču RPMI (Invitrogen, ZDA) ob dodatku 10 U/ml IL-2 (Roche, Švica). Levkemično celično linijo K562 (Dr. Eric Vivier, Marseille, Francija), ki smo jih uporabljali kot tarčne celice za celične linije NK in celično linijo mišjih makrofagov RAW 264,7 (ATCC), smo gojili v gojišču DMEM (CAMBREX Bio Science, Gibco, ZDA).

Mišje celične linije; EL4 in EG7, izolirane iz priželjca miši (Dr. Frank Carbone, University of Melbourne, Avstralija) smo gojili v gojišču DMEM, YAC-1 (ATCC, ZDA), mišje limfoma celice, ki smo jih uporabljali kot tarče za mišje celice NK, smo gojili v gojišču RPMI (Invitrogen). Gojiščem smo dodali 10 % fetalni telečji serum – FBS; Sigma (v primeru celic YT 20 % FBS), 100 U/ml penicilina in 100 µg/ml streptomocina (Invitrogen). Vse celice smo gojili v inkubatorju v kontrolirani atmosferi (37 °C, 5-odstotni delež CO₂ in atmosfera, nasičena z vodno paro).

3.2 Miši

BL/6 miši so bile kupljene v Walter and Eliza Hall Institute (WEHI) (Dr. Jose A. Villadangos, Parville Avstralija). Miš z izbitim genom za katepsin L so originalno dostavili v Melbourne iz laboratorijev Christopa Petersa in Thomasa Reinheckela (Reinheckel et *al.*, 2005). Miš z izbitim genom za katepsin L so križali z mišjo divjega tipa, pri kateri CTL izražajo OT-1 receptor (OVA-specifičen, H-2Kb-restriktiran T-celični transgeni receptor). Tako so generirali transgensko miš OT-1 z izbitim genom za katepsin L. Uporabili smo analizni protokol verižne reakcije s polimerazo, s katerim smo potrdili izostanek gena za katepsin L in potrdili prisotnost Lac Z kasete pri miši z izbitim genom. Izražanje OT-1 transgenega receptorja TCR je bila ocenjena z označevanjem CTL z CD8⁺ in protitelesi Vα2, ki smo jih

nato analizirali s pretočnim citometrom. Za eksperimente smo uporabljali 5–10 tednov stare miši. Vse študije so bile predložene etični komisiji Peter MacCallum Cancer Centra in John Curtin School of Medical Research ter so bile v skladu s pravili avstralske etične komisije o poskusih na živalih.

3.3 Priprava primarnih mišjih citotoksičnih limfocitov T (CTL) in celic NK iz OT-1 transgene miši

Za pripravo mišjih OT-1 citotoksičnih limfocitov T (dt (B6), $katL^{+/+}$, $katL^{-/-}$) smo 1 milijon celic iz vranice inkubirali z LPS (200 ng/ml) in peptidom ovalbumina SIINFELK (0,1 µg/ml) v plošči s 24 luknjami (1 ml v luknji) ali v plošči s 6 luknjami (do 8 ml na luknjo), inkubacija je potekala 3–5 dni. Viabilne celice $CD8^+$ CTL so bile nato očiščene s centrifugiranjem v gradientu Ficolla. Aktivacija citotoksičnih limfocitov T je bila potrjena z označitvijo receptorjev $CD8^+$, $V\alpha 2$, $CD25$, $CD69$ in nato analizo na pretočnem citometru Becton Dickinson FACS DIVA. Protitelesa $V\alpha 2$ smo uporabili za označitev receptorja OT-1 CTL, ker $V\alpha 2$ predstavlja del receptorja OT-1.

Mišje celice NK smo pripravili iz imunskih celic vranice miši OT-1 (dt (B6), $katL^{+/+}$, $katL^{-/-}$), in sicer z negativno selekcijo; za negativno selekcijo smo uporabili $V\alpha 2$ -biotinilirana protitelesa, konjugirana z mikrokroglicami (MACS, ZDA), pri čemer smo iz populacije imunskih celic vranice izločili $V\alpha 2$ -pozitivne CTL. Celice smo nato gojili v gojišču RPMI z 10 % FCS z 1000 U/ml IL-2. Po petih dneh inkubacije z IL-2 so bile celice primerne za eksperimente. Celice smo očistili s centrifugiranjem v gradientu Ficolla. Čistost populacije celic NK je bila potrjena z označitvijo receptorjev $NK1.1$, $CD8^+$, $V\alpha 2$, $CD69$, $CD25$ (protitelesa za označitev receptorjev, BD Bioscience, ZDA) in analizo na pretočnem citometru Becton Dickinson FACS DIVA.

dt = miš divjega tipa

$katL^{+/+}$ = miš divjega tipa iste družine (singenskega tipa)

$katL^{-/-}$ = miš z izbitim genom za katepsin L

3.4 *In vitro* cepitve rekombinantnega mišjega perforina z rekombinantnimi mišjim katepsini

Rekombinatni mišji perforin smo inkubirali z rekombinantnimi mišjimi katepsini B, L, S v

pufrih, v katerih so katepsini aktivni (katepsin B: 100 mM fosfatni pufer, pH 6.8; katepsin S: 50 mM acetatni pufer, pH 5.5; katepsin L: 100 mM acetatni pufer, pH 5.5 – vsi pufri vsebujejo 1 mM EDTA). Rekombinantne katepsine B, K, L in S smo dobili od sodelavcev z Inštituta Jožef Stefan (Cirman et al., 2004, Mihelič et al., 2008). Rekombinantni mišji perforin so pripravili v laboratoriju dr. JA Trapanija. (Voskoboinik et al., 2004) Perforin in katepsine smo inkubirali v molarnem razmerju 5:1 v končnem volumnu 25 μ l, ki smo mu dodali DTT (končna koncentracija 2 mM). Inkubacija je potekala 25 minut pri 37 °C. Inkubacijo smo zaključili z dodatkom nanašalnega pufra SDS in inkubacijo 9 minut pri 90 °C. Podobno smo naredili pri cepitvah perforina s katepsinom L. Naredili smo več molarnih razmerji perforina in katepsina L; in sicer 1 : 0.04, 1 : 0.1, 1 : 0.2 ter 1 : 1. Pri vseh razmerjih smo imeli enako količino perforina (180 nM), spreminjali pa smo količine katepsina L. Naredili smo še kontrolni eksperiment, kjer smo katepsin L predinkubirali z inhibitorjem L1 (Calbiochem, ZDA) 15 minut na 37 C in nato dodali perforin.

3.5 *In vitro* inihibicije rekombinantnega mišjega katepsina L s stefinom B in histoni

Katepsin L smo pred-inkubirali v 100 mM acetatnem pufru, 1 mM EDTA in 2 mM DTT 10 minut na sobni temperaturi. Aktivnost katepsinal L je bila določena s titracijo z inhibitorjem cistenskih katepsinov E-64 (Peptide, Japonska). Katepsin L (končna koncentracija 21,5 nM) smo inkubirali 5 minut z histoni izoliranimi iz kravjega timus (Sigma Aldrich, ZDA) s končnimi koncentracijami od 10,8 nM do 2,15 μ M. Pri določevanju interakciji stefina B in histonov smo stefin B (končna koncentracija 15 nM) predinkubirali z histoni v končnih koncentracijah od 10,8 nM do 2,15 μ M 5 minut. Po 5 minutni inkubaciji smo stefinu B in histonom dodali katepsin L (končna koncentracija 21,5 nM) in inkubirali nadaljnih 15 minut. Na koncu smo dodali substrat z-Phe-Arg-pNA (Bachem, Švica) v končni koncentraciji 100 μ M in določili začetno hitrost reakciji spektrofotometrično pri 410 nM.

3.6 Liza membrane ovčjih eritrocitov

V mikrotitersko ploščo s 96 luknjicami smo odpipetirali alikvot perforina (0.25 μ M) ali perforina predinkubiranega s katepsini (0.25 μ M perforina in 0.05 μ M katepsina – podoben postopek kot pri v poglavju 3,4), nato smo jim dodali ovčje eritrocite (končna koncentracija 2×10^7 /ml), 10 mM CaCl₂ in pufer HE (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2) do končnega volumna 200 μ l. To smo inkubirali 20 minut na 37 °C. Naredili smo negativno kontrolo, pri

kateri smo eritrocite inkubirali v pufru HE (spontano sproščanje hemoglobina), in pozitivno kontrolo, kjer smo eritrocitom dodali destilirano vodo, pri čemer so membrane eritrocitov popolnoma lizirale. Po inkubaciji smo ploščo centrifugirali 4 minute na 1400 rpm, vzeli supernatant ter pomerili sproščanje hemoglobina v supernatant z merjenjem absorbance pri 405 nm. Procent hemolize smo izračunali kot: $(OD_{405 \text{ nm}} \text{ vzorca} - OD_{405 \text{ nm}} \text{ negativna kontrola}) / (OD_{405 \text{ nm}} \text{ pozitivna kontrola} - OD_{405 \text{ nm}} \text{ negativna kontrola}) \times 100$.

3.7 Imunodetekcija in protitelesa

Celice smo zbrali po inkubacijah z inhibitorji katepsinov E-64d (Peptide Scientific Marketing Associates, Japonska), cathepsin L inhibitor L1 (Calbiochem, ZDA) ter tunikanamicinom (Calbiochem, ZDA) – časovni intervali inkubacij so navedeni v tekstu pri rezultatih – in jih nato centrifugirali 5 minut na 13000 rpm. Medij smo odstranili ter celice sprali s hladnim pufrom PBS. Celice smo nato inkubirali na ledu 15 minut v pufru RIPA (50 mM Tris [pH 7.5], 100 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Nonident P-40, 0.5 % (w/v) deoksiholična kislina, 1 mM EDTA). Lizatom, ki smo jih pripravljali za detekcijo perforina, smo v pufer RIPA dodali še koktajl proteaznih inhibitorjev (Sigma, ZDA) zaradi možnosti neželene proteolize med inkubacijo v pufru RIPA. Netopni material smo odstranili s 15-minutnim centrifugiranjem pri 13200 rpm na 4 °C ter supernatant prenesli v novo epico. Koncentracijo proteinov v celičnih lizatih smo določili z Bradfordovim testom (Biorad, ZDA) v mikrotiterski plošči s 96 luknjicami (prozorna, Costar, ZDA). Nato smo lizate nanašali s proteinsko maso 50 ali 100 µg nanašali 8 ali 10 % gele SDS-PAGE.. Po prenosu proteinov na nitrocelulozno membrano (Serva, ZDA) z aparaturom mokri prenos proteinov po Westernu (Owl Separation System, Velika Britanija) smo membrano blokirali 1 uro v 5 % mleku (posneto mleko v prahu [Pomurske mlekarne]), raztopljeno v 1 % Tween 20/PBS [145 mM NaCl, 2.5 mM NaH₂PO₄ × 2H₂O, 7.5 mM Na₂HPO₄ × H₂O] pri sobni temperaturi. Membrano smo nato inkubirali čez noč pri 4 °C z ustreznimi primarnimi protitelesi. Naslednji dan smo membrano sprali 2-krat 5 minut in 2-krat 15 minut v 1 % Tween 20/PBS, inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi v ustreznih HRP-konjugiranih sekundarnih protitelesih (rečenih v 1 % Tween 20/PBS; Sigma in Dianova), nato zopet sprali 2-krat 5 minut ter 2-krat 15 minut v 1 % Tween 20/PBS in detektirali proteine s kemiluminiscenčim kitom ECL (Amersham, ZDA) po navodilih proizvajalca. Pri razvijanju filmov smo uporabljali filme "Biomax Light Film", kaseto za razvijanje filmov Kodak X-OMAT, Kodakov razvijalec in fiksir.

Primarna protitelesa, ki smo jih uporabljali pri našem delu: perforin (monoklonska mišja, Mabtech, Švedska), katepsin L*, B*, S*, stefin B* (poliklonska in monoklonska protitelesa),

mišja monoklonska protitelesa PI-8 za perforin je prispeval Dr. Hideo Yagita (Kawasaki et al., 1990), mišja monoklonska protitelesa proti C-terminalna delu perforina (6G7/IG) so bila pripravljena v laboratoriju Dr. Joe Trapanija.

*Vsa nekomercialna monoklonska ter poliklonska protitelesa so bila pripravljena na Odseku za Biokemijo, Molekularno in Strukturno Biologijo, Instituta Jožef Stefan.

3.8 Merjenje aktivnosti katepsinov

V vsako luknjico mikrotitrne črne plošče (Greiner Bio-one, ZDA) smo nanegli ustrezen volumen vzorca, tako da je bila končna koncentracija proteinov v lizatih v vsaki luknjici 50 µg, dodali DTT (končna koncentracija 2 mM) in z pufrom Bana (2.5 mM Na₂HPO₄, 87.6 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 6) dopolnili do 90 µl. Vzorce smo nato inkubirali 15 minut pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo dodali substrat z-Phe-Arg-AMC (Bachem, ZDA) ustreznih koncentracij. Fluorescenco smo merili pri valovni dolžini vzbujanja 370 nm ter valovni dolžini emisije 460 nm. Rezultati so podani kot sprememba fluorescence v odvisnosti od časa.

3.9 Označevanje aktivnega mesta katepsinov v celičnih ekstraktih z biotinizirano probo DCG-04

Celotne celične lizate celic YT smo pripravili, kot smo že opisali v poglavju 3.7, nato smo dodali 2 mM DTT in inkubirali 10 minut pri 37 °C. S tem smo aktivirali katepsine. Nato smo lizatam dodali probo DCG-04, ustreznih koncentracij, inkubirali 1 uro pri 37° C, nato dodali nanašalni pufer SDS-PAGE ter vzorce segreli. Vzorce smo nanegli na 12 % gele SDS-PAGE. Po prenosu proteinov na nitrocelulozno membrano (Serva, ZDA) z aparaturo mokri prenos proteinov po Westernu (Owl Separation System, Velika Britanija) smo membrano blokirali 1 uro v 5 % mleku (posneto mleko v prahu [Pomurske mlekarne]), raztopljeno v 1 % Tween20/PBS. Sprali s pufrom PBS, inkubirali s streptavidin-biotiniziranimi protitelesi (rečeni v 1 % Tween 20/PBS) 1 uro pri sobni temperaturi, nato zopet sprali s pufrom PBS ter detektirali proteine s kemiluminiscenčim kitom ECL (Amersham, ZDA) po navodilih proizvajalca.

3.10 Merjenje aktivnosti grancimov

Pripravili smo celotne celične lizate celic NK-92 in celic YT 5. V vsako luknjico mikrotitrne prozorne plošče s 96 luknjicami (prozorna, Costar, ZDA) smo nanegli ustrezen volumen

vzorca, tako da je bila končna koncentracija proteinov v vsaki luknjici 50 µg proteinov in dopolnili do 50 µl s pufrom BAADT (0.1 M Hepes, 0.05 MgCl₂, pH 7.3). Pred meritvijo smo dodali še substrat v ustreznih koncentracijah. Aktivnost serinskih proteinaz smo zmerili z hidrolizo sintetičnih peptidov, ki so po sestavi tiobenzil estrski substrati: aspazna aktivnost, substrat Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl (J. Powers, Georgia Institute of Technology, ZDA) za merjenje aktivnosti grancima B; tripsinska aktivnost, substrat BLT (Sigma, ZDA) za merjene aktivnosti grancima A in kemotripsinska aktivnost, substrat Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (Enzyme system product, ZDA, za merjenje aktivnosti grancima H (Sutton et al., 2007).

3.11 Fluorescenčna mikroskopija

Celice NK smo s centrifugiranjem (Cytocentrifuge 2, StatSpin, ZDA) prilepili na objektna stekla, ki smo jih predhodno prevlekli s poli-L-lizinom. Celice smo fiksirali z metanolom 10 minut na temperaturi -20 °C. Nespecifično vezavo smo blokirali 30 minut s pufrom PBS, ki je vseboval 3-odstotni BSA (Sigma, ZDA). Za označevanje antigenov smo uporabljali primarna mišja monoklonska protitelesa: proti humanemu perforinu (Mabtech, Švedska), humanemu katepsinu L N135* in M105*; poliklonska protitelesa: LAMP-2 (Abcam, Velika Britanija), PDI (Abcam, Velika Britanija), katepsin L*, katepsin B*, katepsin S* . Primarna in sekundarna protitelesa smo redčili v pufri PBS s 3-odstotnim BSA.

Po enurni inkubaciji preparatov s primarnimi protitelesi, ustreznih koncentracij smo jih sprali s PBS ter jih eno uro inkubirali z 1:1000 (v/v) redčenimi ustreznimi antimišjimi Alexa Fluor 546 (rdeča fluorescenca, Molecular Probes, ZDA) in antizajčjimi Alexa Fluor 488 (zelena fluorescenca, Molecular Probes, ZDA). Po zadnjem spiranju mikroskopskih preparatov smo dodali reagent ProLong Antifade (Molecular Probes, ZDA). Fluorescentno mikroskopiranje smo nato naredili na konfokalnem mikroskopu Zeiss LSM 510.

*Vsa nekomercialna monoklonska in poliklonska protitelesa so bila pripravljena na Odseku za Biokemijo, Molekularno in Strukturno Biologijo, Instituta Jožef Stefan.

3.12 Metoda citotoksičnih testov na osnovi sproščanja izotopa ⁵¹Cr iz tarčnih celic

10⁶ tarčnih celic smo inkubirali s 75 µCi ⁵¹Cr v 100 µl gojišča eno uro na 37 °C. EL4, tarčne celice za mišje CTL, smo stimulirali s peptidom SIINFEKL (1 µg/ml) med inkubacijo z izotopom ⁵¹Cr. Mišje limfoma celice YAC-1 smo uporabili kot tarčne celice za mišje celice NK. Celice K562 smo uporabili kot tarče za celice NK-92 in celice YT 5. Po inkubaciji z izotopom ⁵¹Cr smo celice trikrat sprali z gojiščem, da smo odstranili proste izotope ⁵¹Cr, ki se

niso vezali v tarčne celice. Nato smo tarčne celice resuspendirali v mediju s končno koncentracijo tarčnih celic 1×10^5 celic/ml. CTL in celice NK smo inkubirali 4 ure s tarčnimi celicami v razmerjih E/T, kot so podani v rezultatih v mikrotiterskih ploščah s 96 luknjicami (Costar, ZDA). Nato smo poželi supernatante iz zmesi efektorskih celic NK ter tarčnih celic s supernatant zbiralnim sistemom Skatron (Molecular Devices, ZDA). Sproščanje izotopa ^{51}Cr v supernatant smo detektirali z uporabo γ -števca (Wall Wizard 1470; Perkin Elmer, ZDA). Spontanega sproščanja radioaktivnega izotopa iz tarčnih celic med samim citotoksičnim testom je bilo manj kot 10 % celotne inkorporirane radioaktivnosti. Procent sproščenega ^{51}Cr iz tarčnih celic smo izračunali z enačbo: [(cpm, sproščenega ^{51}Cr iz vzorca tretiranih tarčnih celic – cpm, sproščenega ^{51}Cr iz netretiranih tarčnih celic)/(cpm, sproščenega ^{51}Cr iz tarčnih celic, tretiranih z 1 M HCl – cpm, sproščenega ^{51}Cr iz netretiranih tarčnih celic)] (Sutton et al., 2007).

3.13 Pretočna citometrija

3.13.1 Določitev viabilnosti celic

Delež zgodnje- in poznoapoptotskih celic smo določili z označevanjem z aneksin V-PE (BD Bioscience, ZDA) in propidijevim jodidom (Sigma, ZDA). Aneksin V-PE, na katerega je vezan pikoeritin, se veže na fosfatidilserin, ki se na zunanjo stran membrane izpostavi med apoptozo.

Celice smo centrifugirali 4 minute na 1400 rpm in jih resuspendirali v pufru za vezavo aneksina V-PE, dodali aneksina V-PE, ustrezne koncentracije ter inkubirali 15 minut v temi pri sobni temperaturi. Po 15 minutah smo vzorcu dodali pufer za vezavo aneksina V-PE. Celicam smo 3 minute pred analizo s pretočnim citometrom dodali propidijevim jodidom ustrezne koncentracije ter pomerili fluorescenco označenega vzorca s pretočnim citometrom FACScalibur (Beckton Dickinson, ZDA).

3.13.2 Metoda citotoksičnih testov na osnovi pretočne citometrije

Tarčne celice K562 smo označili s CFSE (Molecular Probes, ZDA), ki smo ga detektirali na filtru FL1. Na ta način smo jih lahko s pretočnim citometrom analizirali ločeno od celic NK. Efektorske celice in tarčne celice smo inkubirali 4 ure v ploščah s 96 luknjicami. Nato smo mešanico celic NK-92 ter celic K562 centrifugirali, dodali aneksina V-PE in PI (enak

postopek priprave kot v poglavju 3.13.1) v pufru za aneksin V-PE ter pomerili delež zgodnje- in poznoapoptotskih celic na pretočnem citometru FACS Calibur.

3.13.3 Fenotipizacija CTL in celic NK

Pripravili smo splenocite iz vranice miši (dt, $katL^{+/+}$, $katL^{-/-}$) in v kulturi aktivirali CTL s peptidom SIINFEKL in LPS (kot smo že opisali v poglavju 3,3). Celice NK smo najprej ločili z negativno selekcijo iz splenocitov ter nato dodali IL-2 (1000 U/ml). Celice smo 3. in 5. dan aktivacije očistili s centrifugiranjem v gradientu Ficolla. Imunske celice smo inkubirali s protitelesi, ki so že bila konjugirana z določenim fluorescentnim markerjem. S tem postopkom smo preverili, če so kulture naših CTL in celic NK čiste. Da smo identificirali prisotnost ter aktivacijo OT-1 CTL, smo CTL inkubirali s protitelesi $CD8^+$, $V\alpha 2$, $CD69$, $CD16$, $CD4^+$. Za potrditev celic NK smo uporabili protitelesa $NK1.1.$, $CD8^+$, $V\alpha 2$. Po spiranju s PBS smo CTL in celice NK analizirali s pretočnim citometrom Becton Dickinson FACS DIVA.

3.13.4 Degranulacijski test na CTL

OT-1 CTL tretirane ali netretirane (24-urni tretma) z inhibitorji smo prešteli in označili s tripan modrim barvilom ter nato dodali tarčnim celicam EL4, stimulirali s peptidom SIINFEKL, EG7 in EL4 v razmerju efektorske celice (CTL) : tarčne celice = 2 : 1. Zmesi celic smo dodali protitelesa $CD107$, (detekcija na filtru FL1) in golgi stopom (blokira recikliranje sekretornih granul). Celice smo inkubirali 5 ur na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; 5% CO_2 . Po inkubaciji smo dodali protitelesa $CD8$ (detekcija na filtru 10). Po spiranju s pufrom PBS smo analizirali degranulacijo s pretočnim citometrom Becton Dickinson FACS DIVA.

3.14 Transfekcija perforina v OT-1 CTL, izoliranih iz miši z izbitim genom za perforin

OT-1 CTL perforin ničelnih miši smo pripravili podobno kot v metodah opisanih za OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši (kot smo že opisali v poglavju 3,3). Za izražanje perforina smo

uporabili 1×10^7 aktiviranih OT-1 CTL perforin ničenihi miši, katere smo predhodno transficirali s človeškim perforinom, ki je bil kloniran v dicistronski plazmid pIRES2-EGFP (Clonteh, ZDA), in dodali inhibitor L1. Transfekcijo smo izvedli z uporabo elektroporatorja Amaxa in nukleofektor mišjega T-celičnega kita (Amaxa Biosystem). 24 ur po transfekciji smo celice, ki so izražale enake količine EGFP ločili z napravo Becton Dickinson FACS DIVA Cell Sorter. GFP-pozitivne celice smo uporabili za 4-urni citotoksični test s ^{51}Cr označenimi in stimuliranimi (s peptidom SIINFEKL) tarčnimi celicami EL4.

3.15 Transfekcija perforina v celice RBL

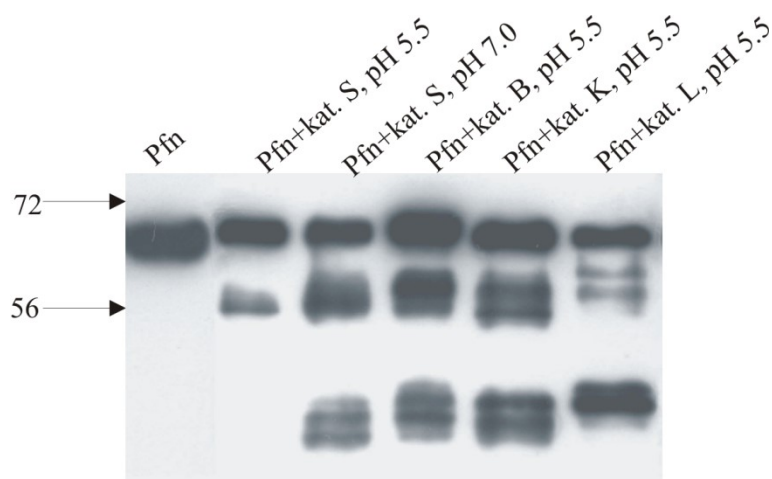
1×10^7 celic RBL (ang. rat basophilic leukemia) smo transficirali z mišjim perforinom, ki je bil kloniran v plazmid pIRES2-EGFP (Clonteh, ZDA) in dodali inhibitor E-64d. Transfekcijo smo izvedli z elektroporatorjem. 24 ur po transfekciji smo celice ločili z citometrom Becton Dickinson FACS DIVA Cell Sorter. Nato smo naredili lizate celic ter imunodetekcijo perforina s protitelesi, specifičnimi za C-terminalni del mišjega perforina, in protitelesi P1-8.

4 Rezultati

4.1 *In vitro* študije cepitev perforina s cisteinskimi katepsini

4.1.1 *In vitro* cepitve mišjega rekombinantnega perforina z rekombinantnimi mišjimi katepsini

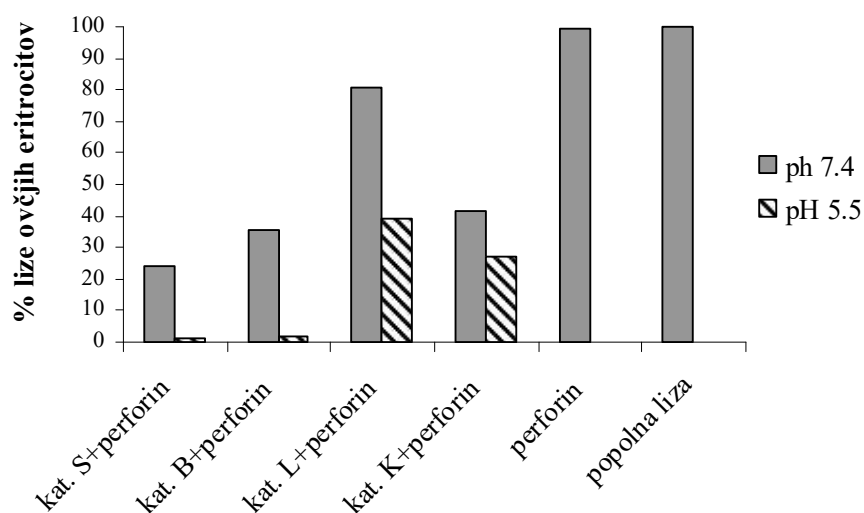
Uellner in sodelavci so poročali, da se perforin aktivira s proteolitično cepitvijo ~12–20 aminokislin iz C-terminalnega dela perforina, in da je ta cepitev inhibirana z inhibitorjem cisteinskih katepsinov E-64, inhibitorjem cisteinskih ter serinskih proteinaz leupeptinom in NH_4Cl , kar kaže na vlogo cisteinskih katepsinov v tem procesu (Uellner et al., 1997). Objavljeno je bilo, da katepsin B razgradi ter inaktivira perforin na površini CTL (Bajali et al., 2002), vendar kasnejše študije, pri katerih so uporabili CTL, izolirane iz katepsina B ničelnih miši, te ugotovitev niso potrdile (Baran et al., 2006). Z našimi študijami smo hoteli ugotoviti, kateri izmed katepsinov je udeležen pri cepitvi C-terminalnega dela perforina ali degradaciji perforina. Rekombinantni mišji perforin in rekombinantni mišji katepsin smo inkubirali v molarnem razmerju 5:1, kot je opisano v materialih ter metodah. *In vitro* pri pH 5.5 poleg katepsina B cepijo perforin še katepsini K, L in S (Slika 9). Z imunodetekcijo perforina vidimo lise pri 70 kDa, 56 kDa ter nižje lise, ki so produkt razgradnje. Ker ima katepsin S pH optimum pri 7 (Kirschke et al., 1989), cepi perforin pri pH 7 boljše kot pri pH 5.5 (Slika 9).



Slika 9: *In vitro* cepitve rekombinantnega mišjega perforina z rekombinantnimi mišjimi katepsini. Imunodetekcija mišjega perforina s protitelesi P1-8. Rekombinantni mišji perforin smo inkubirali z mišjimi katepsini B, K, L in S v molarnem razmerju 5 : 1 (pfn: katepsin) 25 minut na 37 °C.

4.1.2 Liza membran ovčjih eritrocitov s perforinom in perforinom, cepljenim s katepsini

Pokazali smo, da katepsini cepijo ter razgradijo perforin *in vitro* (Slika 9). Želeli smo ugotoviti, če ima to posledice na aktivnost perforina. Naredili smo test, kjer smo z lizo membran ovčjih eritrocitov testirali učinkovitost perforina, predinkubiranega s katepsini. Po istem postopku kot v poglavju 4.1.1 smo rekombinantni mišji perforin inkubirali z rekombinantnimi mišjimi katepsini pri pH 5,5 in pH 7. Perforin ter perforin, predinkubiran s katepsini, smo nato dodali ovčjim eritrocitom. Največje razlik med kontrolnim eksperimentom in perforinom predinkubiranim s katepsini smo ugotovili pri predinkubaciji perforina s katepsinoma B in S.



Slika 10: Liza ovčjih eritrocitov s perforinom in perforinom, predinkubiranim s Katepsini. Rekombinantni mišji perforin so inkubirali z rekombinantnimi mišjsimi Katepsini. Liza ovčjih eritrocitov je potekala 20 minut na 37 °C. Hemoglobin, sproščen iz ovčjih eritrocitov, je bil detektiran kot absorbanca pri 405 nm $\% \text{ lize} = (\text{ODvzorec } 405 \text{ nm} - \text{ODspon. } 405 \text{ nm}) / (\text{ODmaxdH}_2\text{O} - \text{ODspon. } 405 \text{ nm})$.

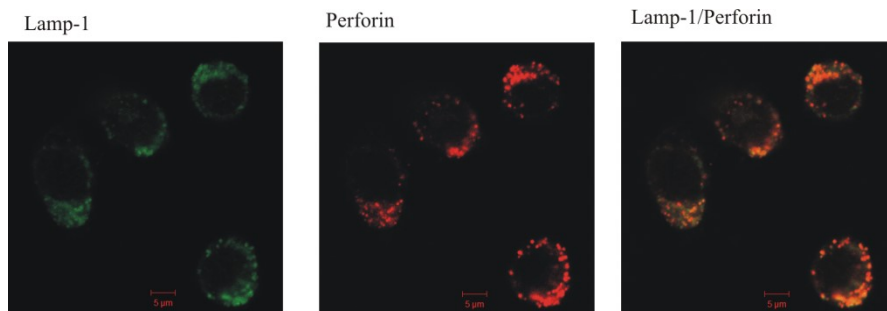
4.2 Kolokalizacijske študije Katepsinov, perforina, PDI in lamp-1 v celični liniji YT NK

Poročali so, da procesiranje perforina poteka v kislem okolju sekretornih granul (Uellner et al., 1997). Da bi ugotovili kateri izmed Katepsinov je odgovoren za procesiranje perforina *in vivo*, smo preverili s katerimi Katepsini se perforin nahaja skupaj v sekretornih granulah. Preverili smo kolokalizacijske perforina s Katepsini B, L in S v celičnih linijah celic NK YT (Slika 11) ter NK-92 (podatki niso prikazani). Človeška celična linija celic NK YT (Yodoi et al., 1985) konstitutivno sintetizira perforin, medtem ko celična linija celic NK-92 potrebuje IL-2 za rast, proliferacijo in citotoksičnost (Sun et al., 2004). Preverili smo tudi kolokalizacije perforina z markerjem za endoplazmatski retikulum PDI-jem in markerjem za endosome/sekretorne granule Lamp-1.

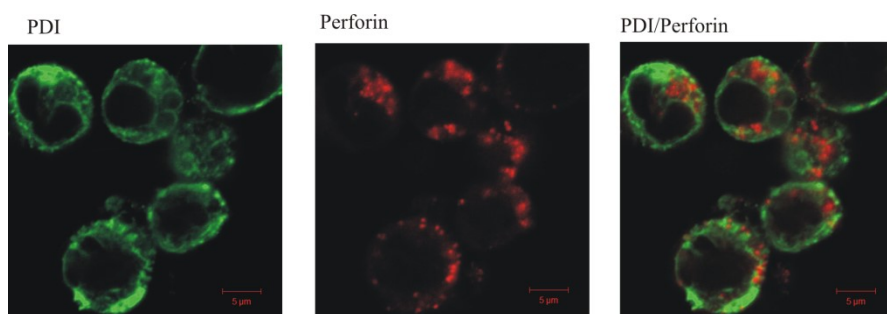
V celični liniji YT celic NK perforin popolnoma kolokalizira z markerjem za lizosomom podobne organele Lamp-1 (Slika 13A), kot je že bilo objavljeno (Peters et al., 1991). Kolokalizacije perforina in ER-markerja PDI-jem nismo detektirali (Slika 11B), kar nakazuje, da se perforin nahaja v sekretornih granulah. Katepsin B ter Katepsin S s perforinom (Slika 11D in 11E) ne kolokalizirata, našli pa smo delno kolokalizacijo Katepsina L s perforinom

(Slika 11C). Podobne rezultate, kot smo jih dobili s celicami YT , smo dobili tudi s celicami NK-92. Katepsin L delno kolokalizira tudi z inhibitorjem katepsina L cistatinom F v celicah YT (Slika 11F). Kar kaže na potencialno vlogo cistatina F pri regulaciji aktivnosti katepsina L.

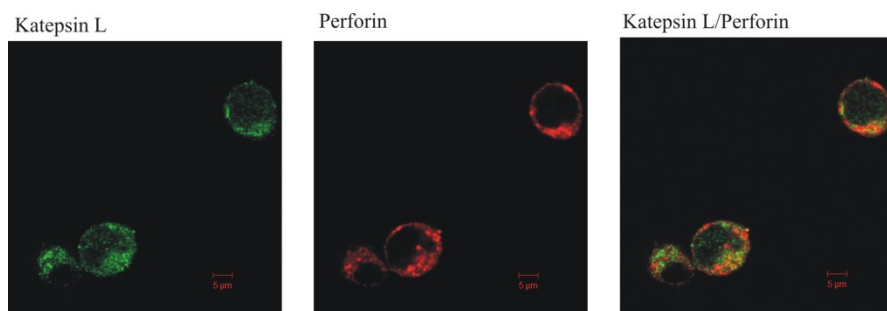
11 A



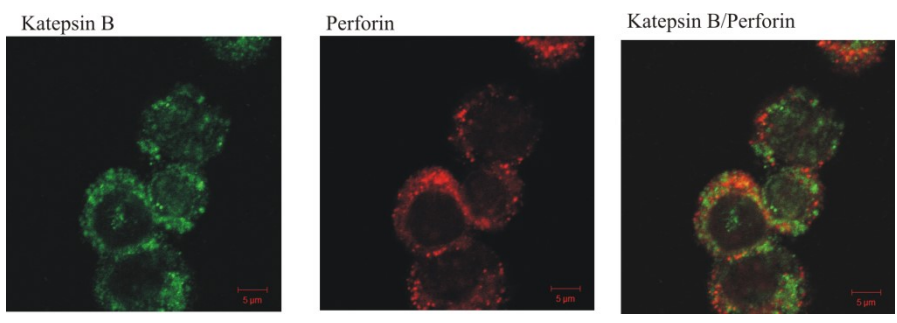
11 B



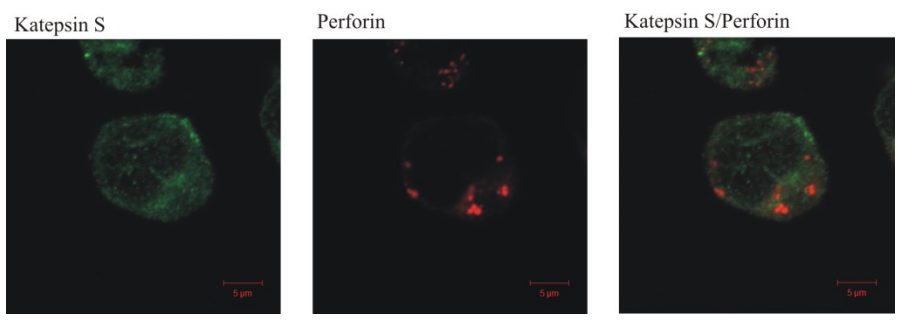
11 C



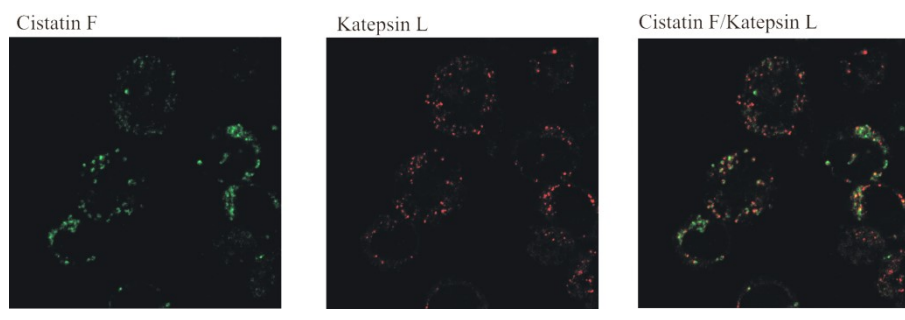
11 D



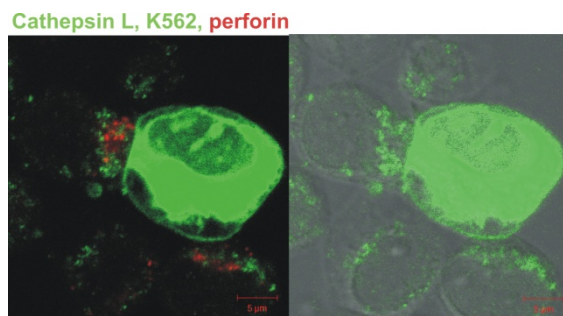
11 E



11 F



11 G



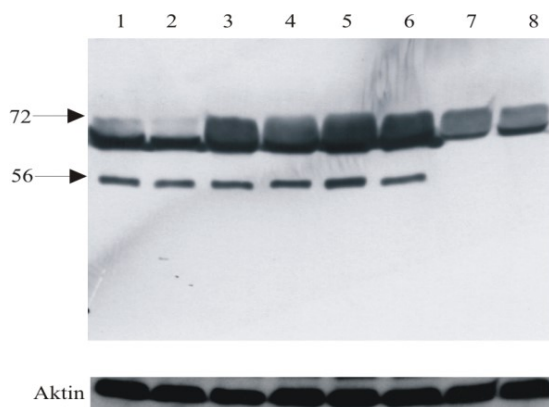
Slika 11: Kolokalizacije perforina z *lamp-1*, *PDI*, *katapsini B, L* in *S. Typhimurium*. Katepsine B, L, S, PDI, Lamp-1 ter perforin v celicah YT smo označili z imunofluorescenco. Uporabili smo specifična monoklonska in poliklonska protitelesa. Katepsine B, L, S, PDI in lamp-1, cistatin F smo označili s primarnimi zajčjimi protitelesi ter sekundarnimi kozjimi (antizajčjimi) protitelesi Alexa Flour TM488 (zelena barva). Perforin smo označili s primarnimi mišjimi protitelesi in sekundarnimi kozjimi (antimišjimi) protitelesi Alexa Flour TM 546 (rdeča barva). Pripravili smo tudi preparate mešanih kultur celic NK-92 in tarčnih celic K562, označenimi s CFSE, v katerih smo nato označili katepsin L ter perforin (kot zgoraj opisano). Celice K562 smo označili z barvilom CFSE. (Slika 11G).

4.3 Vpliv cisteinskih katepsinov na procesiranje perforina

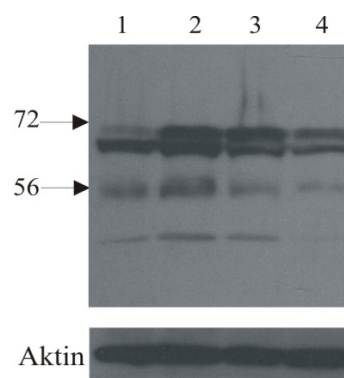
4.3.1 Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na procesiranje perforina v celičnih linijah NK

V prejšnjem poglavju smo pokazali delno kolokalizacijo katepsina L in perforina. Uellner ter sodelavci so objavili, da je procesiranje perforina blokirano z NH_4Cl in inhibitorjem cisteinskih katepsinov E-64. V naslednjem koraku smo želeli analizirati, kako so katepsini (posebej katepsin L) udeleženi pri procesiranju perforina. Celice NK smo inkubirali z inhibitorjem cisteinskih katepsinov E-64d (Barett et al., 1982) ter inhibitorjem L1 za katepsin L (z-Phe-Phe-CH₂F, Urbich et al., 2005, Hsu et al., 2009), in sicer 24 ur. Kot model celic NK smo uporabili človeške celične linije celic NK: NK-92, YT 5, KHGY1, YT. Pri celicah YT smo želeli ugotoviti, ali ima IL-2 vpliv na procesiranje perforina, vendar razlik nismo opazili. Po inkubaciji celic NK z inhibitorji smo pripravili celične lizate. Pri celicah NK, ki so bile inkubirane z inhibitorji katepsinov, smo pri imunodetekciji perforina opazili liso ~70 kDa, ki ustreza neprocesirani obliki perforina (Slika 12). Pri celicah NK, ki niso bile tretirane z inhibitorji, pa smo opazili liso ~60 kDa, ki predstavlja procesirano obliko perforina (Slika 12). Inhibitor katepsina L L1 je preprečil procesiranje perforina enako učinkovito kot E-64. Pri eksperimentu, kjer smo celice NK inkubirali z amonijevim kloridom (10 mM), ki zviša pH sekretornih granul ter s tem prepreči procesiranje perforina, smo opazili liso ~70 kDa, ki ustreza neprocesirani obliki perforina (Slika 12).

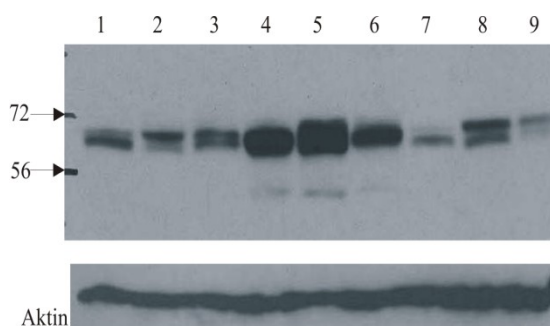
A



B



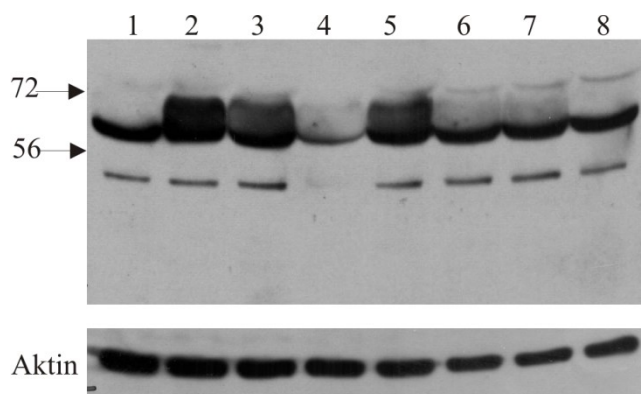
C



Slika 12: *Inhibicija procesiranja perforina z E-64d, L1 in NH4Cl v celicah NK.* Imunodetekcija perforina pod redukcijskimi pogoji. A: Celična linija YT. Celice smo gojili v prisotnosti ali odsotnosti E-64d, 30 μ M, L1, 20 μ M, NH4Cl, 10 mM in IL-2, 100 U/ml. Na gele SDS-PAGE smo nanegli 100 μ g proteina. Imunodetekcija perforina je bila narejena z mišjimi monoklonci: Pf-344; 1-kontrola; 2-kontrola + IL-2; 3-E-64d; 4-E-64d + IL-2; 5-L1; 6-L1 + IL-2; 7-NH4Cl; 8-NH4Cl + IL-2. B: Celična linija YT 5. Celice smo gojili v prisotnosti ali odsotnosti E-64d, 20 μ M, L1, 10 μ M, NH4Cl, 10 mM. Na SDS-PAGE smo nanegli 50 μ g proteina. Imunodetekcija perforina je bila narejena s protitelesi P1-8: 1-kontrola; 2- E-64d; 3- L1; 4-NH4Cl. C: Celične linije NK-92, YT 5 in KHGY1. Celice smo gojili v prisotnosti ali odsotnosti L1, 20 μ M, NH4Cl, 10 mM. Na SDS-PAGE smo nanegli 100 μ g proteina. Imunodetekcija perforina je bila narejena s protitelesi P1-8 : 1-NK-92; 2-NK-92, L1; 3-NK-92, NH4Cl; 4-YT 5; 5-YT 5, L1; 6-YT 5, NH4Cl; 7-KHGY1; 8-KHGY1, L1; 9-KHGY1, NH4Cl..

4.3.2 Vpliv tunikanamicina in inhibitorjev cisteinskih katepsinskih na procesiranje perforina

Perforin ima dve potencialni mesti N-glikolizacije. Prvo na 205. aminokislini (zaporedje aminokislin: asparagin, alanin, serin, treonin – NAST) in drugo na C-terminalu, na 549. aminokislini (zaporedje aminokislin: asparagin, arginin, serin, glicin – NRSG) (Lichtenheld et al., 1988; Uellner et al., 1997). Zanimalo nas je, če katepsini odcepijo N-glikoziliran C-terminalni del perforina pri procesiranju perforina. Pri naših študijah N-glikozilacije smo uporabili antibiotik tunikanamicin, ki povzroči stres na endoplazmatski retikulum ter blokira N-glikozilacijo proteinov (Zhou et al., 2008; Guarnaccia et al., 1983). V prejšnjem poglavju smo že pokazali, če celice YT inkubiramo z E-64d 24 ur pri imunodetekciji perforina, opazimo liso ~70 kDa, ki ustreza neprocesirani obliki perforina (Slika 12, Slika 13). Poskus smo ponovil s to spremembo, da smo v zadnjih osmih urah inkubacije dodali še tunikanamicin (Slika 13). Pri imunodetekciji perforina smo zopet opazili neprocesirano obliko perforina (~70 kDa), vendar manj kot pri inkubacijah, kjer smo dodali samo E-64d. Če smo podaljšali čas inkubacije s tunikanamicinom na 22 ur vzporedno z inkubacijo z E-64d (Slika 13, lisa 6), pa smo opazili liso pri ~60 kDa, ki naj bi ustrezala deglikoziliranemu in hkrati neprocesiranemu perforinu. Ker je razlika med neprocesiranim-deglikoziliranim ter procesiranim perforinom samo v 20 aminokislinah, tega zamika ne moramo detektirati z imunodetekcijo (Slika 13). Rezultati kažejo, da katepsini cepijo N-glikoziliran C-terminal del perforina.



Slika 13: *Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov in tunikanimicina na procesiranje in N-glikozilacijo perforina.* Celice YT smo gojili v prisotnosti ali odsotnosti E-64d, 20 μ M, L1, 10 μ M, tunikanimicina, 1 μ g/ml in NH_4Cl , 15 mM. Na gele SDS-PAGE smo nanesti 100 μ g proteina, imunodetekcija je bila narejena s protitelesi Pfn-344; 1-kontrola; 2-E-64d, 24 h; 3-L1, 24 h; 4- NH_4Cl , 24 h; 5-E-64d, 24 h + tunikanimicin, 8 h; 6-E-64d, 24 h + tunikanimicin, 22h; 7-E-64d, 24 h + tunikanimicin, 22 h + tunikanimicin, 8 h; 8-tunikanimicin, 8 h.

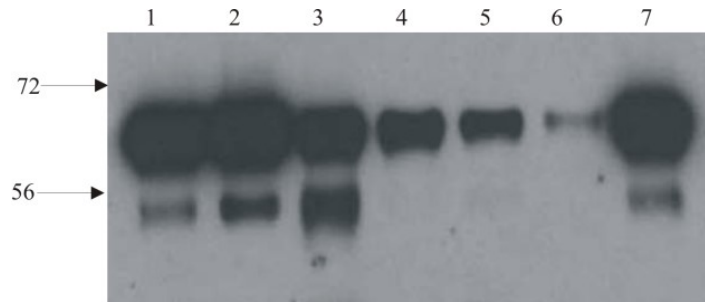
4.3.3 *In vitro* cepitve perforina s katepsinom L

Na podlagi kolokalizacije perforina s katepsinom L in vpliva inhibitorja katepsina L L1 na procesiranje perforina v celičnih linijah celic NK smo v naslednjem koraku hoteli ugotoviti, ali je katepsin L odgovoren za procesiranje C-terminalnega dela perforina.

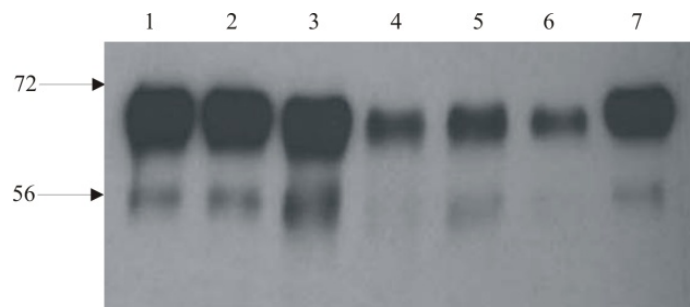
Za analizo *in vitro* cepitve rekombinatnega mišjega perforina z rekombinatnim mišjim katepsinom L smo uporabili specifična monoklonska protitelesa (6G7/1F10), ki prepoznajo C-terminalni del mišjega perforina (Voskoboinik et al.; v pripravi), ter monoklonska protitelesa P1-8, ki prepoznajo različne epitope na perforinu (Kawasaki et al., 1990). Perforin smo inkubirali s katepsinom L v molarnih razmerjih perforin: katepsin L, 1:0.04, 1:0.1, 1:0.2, 1:1. Perforin je bil pri vseh tretmajih 180 nM, spreminjali pa smo koncentracijo katepsina L. Pri kontrolnem eksperimentu smo katepsin L predinkubirali z inhibitorjem L1 in nato dodali perforin. S tem smo potrdili, da med samim eksperimentom ni prišlo do kontaminacij z drugimi encimi, in da je za cepitev perforina odgovoren katepsin L. Po inkubaciji perforina s katepsinom L smo vzorce razdelili na dva dela in jih nanesti na gele SDS-PAGE ter imunodetektirali perforin s C-terminalnimi protitelesi (6G7/1F10) (Slika 14A) in protitelesi P1-8 (Slika 14B). Membrani na Slikah A ter B sta bili pripravljene iz enakih vzorcev, membrana na Sliki 14A je bila razvita s C-terminalnimi protitelesi, membrana na Sliki 14B pa protitelesi P1-8. Kot vidimo iz slike 14A, se C-terminalni del perforina cepi pri povišanih koncentracijah katepsina L, medtem ko je na sliki 14B razvidno, da ko uporabimo protitelesa

proti celi molekuli perforina (PI-8) razlike tudi pri višjih koncentracijah katepsina L niso več tako značilne. Podobne rezultate smo dobili, če smo pripravili vzorce tako kot prej (Slika 14A), brez razmerja 1 : 0.04, in jih prvi dan razvili s C-terminalnimi protitelesi (6G7/1F10), naslednji dan pa isto membrano razvili s protitelesi P1-8.

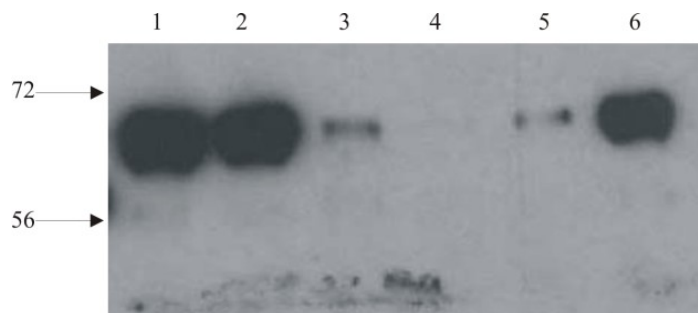
A



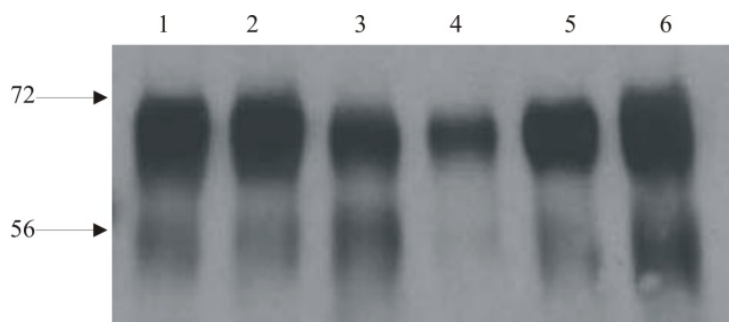
B



C



D



Slika 14: *Katepsin L cepi C-terminalni del perforina pri povišanih koncentracijah.* Rekombinantni mišji perforin smo inkubirali z rekombinantnim mišjim katepsinom L v različnih molarnih razmerjih. Koncentracija perforina je bila pri vseh razmerjih perforin (pfn): katepsin L (kat. L) konstantna. A: Imunodetekcija perforina s C-terminalnimi protitelesi (6G7/1F10); 1-pfn, pufer HE; 2-pfn, pufer pH 5.5; 3-pfn: kat. L = 1 : 0.04; 4-pfn: kat. L = 1 : 0.1; 5-pfn: kat. L = 1 : 0.2; 6-pfn : kat. L = 1 : 1; 7-pfn : kat. L + L1 = 1 : 1. B: Imunodetekcija perforina s protitelesi P1-8; 1-pfn, pufer HE; 2-pfn, pufer pH 5.5; 3- pfn : kat. L = 1 : 0.04; 4-pfn : kat. L = 1 : 0.1; 5-pfn : kat. L = 1 : 0.2; 6-pfn : kat. L = 1 : 1; 7-pfn : kat. L + L1 = 1 : 1. C: Imunodetekcija perforina s C-terminalnimi protitelesi (6G7/1F10) (1. dan); 1-pfn, pufer HE; 2-pfn, pufer pH 5.5; 3-pfn : kat. L = 1 : 0.1; 4-pfn : kat. L = 1 : 0.2; 5-pfn : kat. L = 1 : 1; 6-pfn : kat. L + L1 = 1 : 1. D: Imunodetekcija perforina s protitelesi P1-8 (2. dan, membrana C); 1-pfn, pufer HE; 2-pfn, pufer pH 5.5; 3-pfn : kat. L = 1 : 0.1; 4-pfn : kat. L = 1 : 0.2; 5-pfn : kat. L = 1 : 1; 6-pfn : kat. L + L1 = 1 : 1.

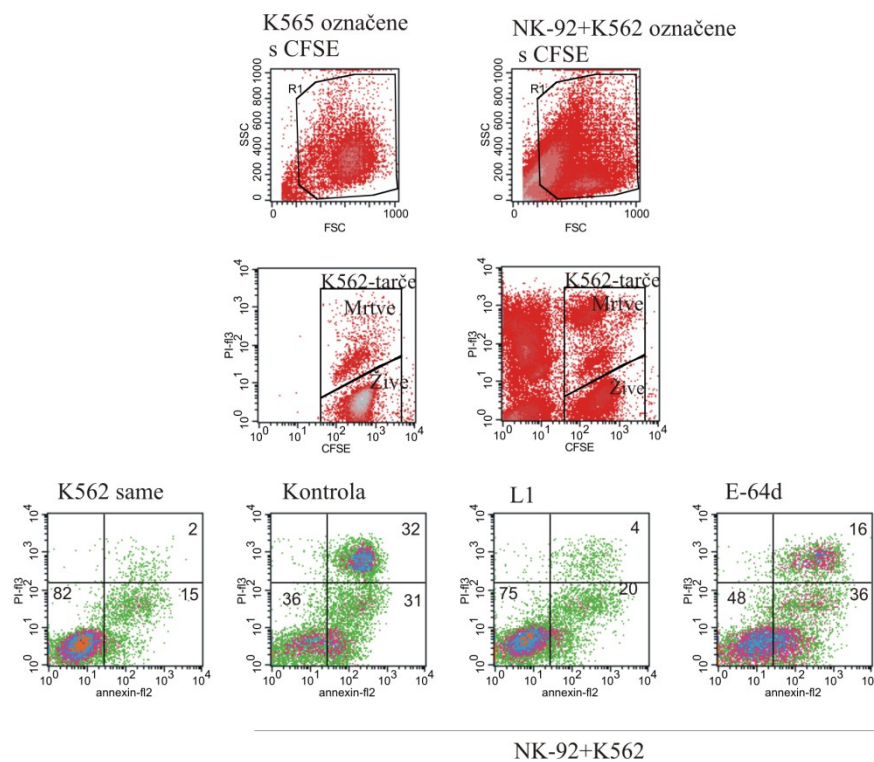
4.4 Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na citotoksičnost celic NK-92 in YT 5 celic NK

Perforin igra ključno vlogo pri citotoksičnosti celic NK, hkrati pa smo že pokazali, da imajo katepsini funkcijo pri procesiranju perforina, zato smo v nadaljnjih študijah proučevali vpliv katepsinskih inhibitorjev na citotoksičnost človeških celic NK. Kot tarčne celice za celice NK smo uporabili celice K562. Le-te ne izražajo receptorja Fas, zato niso občutljive na programirano celično smrt preko liganda Fas (Munker et al., 1996; Yu et al. 2009).

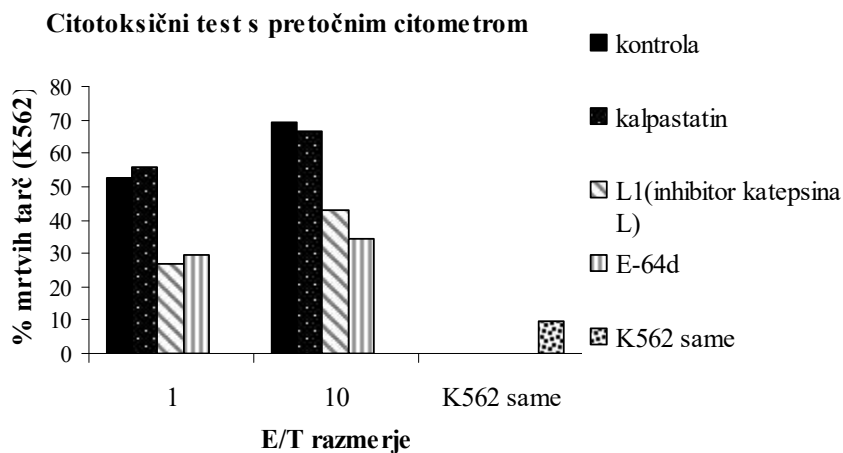
Pri začetnih eksperimentih smo pobijanje tarčnih celic detektirali s pomočjo pretočne citometrije. Tarčne celice K562 smo označili z barvilom CFSE, tako da smo jih na pretočnem citometru lahko ločili od celic NK-92. Celice NK-92 smo inkubirali 24 ur z inhibitorji in jih nato uporabili za citotoksične teste. E-64d je primarno inhibitor katepsinov, vendar inhibira tudi kalpaine, zato smo naredili poskuse z inhibitorjem kalpainov kalpastatinom.

Predinkubacija celic NK-92 s kalpastatinom ni imela vpliva na citotoksičnost celic NK-92. S uporabo konfokalne mikroskopije smo pokazali, da se perforin nahaja v sekretornih granulah in ne v endoplazmatskem retikulumu, kjer se nahajajo kalpainsi (Slika 11). Tako smo kalpaine izključili iz naših nadaljnjih študij. Po inkubacijah celic NK-92 z E-64d ter L1 pa smo opazili zmanjšano sposobnost inkubiranih celic NK-92 za pobijanje tarčnih celic. V predhodnih poskusih smo pokazali, da inhibitorji cisteinskih katepsinov preprečijo procesiranje perforina (Slika 12). Sklepali smo, da je značilno manjše pobijanje tarčnih celic, po inkubaciji celic NK-92 z inhibitorji, posledica slabšega procesiranja perforina.

A



B

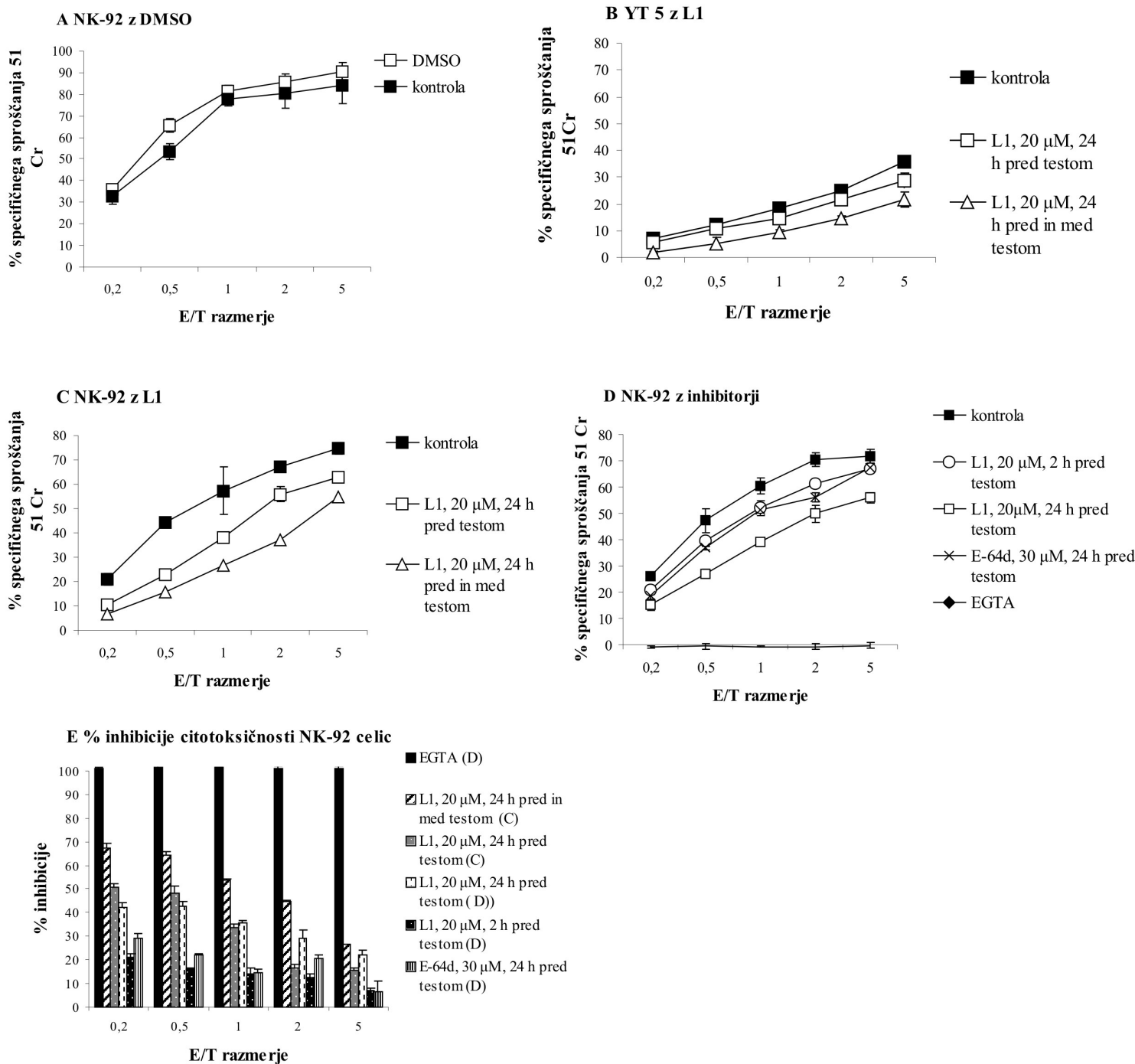


Slika 15: Inhibitorja L1 in E-64d zmanjšata citotoksičnost celic NK-92, kalpastatin pa ne vpliva na citotoksičnost celic NK-92 (merjenje citotoksičnosti s pretočno citometrijo). A: Tarčne celice K562 smo označili s barvilom CFSE, na ta način smo jih s pretočnim citometrom analizirali ločeno od celic NK. Efektorske in tarčne celice smo inkubirali 5 ur v ploščah s 96 luknjicami. B: Procent mrtvih celic smo določili tako, da smo celice označili z aneksinom V- PE in PI-jem ter jih nato analizirali s pretočnim citometrom.

Večina citotoksičnih testov je bila narejena z metodo sproščanja izotopa ^{51}Cr . Tarčne celice K562 smo označili z izotopom ^{51}Cr . Tiste tarčne celice, ki so umrle, so izločile izotop ^{51}Cr v medij. Sproščanje ^{51}Cr smo izmerili z γ -števcem. Naredili smo tudi kontrolne eksperimente. Pri prvem kontrolnem eksperimentu smo hoteli dodatno potrditi, da je citotoksičnost celic NK odvisna od perforina in ne od liganda Fas. To smo preverili, tako da smo med citotoksičnim testom dodali EGTA (končna koncentracija 4 mM). Le-ta kompleksira ione Ca^{2+} , ki so potrebni za aktivnost perforina. Ob dodatku EGTA nismo zaznali sproščanja izotopa ^{51}Cr iz tarčnih celic. Kontrolne eksperimente z EGTA smo naredili tudi pri mišjih celicah NK ter mišjih CTL. Celicam NK-92 smo v poskusih vedno dodali inhibitorje, ki so bili raztopljeni v DMSO. Pri drugem kontrolnem eksperimentu smo preverili učinek samega DMSO na citotoksičnost celic NK-92. Dodali smo enako količino DMSO kot v primeru, ko smo jim dodali inhibitor in pomerili citotoksičnost tretiranih celic NK-92. DMSO ni imel vpliva na citotoksičnost (Slika 16A).

Nato smo naredili poskuse z inhibitorjema E-64d in L1. Celice NK-92 smo tretirali 24 ur ali 2 uri z inhibitorjem E-64d ali L1; v vzporednem eksperimentu smo celice inkubirali z inhibitorjem 24 ur ter nato dodali inhibitor tudi med samim citotoksičnim testom. Celice NK-92, ki so bile 24 ur inkubirane z inhibitorjem L1, so za 40–50 % manj učinkovito pobijale

tarčne celice kot netretirane celice NK-92. Največje razlike med tretiranimi in netretiranimi opazimo pri najnižjem razmerju efektorskih (NK-92) ter tarčnih celic (K562); Slika 16. Če smo poleg 24-urne inkubacije z L1 dodali celicam inhibitor L1 še med samim citotoksičnim testom, se je sposobnost celic NK-92 za pobijanje tarč zmanjšala do 68 %. Podobno redukcijo v pobijanju tarč pri inkubacijah z inhibitorji smo detektirali tudi pri drugih celičnih linijah NK,; YT 5 (Slika 18B) in KHGY1 (rezultati niso pokazani).



Slika 16: L1 in E-64d zmanjšata citotoksičnost celic NK-92 in YT 5 (detekcija citotoksičnosti z merjenjem sproščanja kroma). Celice NK-92 ter celice YT 5 smo inkubirali z inhibitorjema E-64d in L1 pri koncentracijah ter časih, kot so zapisani v legendah ob diagramih. Tarčne celice K562 smo označili z izotopom ^{51}Cr in inkubirali z efektorjskimi celicami 4 ure. Podatki, predstavljeni v diagramih, predstavljajo povprečje treh meritev +/- standardna deviacija. A: Kontrolni eksperiment; celice NK-92, inkubirane z enako količino DMSO kot v eksperimentih, kjer smo celice inkubirali z inhibitorji. B: Celice YT 5 smo inkubirali 24 ur ali 24 ur plus 4 ure med citotoksičnim testom z L1. C: Celice NK-92 smo inkubirali 24 ur ali 24 ur plus 4 ure med citotoksičnim testom z L1. D: Celice NK-92 smo inkubirali 24 ur ali 2 ure z L1, 24 ur z E-64d in kontrolni eksperiment z EGTA. E: Procent inhibicije citotoksičnosti celic NK-92 iz diagramov C ter D, izračunan iz vrednosti % specifičnega sproščanja izotopa ^{51}Cr pri vsakem E/T razmerju; % inhibicije = $(\text{kontrola} - \text{vzorec}) / \text{kontrola} \times 100$.

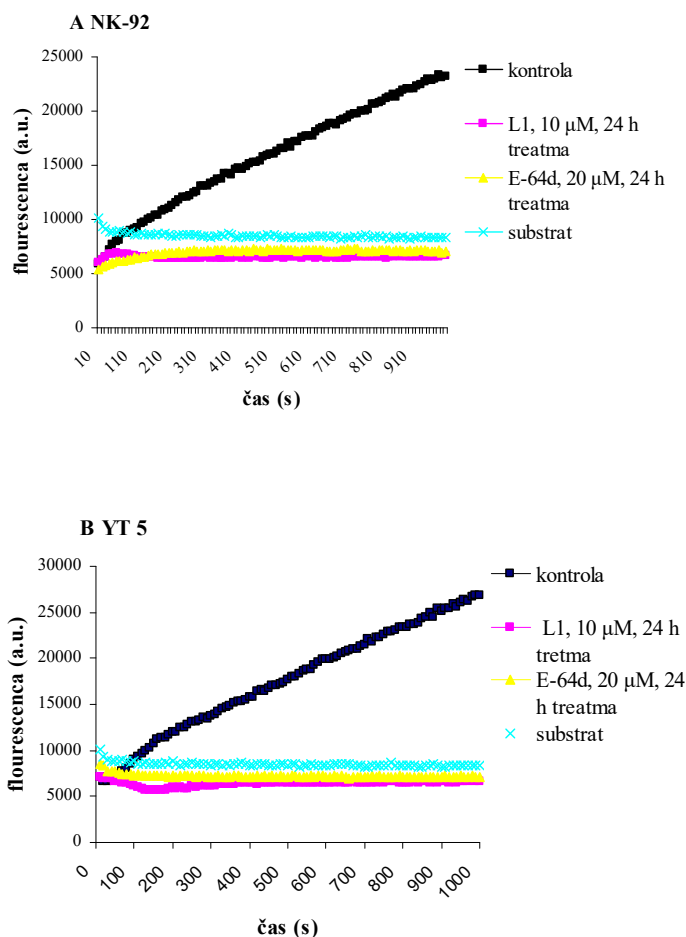
4.5 Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na aktivnost katepsinov in grancimov

Za vse dosedanje analize smo uporabili inhibitorje cisteinskih katepsinov. Preveriti smo želeli tudi njihovo učinkovitost pri inhibiciji katepsinov (meritve aktivnosti katepsinov s fluorogenim substratom z-Phe-Arg-AMC). Celice NK-92 in celice YT 5 smo inkubirali z/ali brez inhibitorjev E-64d ter L1, in sicer 24 ur. Aktivnost katepsinov v lizatih smo določili, kot je opisano v metodah. Inhibitorja E-64d in L1 smo uporabili v mikromolarnih koncentracijah, pri katerih sta oba inhibitorja popolnoma inhibirala aktivnost katepsinov (Slika 17); enake koncentracije smo uporabljali tudi pri citotoksičnih testih. Delovne koncentracije inhibitorja L1 so bile enake ali celo nižje, kot so jih omenjali v člankih, v katerih so uporabili ta inhibitor za ugotavljanje vloge katepsina L (Urbich et al., 2005; Hsu et al., 2009).

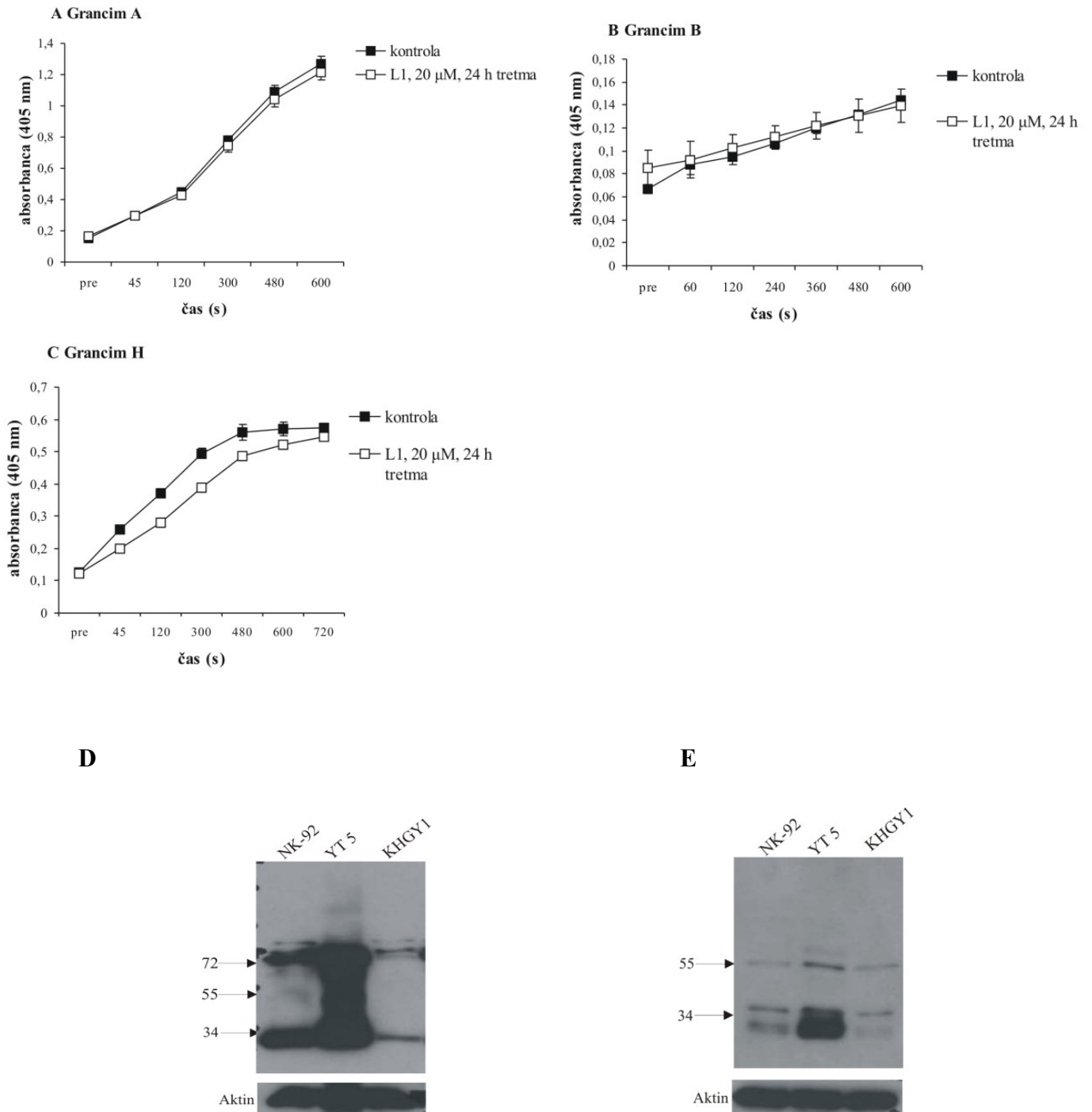
Pri citotoksičnosti celic NK igrajo poleg perforina pomembno vlogo tudi grancimi. Pokazali smo že, da imata inhibitorja E-64d in L1 vpliv na citotoksičnost ter procesiranje perforina. Hoteli smo preveriti, če imata ta dva inhibitorja vpliv tudi na aktivnost grancimov. Celice NK smo 24 ur inkubirali z inhibitorjem L1, pripravili celične lizate in analizirali aktivnost grancimov A, B ter H v celicah NK-92, kot je opisano v metodah (Slika 17). Za celice YT 5 in celice KHGY1 rezultati niso pokazani, so pa podobni kot za celice NK-92. Pokazali smo, da inhibitor za katepsin L L1 ne vpliva na aktivnost grancimov (Slika 17).

Katepsin C *in vitro* procesira ter aktivira grancima A in B (Pham, et al. 1999), vendar so v CTL miši z izbitim genom za katepsin C še vedno detektirali določeno aktivnost grancima B.

Obstaja možnost, da grancim B – polg katepsina C – procesira tudi katera druga izmed aminopetidaz (Sutton et al., 2007). Naredili smo tudi imunodetekcijo grancimov B in H v vseh treh celičnih linijah. Pri tem smo ugotovili, da vse tri celične linije človeških celic NK izražajo različne količine grancimov B ter H, kar lahko posledično vpliva na učinkovitost pri pobijanju tarčnih celic.



Slika 17: Inhibitorja E-64d in L1 blokirata aktivnost katepsinov. Celice NK-92 ter celice YT 5 smo pustili netretirane in tretirane z inhibitorji 24 ur. Celične lizate celic NK smo uporabili za merjenje katepsinske aktivnosti s flourogenim substratom z-Phe-Arg-AMC, kot je opisano v metodah. A: Celice NK-92, inkubirane z inhibitorjema E-64d in L1. B: Celice YT 5, inkubirane z inhibitorjema E-64d in L1.



Slika 18: Inhibitor L1 ne vpliva na aktivnost grancimov A, B in H v celicah NK-92. Celice NK-92 so bile 24 ur tretirane ali netretirane z L1. A: Triptazno aktivnost (grancim A) smo določili s cepitvijo substrata BLT. B: Aspazno aktivnost smo izmerili preko hidrolize peptidnega estra substrata Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl, ki ga specifično cepi grancim B. C: Kimazno aktivnost (grancim H) smo izmerili s cepitvijo substrata Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl. Podani rezultati so bili ponovljeni vsaj trikrat in so povprečje treh meritev \pm SEM. D: Imunodetekcija grancima B v vseh treh celičnih linijah. E: Imunodetekcija grancima H v vseh treh celičnih linijah.

4.6 Študije OT-1 CTL, izoliranih iz miši divjega tipa ter iz miši z izbitim genom za katepsin L

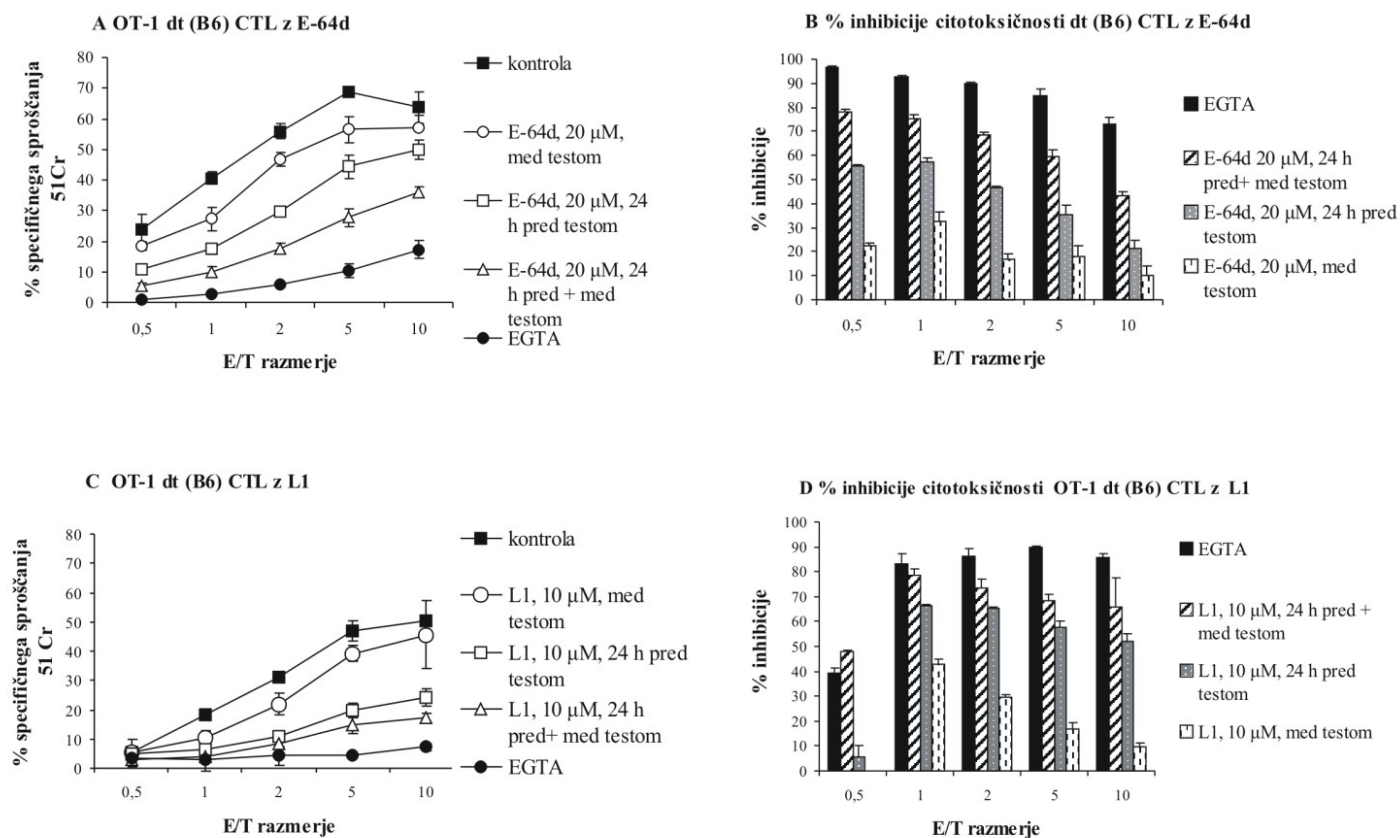
4.6.1 Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na citotoksičnost OT-1 CTL, izoliranih miši divjega tipa

Potrdili smo, da imata inhibitorja cisteinskih katepsinov E-64d in L1 vpliv na citotoksičnost celičnih linij človeških celic NK. Celice NK in CTL uporabljajo identične mehanizme za pobijanje tarčnih celic.

Predhodno opisane rezultate na celičnih linijah celic NK smo želeli preveriti tudi na primarnih celicah NK in CTL. Za eksperimente smo uporabili CTL, pripravljene iz B6 miši divjega tipa, ki izražajo transgeni T-celični receptor OT-1 (Sterry et al., 1995), ki prepozna antigenski peptid (ovalbumin) SIINFEKL, predstavljen na receptorju k^b tarčnih celic – OT-1 CTL.

Kot tarčne celice smo uporabili modificirane mišje timusne celice EL4, ki izražajo zelo malo receptorja Fas. Celice EL4 smo pred citotoksičnimi testi stimulirali s peptidom SIINFEKL. Na ta način jih OT-1 CTL prepoznajo kot tarče in jih uničijo. Naredili smo kontrolne eksperimente z EGTA ter s tem blokirali od perforina odvisno citotoksičnost, ker smo še vedno zaznali citotoksičnost smo sklepali, da je prišlo preko Fas liganda deloma do aktivacije receptorja Fas v tarčnih celicah (sliki 19A in C).

24-urna inkubacija OT-1 CTL z E-64d je zmanjšala pobijanje tarčnih celic do 55 % (Slika 19B). Če smo poleg 24-urne inkubacije z E-64d dodali še inhibitor E-64d med samim citotoksičnim testom, se je pobijanje tarčnih celic zmanjšalo do 78 % (Slika 19B). 24-urna inkubacija OT-1 CTL z L1 je zmanjšala pobijanje tarčnih celic do 67 % (Slika 19D). Če smo poleg 24-urne inkubacije z L1 dodali še inhibitor L1 med samim citotoksičnim testom, pa se je pobijanje tarčnih celic zmanjšalo do 84 % (Slika 19D). Zmanjšanje pobijanja tarčnih celic smo prikazali v histogramu kot procent inhibicije citotoksičnosti. (sliki 19B in D).



Slika 19: Vpliv inhibitorjev cisteinskih katapsinov E-64d in L1 na citotoksičnost OT-1 dt (B6) CTL. A: Citotoksičnost mišjih OT-1 CTL, inkubiranih z E-64d. Liza s ^{51}Cr označenimi in s peptidom SINFEKL stimuliranimi tarčnimi celicami EL4 z OT-1 dt – divji tip – (B6) CTL. OT-1 dt (B6) CTL so bili inkubirali z inhibitorjem E-64d, časi inkubacij so napisani ob diagramih. Rezultati, ki so podani v diagramih, predstavljajo povprečje triplikatov +/- S.D. Poskusi so bili ponovljeni vsaj trikrat. B: Procent inhibicije citotoksičnosti OT-1 dt(B6) CTL z E-64d (diagram A), izračunan iz vrednosti procenta specifičnega sproščanja izotopa ^{51}Cr pri vsakem razmerju E/T; % inhibicije = $(\text{kontrola} - \text{vzorec}) / \text{kontrola} \times 100$. C: Citotoksičnost mišjih OT-1 CTL, inkubiranih z L1. Liza s ^{51}Cr označenimi in s peptidom SIINFEKL stimuliranimi tarčnimi celicami EL4 z OT-1 dt (B6) CTL. OT-1 dt (B6) CTL so bili tretirani z inhibitorjem L1, časi inkubaciji so napisani ob diagramih. Rezultati, ki so podani v diagramih, predstavljajo povprečje triplikatov +/- S.D. Poskusi so bili ponovljeni vsaj trikrat. D: Procent inhibicije citotoksičnosti OT-1 dt(B6) CTL z L1 (diagram C), izračunani iz vrednosti procenta specifičnega sproščanja izotopa ^{51}Cr pri vsakem razmerju E/T; % inhibicije = $(\text{kontrola} - \text{vzorec}) / \text{kontrola} \times 100$.

4.6.2 Študije OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši

4.6.2.1 Fenotipizacija in genotipizacija OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši

Glede na vse dosedanje rezultate smo sklepali, da bi bil lahko katepsin L odgovoren za procesiranje perforina in posledično za zmanjšanje citotoksičnosti celic NK ter CTL. Čeprav je inhibitor L1 dokaj specifičen v *in vitro* študijah in se uporablja pri raziskavah funkcije katepsina L v celicah (Urbich et al., 2005), je njegova specifičnost pri eksperimentih na celičnih kulturah vprašljiva, zato smo nadaljnje raziskave naredili na CTL ter celicah NK izoliranih iz OT-1 miši z izbitim genom za katepsin L.

Pri gojenju katepsin L ničelnih miši smo testirali 46 mišk. V tej populaciji so bile tri katepsin L ničelne miši, od katerih sta dve miši imele OT-1 pozitivne CTL. V kasnejši populaciji sta se skotili še dve katepsin L ničelne miši, ki sta bili prav tako OT-1 pozitivni. Tako so bili vsi eksperimenti potrjeni na štirih katepsin L ničelnih miših, ki so imele hkrati OT-1 pozitivne CTL.

Izolirali smo genomsko DNA miši in preverili prisotnost katepsina L ter Lac Z kasete z verižno reakcijo z polimerazo. Med samim gojenjem mišk smo preverili, katere miške imajo OT-1 pozitivne CTL z označitvijo s protitelesi $V\alpha 2$ in analizo na pretočnem citometru. Katepsin L ničelne miši smo križali z mišmi, ki so imele transgeni OT-1 T celični receptor in v F1 generaciji dobili nekaj katepsin L ničelne miši, ki so imele OT-1 pozitivne CTL.

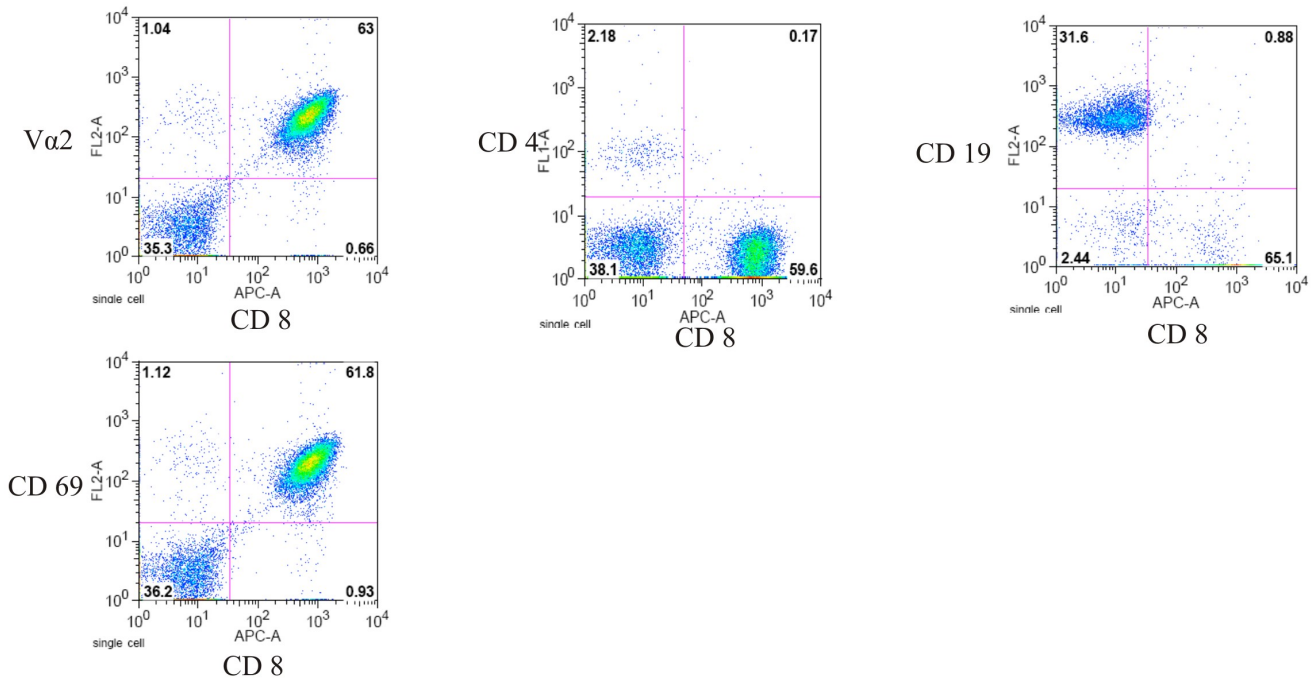
Pripravili smo OT-1 CTL, izolirane miši divjega tipa (divjega tipa iste družine – singenski tip), in katepsin L ničelnih miši. Splenocite smo aktivirali z LPS in peptidom SIINFEKL, kot piše v metodah. Po aktivaciji splenocitov s peptidom SIINFEKL ter LPS so v kulturi preživeli samo CTL z receptorjem OT-1, ostale imunske celice so propadle in smo jih odstranili s centrifugiranjem v gradientu Ficolla.

Prvi, tretji ter peti dan smo preverili aktivacijo CTL, in sicer preverili smo prisotnost receptorjev CD19 ter CD69. Značilnost miši OT-1 je, da sicer nimajo limfocitov $CD4^+$, vendar smo poleg limfocitov $CD8^+$ vseeno preverili še prisotnost limfocitov $CD4^+$. Preverili smo tudi receptorje OT-1 CTL, in sicer z analizo prisotnosti receptorja $V\alpha 2$, ki je del receptorja TCR OT-1 CTL, ter se ga uporablja za potrditev OT-1 CTL. CTL, pripravljene iz katepsin L ničelnih miši, so bili $V\alpha 2$, $CD8^+$, CD19, CD69 pozitivni in $CD4^+$ negativni, enako kot OT-1 CTL divjega tipa. S tem smo potrdili, da imajo OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši normalno aktivacijo, saj enako dobro izražajo receptorje $V\alpha 2$, $CD8^+$, CD19, CD69 kot OT-1

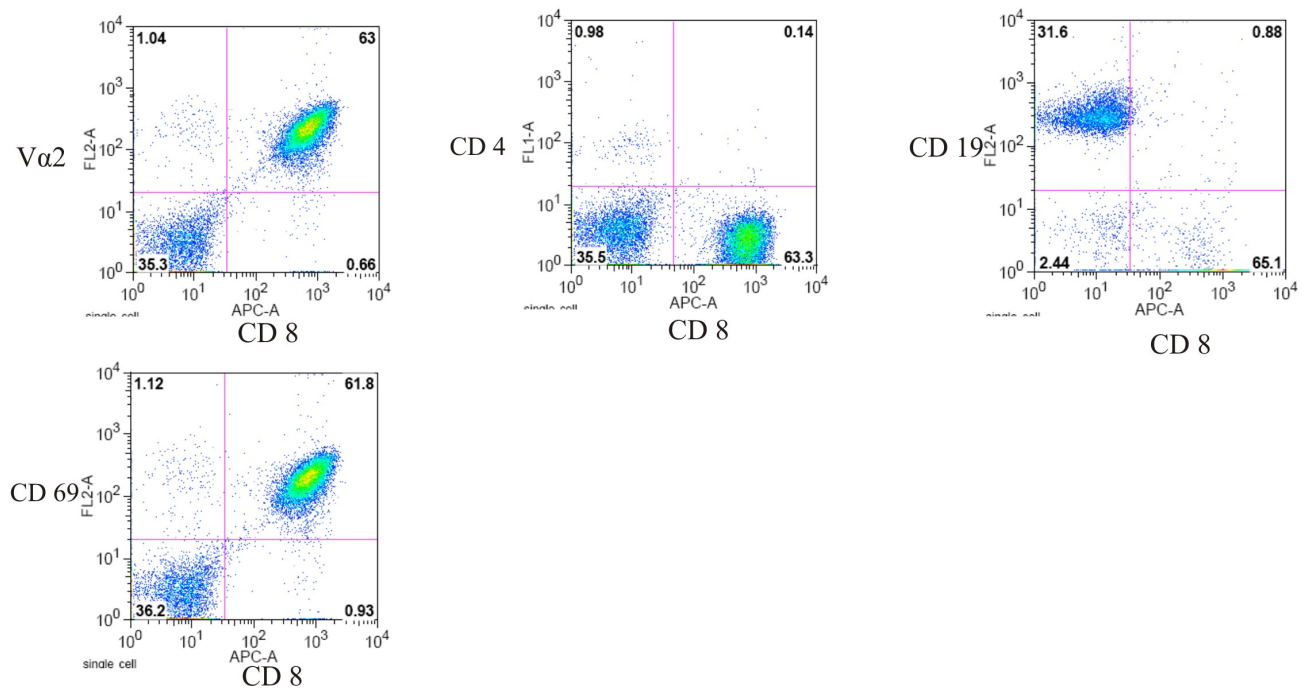
CTL divjega tipa (Slika 20).

3.dan

DT(B6)



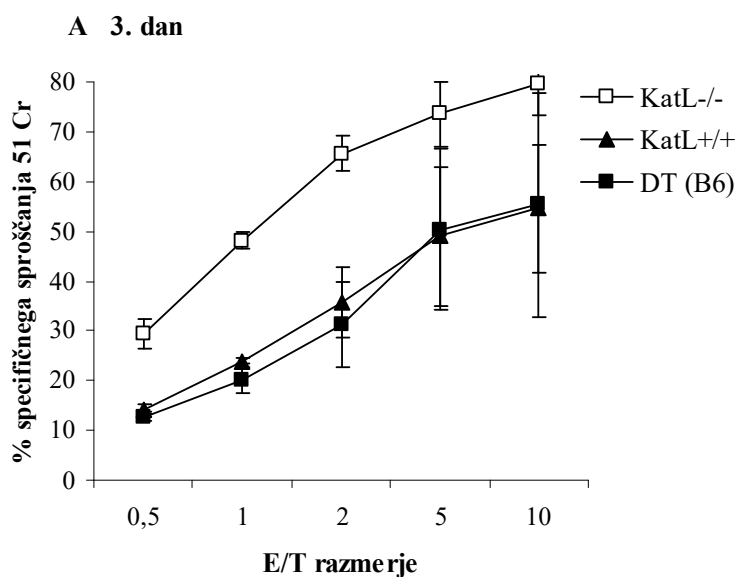
Katepsin L^{-/-}

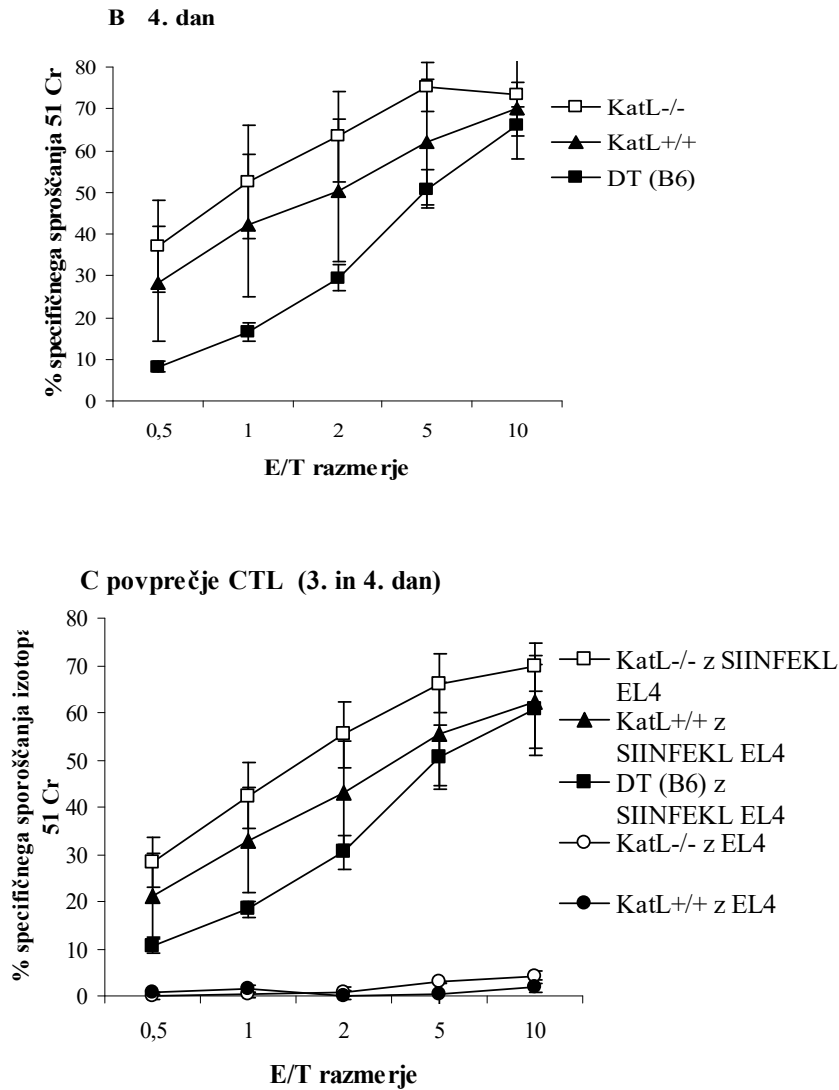


Slika 20: Fenotipizacija CTL miši divjega tipa in katepsin L ničelnih miši. Tretji dan po žrtvovanju miši ter aktivaciji splenocitov z LPS in s peptidom SIINFEKL ter očiščenju populacije centrifugiranjem v gradientom Ficoll smo preverili aktivacijo CTL. Le-te smo označili z aktivacijskimi markerji CD19 in CD69 ter preverili prisotnost receptorja OT-1 ($V\alpha 2$), prisotnost receptorja $CD8^+$ in odsotnost receptorja $CD4^+$. Vse eksperimente smo naredili tako, da smo CTL inkubirali s protitelesi, ki prepoznajo posamezne receptorje, ter vzorce nato analizirali s pretočnim citometrom.

4.6.3 Citotoksični testi OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši

OT-1 CTL smo pripravili iz vranice po protokolu, ki smo ga opisali v metodah in materialih. V večini primerov smo kot tarče za citotoksične teste uporabili celice EL4, stimulirane s peptidom SIINFEKL. Pri negativnih kontrolah tarčne celice EL4 nismo stimulirali s peptidom SIINFEKL. Le-teh OT-1 CTL niso pobili (Slika 21C). S tem smo potrdili, da morajo tarčne celice EL-4 izražati peptid SIINFEKL, da jih CTL prepoznajo preko receptorja OT-1 in jih posledično pobijejo. Citotoksične teste smo naredili tretji ter četrti dan po aktivaciji. Prvi dan aktivacije se šteje dan, ko smo miš žrtvovali in splenocite aktivirali s peptidom SIINFEKL ter LPS-om. Da postanejo OT-1 CTL citotoksični, morajo biti v kulturi s peptidom SIINFEKL in LPS-om vsaj tri dni. Tretji dan aktivacije so CTL katepsin L ničelnih miši bolje pobijali tarčne celice kot OT-1 CTL miši divjega tipa (Slika 21A). Četrti dan po aktivaciji OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši še vedno boljše pobijajo tarčne celice kot OT-1 CTL miši divjega tipa, vendar je razlika manjša kot po tretjem dnevu (Slika 21B).



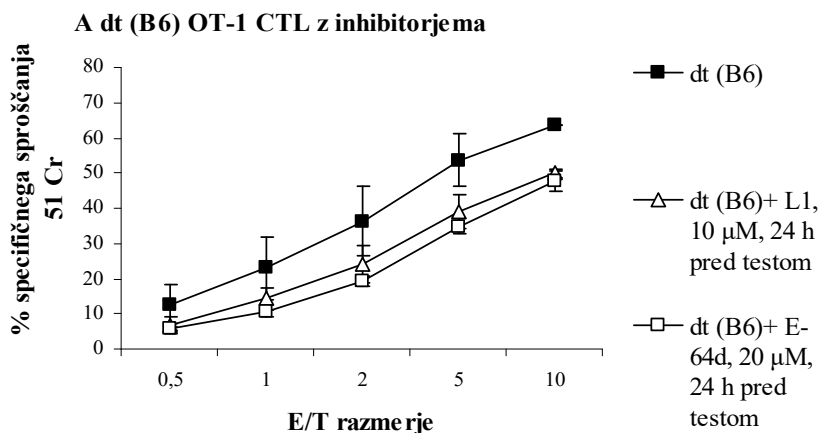


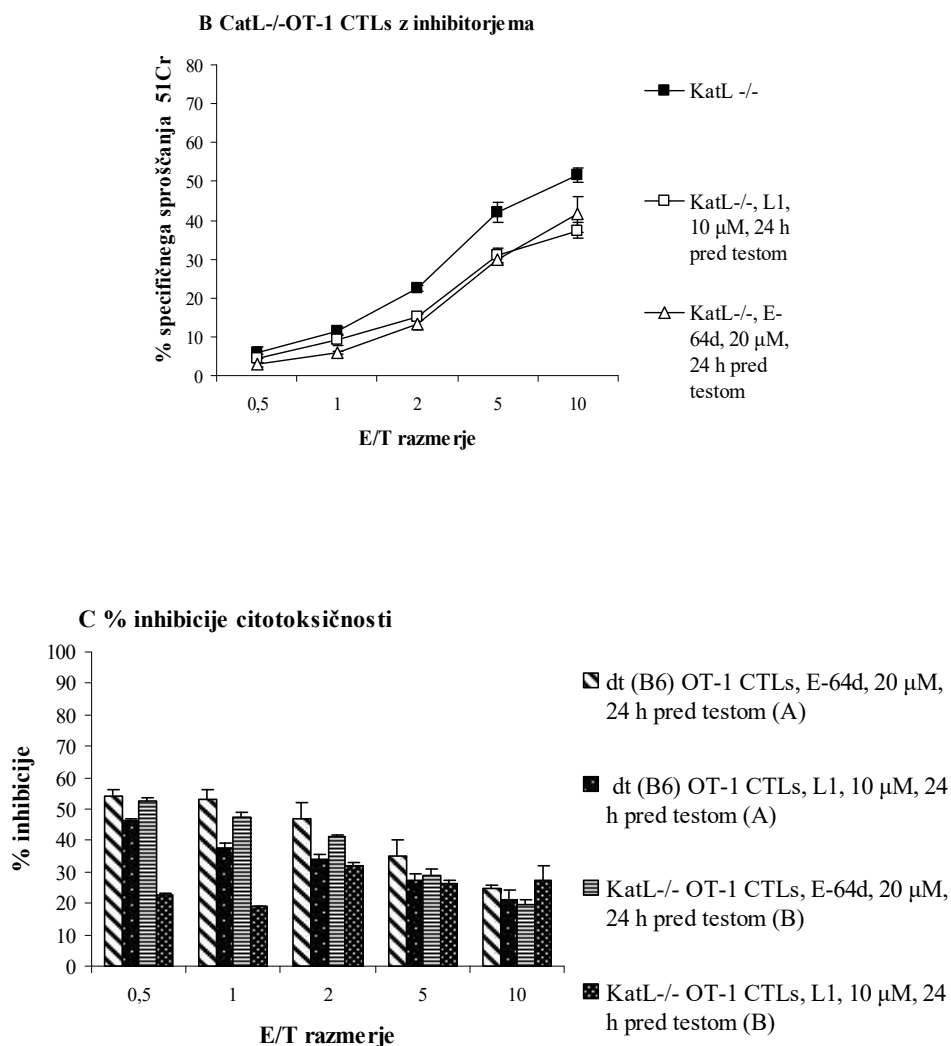
Slika 21: Citotoksičnost OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši. Liza s ⁵¹Cr označenimi in s peptidom SIINFEKL stimuliranimi tarčnimi celicami EL4 s CTL iz OT-1 transgene miši z izbitim genom za katepsin L (KatL^{-/-}), singensko OT-1 miš divjega tipa (KatL^{+/+}) in OT-1 miši divjega tipa po 4 urah. Rezultati predstavljajo povprečje več meritev. Poskusi so bili ponovljeni vsaj trikrat. A: Citotoksičnost OT-1 CTL tretji dan aktivacije, Kat L^{-/-} (n = 4), Kat L^{+/+} (n = 2), DT (n = 2). B: Citotoksičnost OT-1 CTL četrty dan aktivacije, Kat L^{-/-} (n = 4), Kat L^{+/+} (n = 2) DT (n = 2). C: Citotoksičnost OT-1 CTL; povprečje tretjega in četrtega dneva aktivacije skupaj. Cat L^{-/-} (n = 4), Cat L^{+/+} (n = 2) DT (n = 2) ter citotoksični test z nepulziranimi celicami EL4.

4.6.4 Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na citotoksičnost OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši

Ugotovili smo, da OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši pobijajo tarčne celice boljše kot OT-1 CTL miši divjega tipa, kar je v nasprotju s pričakovanji in se ne sklada z rezultati, ki smo jih dobili z uporabo inhibitorjev cisteinskih katepsinov L1 ter E-64d na celičnih linijah človeških celic NK in primarnih mišjih CTL divjega tipa. Ti rezultati kažejo na še nepojasnjeno funkcijo katepsina L pri aktivaciji CTL. Čeprav je inhibitor katepsina L L1 dokaj specifičen v *in vitro* študijah ter se uporablja pri raziskavah funkcije katepsina L v celicah (Urbich et al., 2005), je specifičnost pri eksperimentih na celičnih kulturah vprašljiva, zato smo v našem primeru preverili, če mogoče inhibitorja cisteinskih katepsinov L1 in E-64d še vedno vplivata na citotoksičnost OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši.

Po 24-urni inkubaciji z inhibitorjema L1 in E-64d OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši ter OT-1 CTL miši divjega tipa smo naredili citotoksične teste. Iz testov vidimo, da imata inhibitorja E-64d in L1 še vedno vpliv na citotoksičnost OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši. Inhibitorja E-64d ter L1 zmanjšata citotoksičnost OT-1 CTL, katepsin L ničelnih miši, kar kaže na redundanco med katepsini in v primeru katepsina L, ostali katepsini prevzamejo njegovo vlogo.





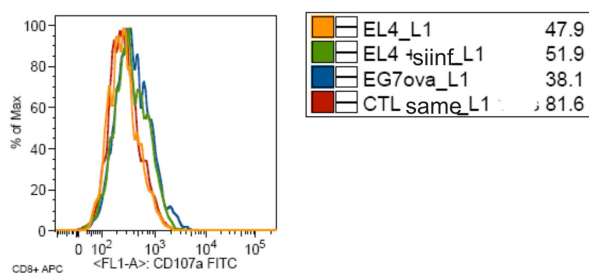
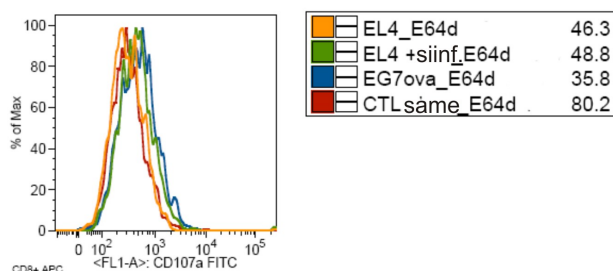
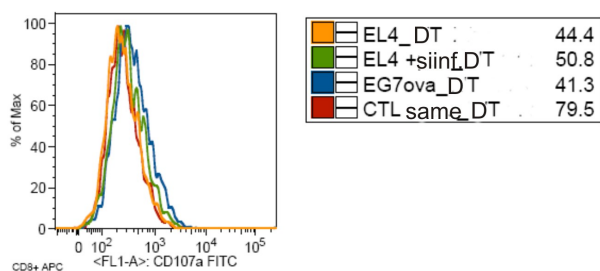
Slika 22: Inhibicija citotoksičnosti OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši in miši divjega tipa inkubiranih z E-64d in L1. Liza s ⁵¹Cr označenimi in s peptidom SIINFEKL stimuliranimi tarčnimi celicami EL4 z OT-1 CTL iz (dt ali katepsin L^{-/-}) po 4 urah. CTL so bili tretirani z inhibitorjema E-64d in L1 pri koncentracijah in časih, kot so napisani ob diagramu. Rezultati predstavljajo povprečje triplikatov +/- S.D. A: Citotoksični test divjega tipa OT-1 CTL z inhibitorjema. B: Citotoksični test OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši z inhibitorjema. C: Procent inhibicije citotoksičnosti, izračunan iz vrednosti procenta specifičnega sproščanja izotopa ⁵¹Cr pri vsakem razmerju E/T; % inhibicije = (kontrola – vzorec)/kontrola × 100.

4.6.5 Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na degranulacijo OT-1 CTL

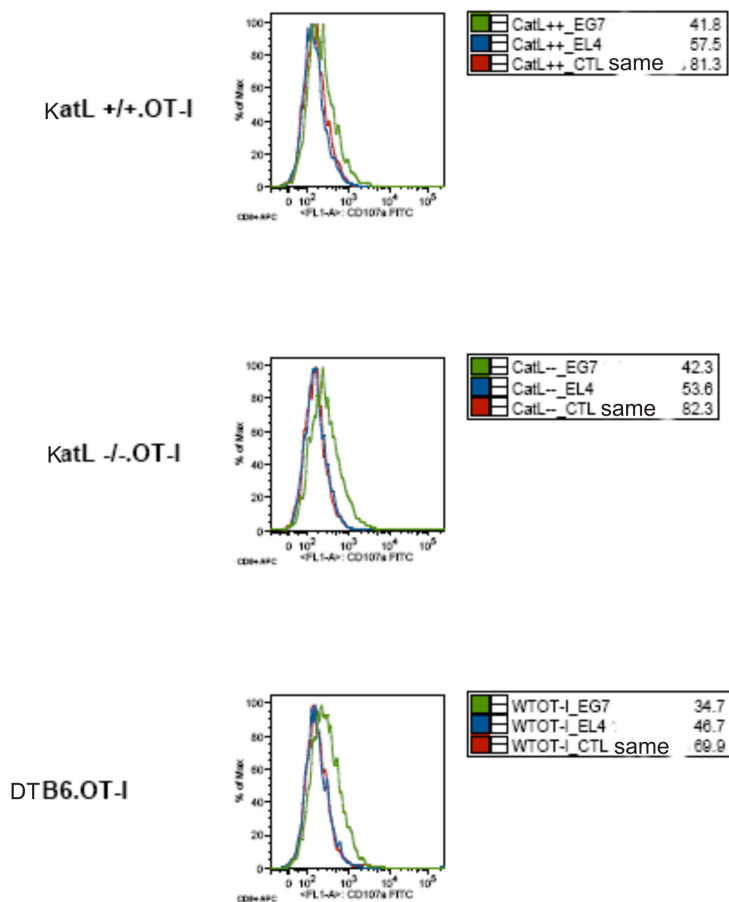
Degranualcija je mehanizem, preko katerega CTL in celice NK sprostijo vsebino sekretornih granul v imunološko sinapso. Pri tem pride do zlitja membrane sekretornih granul z membrano CTL ali celic NK, to pa lahko zaznamo kot povišanje ekspresije membranskega proteina sekretornih granul Lamp-1 (CD107) na površini CTL ali celic NK. Ker je

degranulacija CTL del mehanizma citotoksičnosti, za katerega smo že pokazali, da imajo katepsini vpliv, smo želeli preveriti, če imajo katepsini vpliv tudi na degranulacijo. Kot tarčne celice smo za študiji degranulacije poleg tarčnih celic EL4, stimuliranih s peptidom SIINFEKL, uporabili tudi tarčne celice EG7. Iz rezultatov je razvidno, da imajo OT-1 CTL divjega tipa tako OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši povsem normalno degranulacijo, in da inhibitorja E-64d ter L1 nimata vpliva na degranulacijo.

A



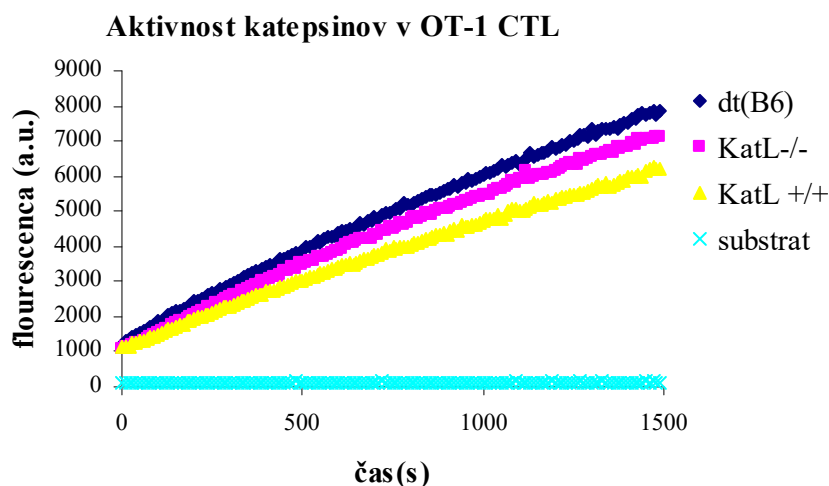
B



Slika 23: Degranulacija mišjih OT-1 CTL divjega tipa, tretiranih z inhibitorjema E-64d in L1, ter degranulacija OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši. OT-1 CTL smo dodali tarčnim celicam EL4, stimuliranimi s peptidom SINFFEKL, EG7 in EL4 (efektorske celice OT-1 CTL : tarčne celice = 2 : 1) v prisotnosti protitelesa CD107 ter golgi stopom (blokira recikliranje sekretornih granul). Po inkubaciji smo dodali protitelesa CD8⁺. A: OT-1 CTL tretirani ali netretirani z inhibitorji 24 ur. B: OT-1 CTL (dt(B6), KatL^{-/-}, KatL^{+/+}). * Poleg tarčnih celic EL4 stimuliranih s peptidom SIINFEKL smo uporabili tarčne celice EG7ova, ki nam jih ni bilo treba predhodno stimulirati s peptidom SIINFEKL, ker le-tega izražajo.

4.6.6 Aktivnost katepsinov v OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši

Pri citotoksičnih testih OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši smo opazili, da inhibitorja E-64d in L1 še vedno zmanjšata citotoksičnost. Posledično smo sklepali na redundanco med katepsini, zato smo izmerili celokupno aktivnost katepsinov s substratom z-Phe-Arg-AMC (predvsem substrat za katepsin L, cepijo pa ga tudi drugi katepsini) v lizatih OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši, iz miši divjega tipa in miši singenskega divjega tipa. Lizati so bili pripravljani, kot je opisano v metodah ter materialih. Razlik v aktivnosti katepsinov nismo dokazali, vendar moramo upoštevati, da aktivnost katepsinov B, L in V pade v pufru Ripa s pH 7.5, v katerem smo pripravili lizate. Naredili smo tudi imunodetekcije katepsinov B, S ter D v OT-1 CTL miši divjega tipa in v OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši, pri čemer nismo opazili nobenih razlik v izražanju teh katepsinov (rezultati niso prikazani).



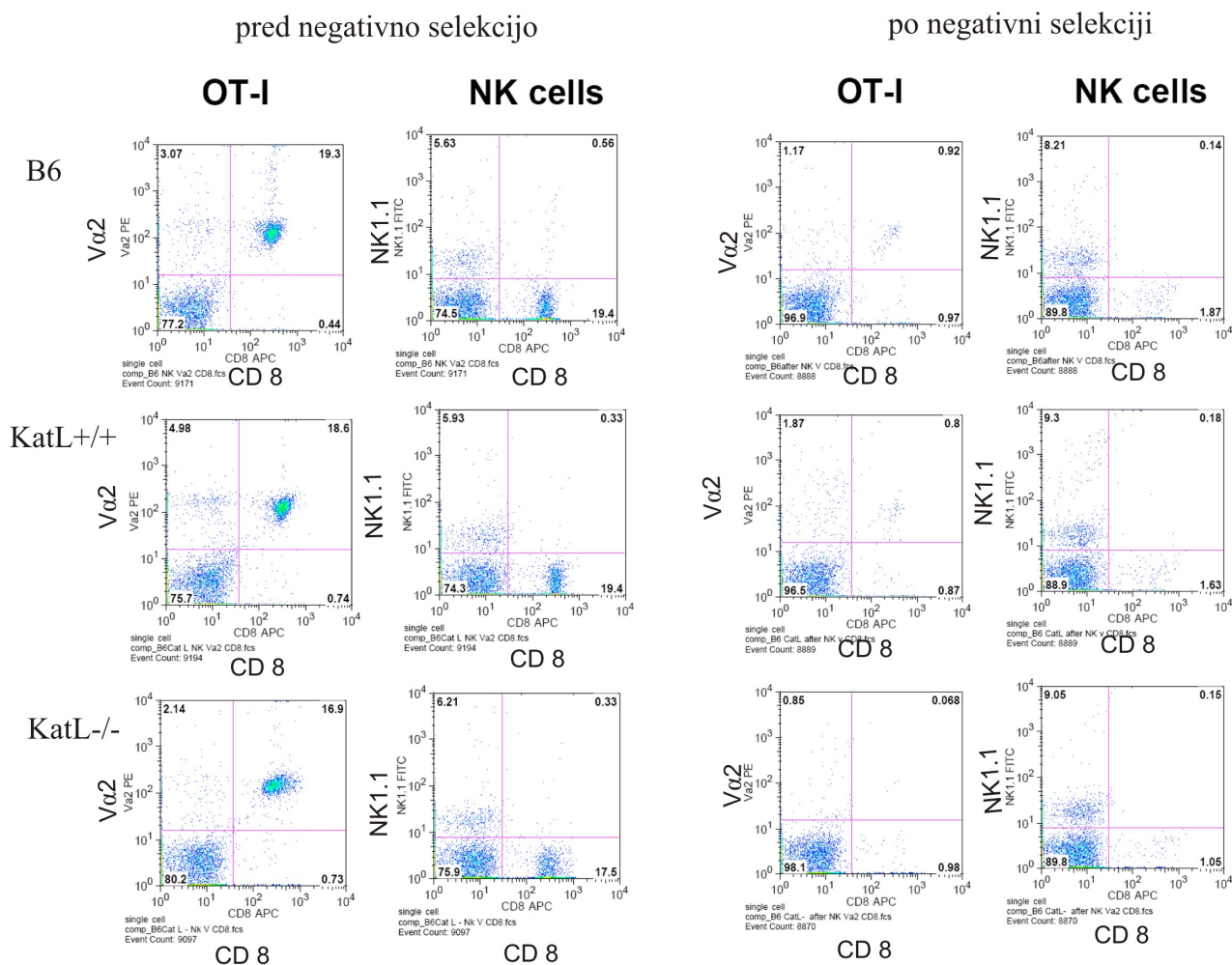
Slika 24: Aktivnost katepsinov v lizatih OT-1 CTL miši divjega tipa in katepsin L ničelnih miši. Merili smo cepitev fluorogenega substrata z-Phe-Arg-Amc pri pH 5.5. v lizatih OT-1 CTL (dt(B6), KatL^{-/-}, KatL^{+/+}), kot je opisano v metodah in materialih. Meritve smo ponovili vsaj trikrat.

4.7 Študije celic NK katepsin L ničelnih miši in miši divjega tipa

4.7.1 Priprava celic NK iz miši OT-1 divjega tipa

Nivo izražanja perforina je pri OT-1 CTL tako nizek, da ga z imunodetekcijo nismo zaznali niti pri OT-1 CTL miših divjega tipa niti pri katepsin L ničelnih miši. Procesiranje perforina, citotoksičnost ter vpliv inhibitorjev na citotoksičnost smo testirali tudi na celicah NK katepsin L ničelnih miši.

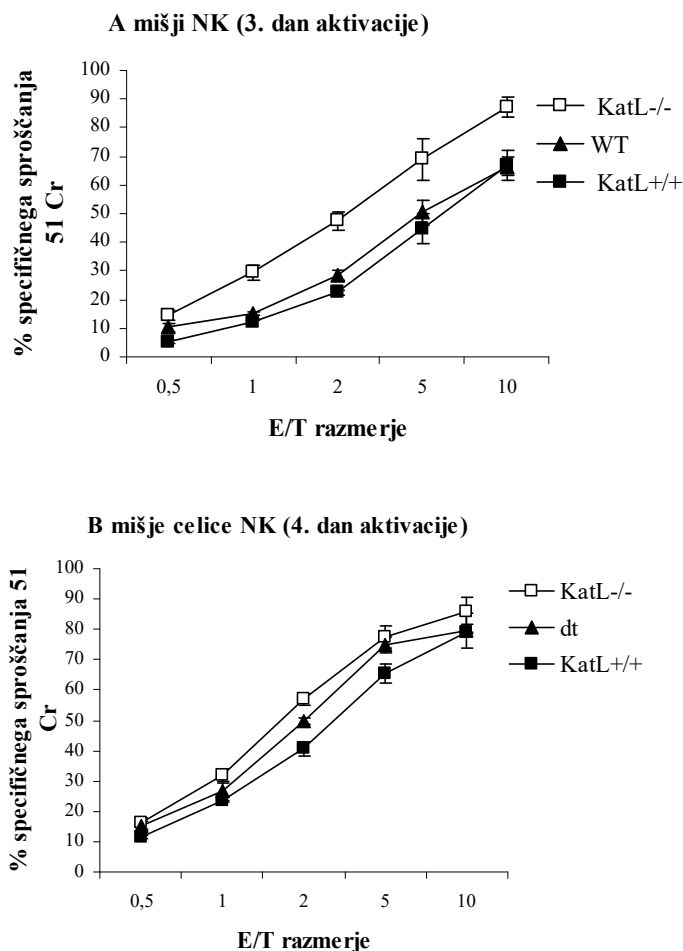
Primarne mišje celice NK smo pripravili iz celic vranice z negativno selekcijo pri OT-1 miših; divji tip (B6), singeni divji tip (KatL^{+/+}), z izbitim genom za katepsin L (KatL^{-/-}). Negativna selekcija je temeljila na odstranitvi OT-1 CTL iz kulture splenocitov (opisano v materialih in metodah), nato smo dodali IL-2, pri čemer so se aktivirale le celice NK, ostale imunske celice pa so propadle. Po petih dneh inkubacije z IL-2 so bile celice primerne za poskuse. Celice smo očistili s centrifugiranjem v gradientu Ficolla. Čistost populacije celic NK je bila potrjena z označitvijo receptorjev NK1.1., CD8⁺, Vα2 in analizo na pretočnem citometru. Pred negativno selekcijo smo imeli dve populaciji celic; NK1.1 pozitivne (značilno za celice NK) in populacijo celic ki so bile Vα2 in CD8 pozitivne celice (značilno za OT-1 CTL). Po negativni selekciji smo imeli samo še NK1.1 pozitivne celice (značilno za celice NK) (Slika 25).



Slika 25: Priprava primarnih celic NK katepsin L ničelnih miši in miši divjega tipa. Ocena čistosti populacije z markerji za OT-1 CTL (označevanje Vα2 in CD8⁺) ter za celice NK (označevanje NK1.1) pred in po negativni selekciji na koloni MACS.

4.7.2 Citotoksični testi s celicami NK katepsin L ničelnih miši

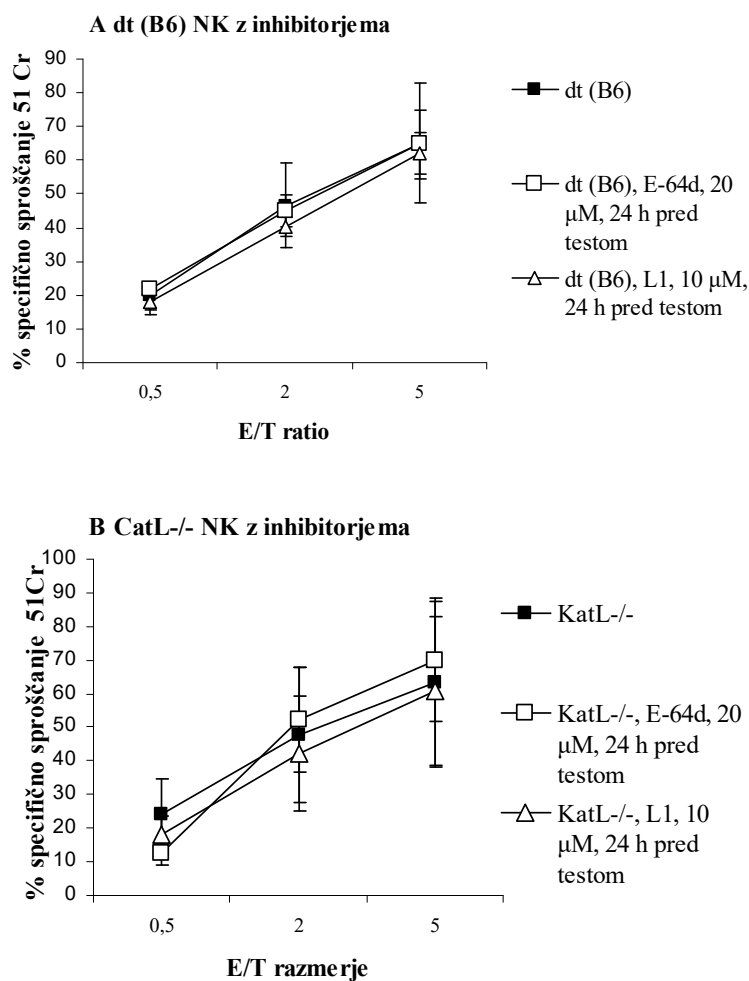
Ker smo že naredili poskuse na OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši, smo želeli preveriti, kako je s citotoksičnostjo celic NK katepsin L ničelnih miši. Podobno kot pri OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši, smo tudi v primeru celic NK opazili povečano citotoksičnost celic NK katepsin L ničelnih miši v primerjavi z celicami NK miši divjega tipa tretji dan aktivacije (Slika 26).



Slika 26: Citotoksičnost celic NK miši divjega tipa in katepsin L ničelnih miši. Liza s ^{51}Cr označenimi tarčnimi celicami YAC-1 s celicami NK (dt (B6), KatL^{-/-}, KatL^{+/+}). Citotoksični testi so bili narejeni tretji in četrti dan po aktivaciji. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev.

4.7.3 Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na citotoksičnost celic NK katepsin L ničelnih miši

Inhibitorji cisteinskih Katepsinov so še vedno imeli vpliv na citotoksičnost CTL Katepsin L ničelnih miši, zato smo preverili vpliv inhibitorjev cisteinskih Katepsinov še na mišjih celicah NK. Celice NK (dt(B6), KatL^{-/-}, KatL^{+/+}) smo 24 ur tretirali z inhibitorjema E-64d in L1, nato smo naredili citotoksične teste, pri čemer se je izkazalo, da v primeru mišjih celic NK inhibitorja v mikromolarnih koncentracijah ne vplivata na citotoksičnost mišjih celic NK.

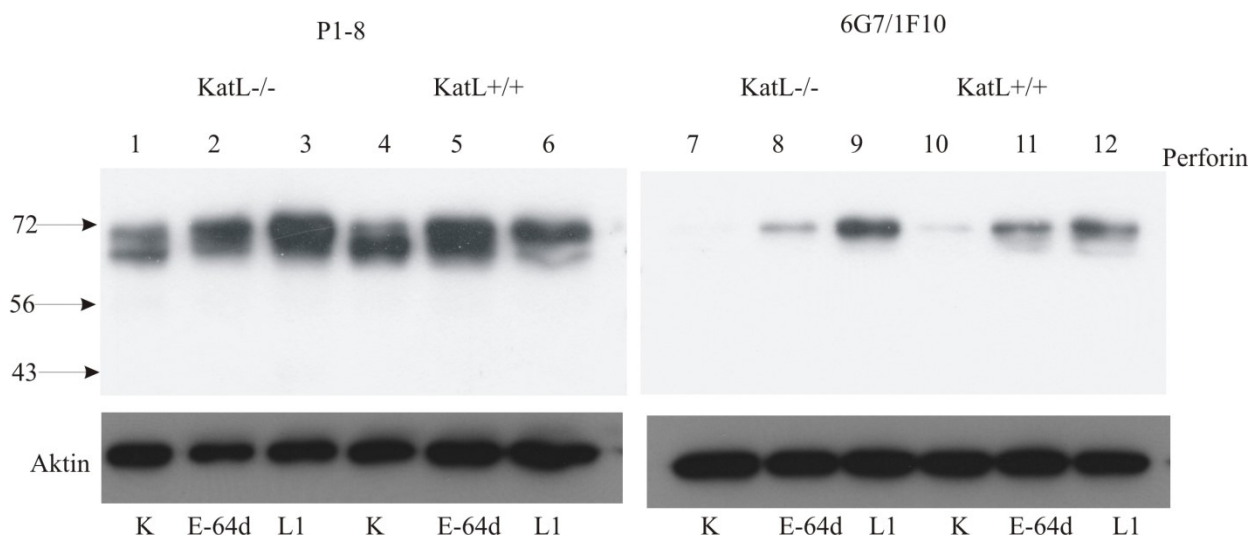


Slika 27: Citotoksičnost celic NK miši divjega tipa in celic NK Katepsin L ničelnih miši, inkubiranih z E-64d in L1. Liza s ⁵¹Cr označenimi celicami YAC-1 s celicami NK miši divjega tipa in Katepsin L ničelnih miši. Celice NK so bile inkubirane 24 ur z inhibitorjema E-64d in L1. Rezultati predstavljajo povprečje triplikatov +/- S.D.

4.7.4 Vpliv inhibitorjev cisteinskih Katepsinov na procesiranje perforina v celicah NK pri miših divjega tipa in Katepsin L ničelnih miših

Pri človeških celicah NK smo pokazali, da inhibitorja cisteinskih Katepsinov E-64d in L1 inhibirata procesiranje perforina. Želeli smo preveriti, če imata podoben vpliv tudi na mišje

celice NK. Pripravili smo celice NK (dt(B6), *KatL*^{-/-}, *KatL*^{+/+}) ter jih 24 ur inkubirali z inhibitorjema E-64d in L1, pripravili lizate in naredili imunodetekcijo perforina s specifičnimi protitelesi za C-terminal mišjega perforina (6G7/1F10) kakor tudi s protitelesi P1-8, ki prepoznajo celo molekulo perforina. Celice NK, ki so bile inkubirane z inhibitorjema cisteinskih katepsinov (ne glede na to, ali so bile celice NK miši divjega tipa ali katepsin L ničelnih miši), so imele več neprocesirane oblike perforina, torej takšne oblike, da so jo prepoznala specifična protitelesa za C-terminal mišjega perforina (6G7/1F10) (Slika 28).



Slika 28: *Inhibicija procesiranja perforina z inhibitorjema cisteinskih katepsinov L1 in E-64d* v celicah NK miši singenega divjega tipain katepsin L ničelnih miši. Imunodetekcija perforina s protitelesi P1-8 in 6G7/1F10 v celicah NK (*KatL*^{-/-}, *KatL*^{+/+}). Na oba gela smo nanесли identična vzorca. Prva membrana je bila razvita s protitelesi P1-8, druga membrana pa s 6G7/1F10.

Nivo izražanja perforina je podoben v celicah NK katepsin L ničelnih miši in miših divjega tipa, pri celicah NK pripravljenih iz obeh tipov miši smo dokazali procesirano in ne procesirano obliko perforina. Pri celicah NK miši divjega tipa je večina perforina procesiranega (Slika 28: vzorec 4), medtem ko je bila količina procesiranega in neprocesiranega perforina pri celicah NK katepsin L ničelnih miši primerljiva (Slika 28: vzorec 1.), kar kaže na to, da je katepsin L dejansko odgovoren za procesiranje perforina.

Celice NK, ki so bile inkubirane z inhibitorjema cisteinskih katepsinov (ne glede na to, ali so bile celice NK miši divjega tipa ali katepsin L ničelnih miši), so imele več neprocesirane oblike perforina, torej oblike, ki so jo prepoznala protitelesa specifična za C-terminalni del mišjega perforina (6G7/1F10) (Slika 28).

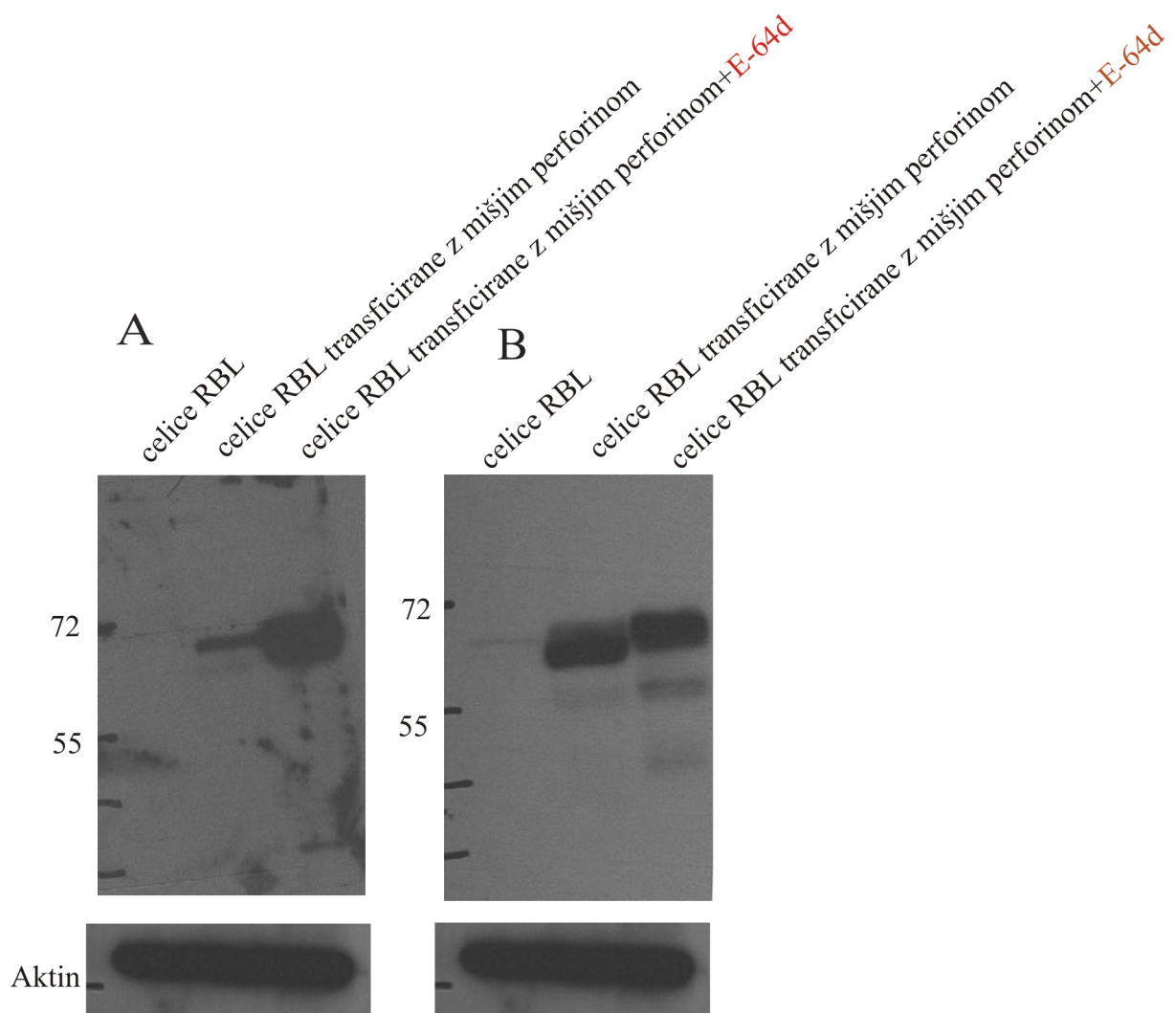
4.8 Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na perforin transficiran v celice RBL in OT-1 CTL perforin ničelne miši

Pri študijah, kjer smo uporabili inhibitorje cisteinskih katepsinov, so bile inkubacije običajno dolge 24 ur. Tako smo videli efekt inhibitorjev na procesiranje perforina v zadnjih 24 urah od dodatka inhibitorjev. Celice so verjetno imele tudi perforin, ki se je procesiral še preden smo dodali inhibitorje in je bil že funkcionalen ob dodatku inhibitorjev. Da bi se izognili efektu že procesiranega perforina, smo naredili poskuse na perforinu, transficiranemu v celice dve uri pred dodatkom inhibitorjev.

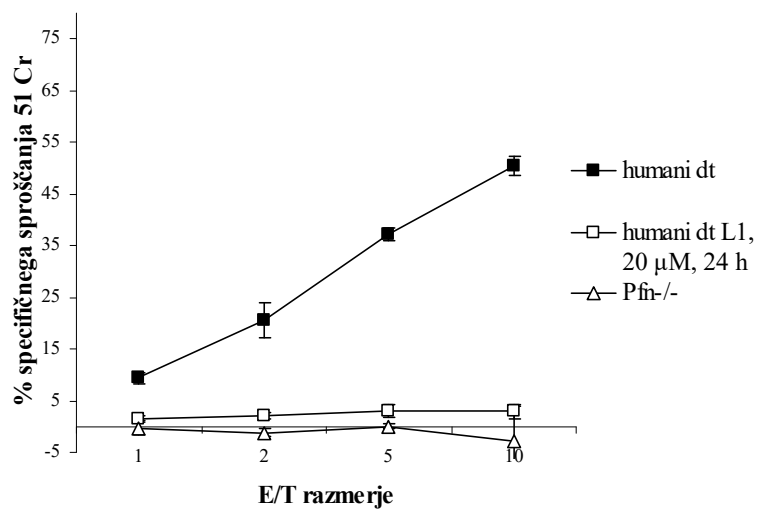
Za študije mutacij perforina v laboratoriju JA Trapanija pogosto uporabljajo sistem celic RBL. Celice RBL so podganje levkemijske celice bazofilcev, ki izražajo receptor Fcε, kateri prepozna receptor TNP na tarčnih celicah Jurkat. Pri tem se iz celic RBL sprostijo granule. CDNA perforina je bila klonirana v interni ribosomalni vstopni del (IRES) – osnovanega ekspresijskega vektorja (pIRES2-EGFP). Konstrukt DNA za perforin skupaj s proteinom GFP (GFP, ang. green fluorescence protein). smo transficirali v celice RBL z elektroporacijo. V celicah RBL transficiranim z omenjenim vektorjem se izrazita tako perforin kakor tudi zelenofluorescentni protein. Naslednji dan smo transficirane celice RBL ločili od netransficiranih s sorterjem na osnovi zelenofluorescentnega proteina (GFP).

V naših poskusih smo celice RBL transficirali z mišjim perforinom ter inkubirali z inhibitorji. Naslednji dan smo pozitivne celice GFP ločili na pretočnem citometru. Naredili smo imunodetekcijo perforina s specifičnim protitelesi za C-terminalni del perforina (6G7/1F10) ter nato isto membrano razvili še s protitelesi P1-8. Z imunodetekcijo perforina pri obeh protitelesih vidimo, da ima inhibitor E-64d učinek na procesiranje perforina. Na Sliki 29A, kjer smo membrano razvili s protitelesi za C-terminalnim del perforina (6G7/1F10), vidimo, da je pri inkubaciji z E-64d prisotnega veliko več neprocesiranega perforina kot pri kontroli.

Podoben sistem kot za celice RBL so razvili za CTL, izolirane iz OT-1 miši z izbitim genom za perforin. Naredili smo prehodno transfekcijo kot je opisano v materialih in metodah. Celice smo transficirali z človeškim perforinom ter inkubirali z inhibitorjem L1 (opisano v metodah in materialih). Naslednji dan smo transficirane celice ločili od netransficiranih s sorterjem na osnovi zelenofluorescentnega proteina (GFP). V tem primeru je inhibitor L1 popolnoma inhibiral citotoksičnost transficiranega človeškega perforina v OT-1 CTL perforin ničelnih miši.



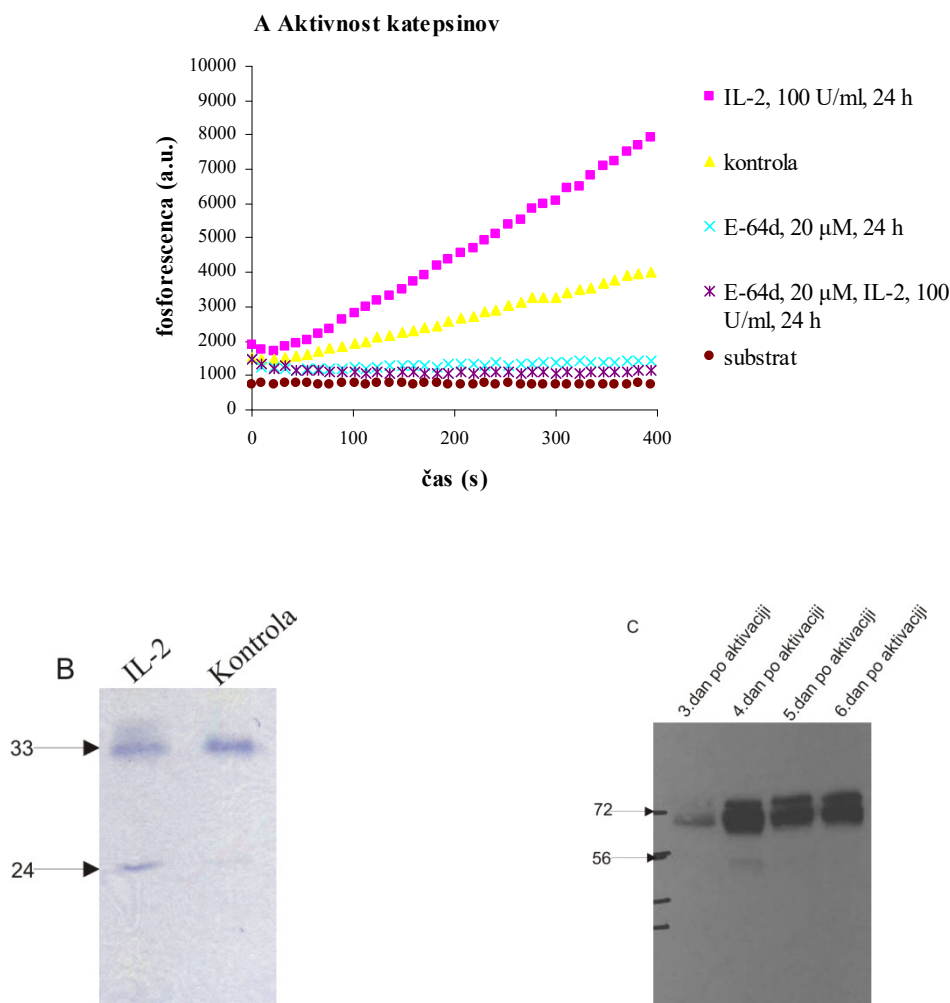
C Transfekcija humanega pfn v mišje pfn^{-/-}CTL+ L1



Slika 29: *Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov E-64d in L1 na transficiran perforin v OT-1 CTL perforin ničelnih miši in celice RBL.* A: Imunodetekcija perforina s protitelesi za C-terminalnimi del perforina (6G7/1F10) v transficiranih celicah RBL z mišjim perforinom, inkubiranim 24 ur z E-64d, 20 μ M. B: Imunodetekcija perforina s protitelesi P1-8 na membrani A, naslednji dan. C: Liza s ^{51}Cr -označenimi in s peptidom SIINFEKL stimuliranimi tarčnimi celicami EL4 s transficiranim človeškim perforinom v OT-1 CTL, perforin ničelnih miši, ki so bili inkubirani 24 ur z L1. Rezultati predstavljajo povprečje triplikatov +/- S.D.

4.9 Vpliv IL-2 na aktivnost katepsinov v celicah YT in izražanje perforina v mišjih celicah NK

Interlevkin 2 (IL-2) zviša citotoksičnost, vzdržuje viabilnost in proliferacijo celic NK (Son et al., 2001). Celice YT smo 24 ur stimulirali z 100 U/ml IL-2 ali E-64d ter 100 U/ml IL-2. Tetirali smo, kako IL-2 vpliva na aktivnost katepsinov, aktivacijo OT-1 CTL in celic NK ter nivo izražanja perforina v celicah NK. Pripravili smo celotne celične lizate in izmerili aktivnost katepsinov s substratom za katepsine z-Phe-Arg-AMC. Naši rezultati so pokazali, da je aktivnost katepsinov povečana ob stimulaciji z IL-2 ter popolnoma blokirana z E-64d (Slika 30). Povišano aktivnost katepsinov ob stimulaciji z IL-2 smo detektirali tudi s probo DCG-04, ki se veže v aktivno mesto katepsinov (Greenbaum et al., 2000). V celicah YT, stimuliranih z IL-2, smo zaznali liso pri 24 kDa, ki bi lahko bila lisa aktivnega katepsina L ali katepsina S (Slika 30B). Povečana aktivnost katepsinov ob stimulaciji z IL-2 bi lahko nakazovala na vlogo katepsinov pri citotoksičnosti celic NK in CTL. Poročali so, da stimulacija celic z IL-2 zviša mRNA za perforin in grancim B (Savary et al., 1989), zato smo pogledali kako IL-2 vpliva na izražanje perforina v mišjih celicah NK. Mišje celice NK smo pripravili ter jih več dni stimulirali z 1000 U/ml IL-2. Testirali smo izražanje perforina v mišjih celicah NK in potrdili že objavljene rezultate, kjer so z drugimi tehnikami prav tako pokazali, da se ob stimulaciji celic NK z IL-2 poveča nivo perforina (Janas et al., 2005) (Slika 30C).



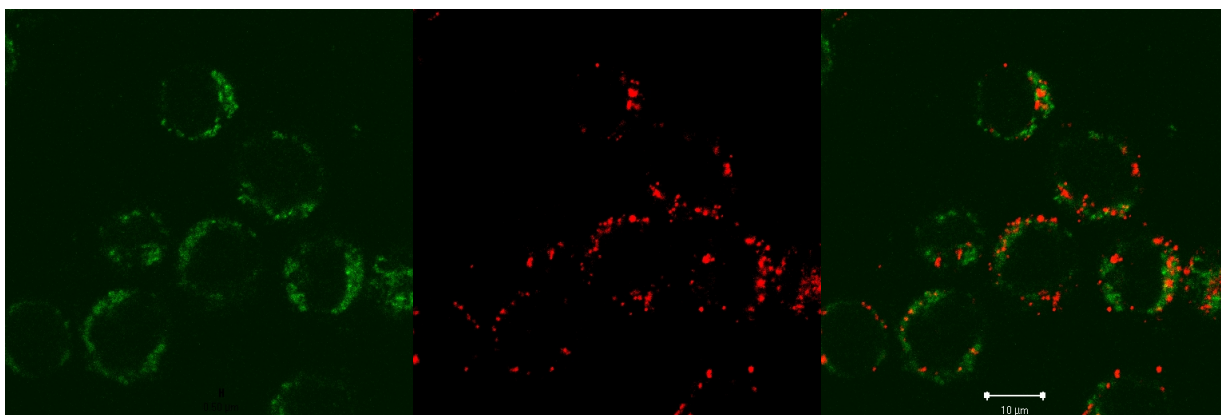
Slika 30: Vpliv IL-2 na aktivnost katepsinov v celicah YT in izražanje perforina v mišjih celicah NK A: Cepitev fluorogenega substrata z-Phe-Arg-AMC pri pH 5.5 v celicah YT, stimuliranih in nestimuliranih z IL-2, kot je opisano v metodah in materialih. B: Označevanje aktivnega mesta katepsinov s probo DCG-04 v celicah YT, stimuliranih in nestimuliranih z IL-2 100 U/ml, kot je opisano v metodah in materialih. Na gel je naneseno po 50 µg proteina (v vsaki liniji). C: Ekspresija perforina v mišjih celicah NK po različnih dnevih aktivacije. Na gel je naneseno po 25 µg proteina (v vsaki liniji).

4.10 . Povečana lokalizacija cistatina F v sekretornih granulah celic YT po stimulaciji z IL-2

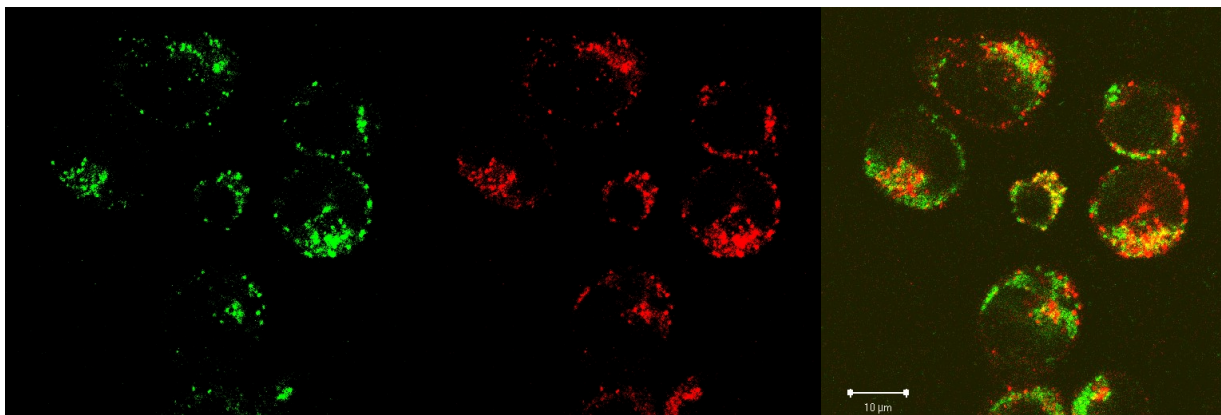
Čprav smo našli cistatin F delno kolokaliziran v sekretornih granulah tudi pri nestimuliranih celicah YT (Slika 31A), smo pri IL-2 aktiviranih celicah YT opazili povečano lokalizacijo cistatina F v sekretornih granulah (Slika 31B). Ker smo v predhodnem poskusu pokazali, da je

aktivnost katepsinov B, L in S povišana, smo sklepali, da cistatin F ne inhibira opisanih katepsinov. Hamlington in sodelavci so poročali, da katepsin C kolokalizira z cistatinom F, bolj natančno z krajšo varianto cistatina F, ki lahko inhibira tudi katepsin C, v mišjih makrofagih kostnega mozga (Hamilton et al., 2008). Poročali so tudi, da je aktivnost katepsina C po stimulaciji NK celic z IL-2 nekoliko nižja, kot v nestimuliranih celicah NK (Meade et al., 2006). Torej sklepamo, da je poglavitna tarča cistatina F v celicah NK aminopeptidaza katepsin C in ne drugi cisteinski katepsini (Konjar et al., 2010).

A



B



Slika 31: *Kolokalizacija cistatina F in perforinav celicah YT*. Cistatin F in perforin v celicah YT smo označili z imunofluorescenco. Perforin smo označili s primarnimi mišjimi protitelesi in sekundarnimi kozjimi (antimišjimi) protitelesi Alexa Flour TM 546 (rdeča barva). Cistatin F smo označili s primarnimi zajčjimi protitelesi ter sekundarnimi kozjimi (antizajčjimi) protitelesi Alexa Flour TM488 (zelena barva). Kolokalizacija med cistatinom F in perforinom se vidi kot rumene lise. Slike so bile posnete pri enakih nastavitvah, tako da lahko nivo cistatina F v nestimuliranih in stimuliranih primerjamo. Merilo na slikah je 10 µm. A: Nestimulirane celice YT B: IL-2 stimulirane celice YT.

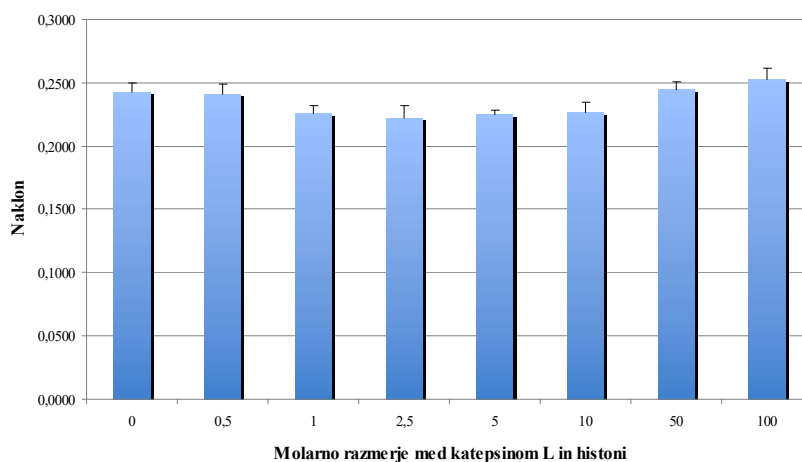
4.11 *In vitro* inhibicija rekombinantnega človeškega katepsina L s človeškim stefinom B

V naših raziskavah smo pokazali, da stefin B interagira z katepsinom L in histoni v jedru (Čeru et al., 2010). Testirali smo, če histoni vplivajo na inhibitorno aktivnost stefina B. Določili smo pogoje, pri katerih je bila inhibicija katepsina L v linearnem območju ~ 70 % inhibicija. Nato smo testirali, če histoni inhibirajo človeški katepsin L *in vitro* ter ugotovili, da histoni ne inhibirajo katepsina L tudi v 100-kratnem presežku (2,15 μM koncentracija histonov); Slika A.

Stefin B smo predinkubirali z različnimi koncentracijami histonov in izmerili aktivnost katepsina L. Opazili smo, da vezava histonov na stefin B ne vpliva na inhibicijo katepsina L pri nižjih koncentracijah histonov (10,8–210 nM), medtem ko smo pri višjih koncentracijah histonov (1,05–2,15 μM) opazili povečano inhibicijo katepsina L s stefinom B (Slika 32).

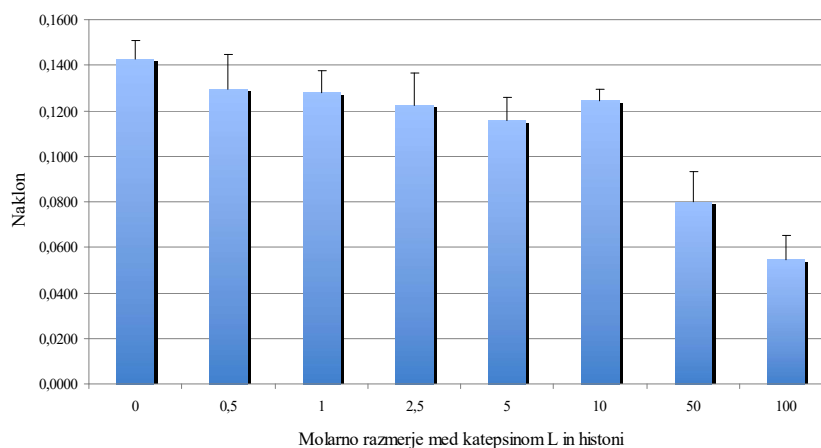
A

Vpliv histonov na aktivnost katepsina L



B

Vpliv histonov na inhibicijo Katepsina L

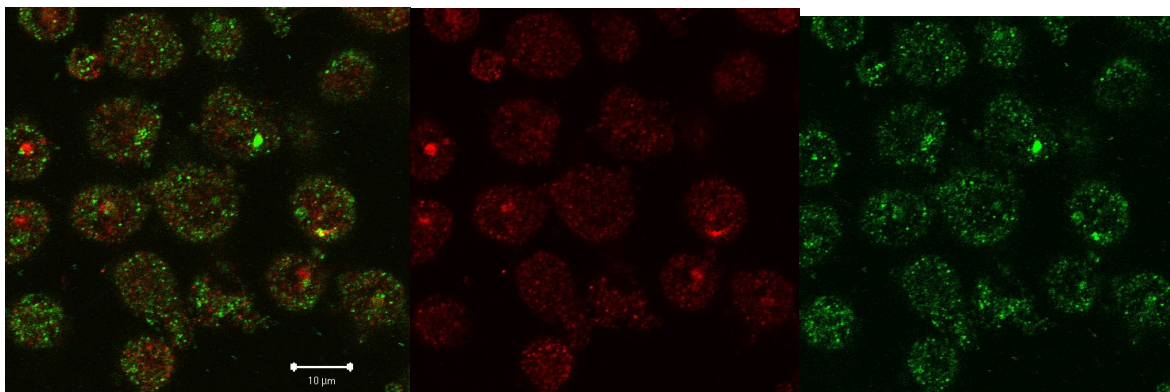


Slika 32: Vezava stefina B na histone poveča inhibicijo stefina B na katepsin L. A: Histoni ne inhibirajo katepsina L. Katepsin L (21,5 nM) smo inkubirali z različnimi koncentracijami histonov. Rezultati so podani kot povprečje vsaj treh neodvisnih eksperimentov. B: Dodatek histonov je povečal inhibitorno aktivnost stefina B na katepsin L. Stefin B (15 nM) smo predinkubirali z različnimi koncentracijami histonov (10,8–2,15 μ M), nato smo dodali katepsin L (21,5nM). Rezultati predstavljajo povprečje vsaj treh neodvisnih eksperimentov.

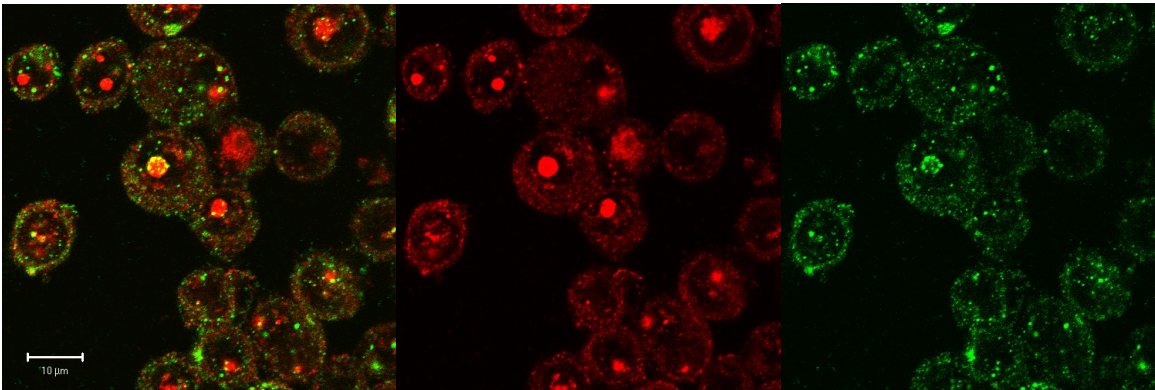
4.12 Kolokalizacija katepsina L in serpina A3G v jedru mišjih makrofagov

Serpin A3G (Spi A3G) je inhibitor serinskih, kakor tudi cisteinskih proteinaz. Poročali so, da je njegova koncentracija izrazito povečana pri CD8⁺ spominskih T celicah (Liu et al., 2004) kakor tudi v aktiviranih makrofagih (Hamerman et al., 2002). Opazili smo, da je SpiA3G kolokaliziran z katepsinom L v jedru klasično aktiviranih makrofagov (stimuliranih z IFN- γ in LPS) ne pa nestimuliranih makrofagih (Slika 33), kar kaže na potencialno vlogo SpiA3G pri regulaciji katepsina L v jedru makrofagov (Konjar et al., 2010).

A



B



Slika 33: Kolokalizacija *serpina A3G* in *katepsina L* v mišjih makrofagih RAW 264,7. Serpin A3G in katepsin L smo v mišjih makrofagih RAW 264,7 označili z imunofluorescenco. Katepsin L smo označili s primarnimi mišjimi protitelesi in sekundarnimi kozjimi (antimišjimi) protitelesi Alexa Flour TM 546 (rdeča barva). Serpin A3G smo označili s primarnimi zajčjimi protitelesi ter sekundarnimi kozjimi (antizajčjimi) protitelesi Alexa Flour TM488 (zelena barva). Kolokalizacija med katepsinom L in serpinom A3G se vidi kot rumene lise. Merilo na slikah je 10 μm. Celice smo pustili nestimulirane (A) ali inkubirane z 300 UI/ml IFN- γ preko noči, naslednji dan pa smo jim dodali še z 100ng/ml LPS (18 h) (B).

5 Razprava

Cisteinski katepsini imajo pomembno vlogo v celicah imunskega sistema. Poročali so, da imajo vlogo pri antigenski prezentaciji (Rudensky in Beers, 2006) pomembni so pri razvoju NKT celic (Honey et al., 2002), vlogo katepsinov pa so ugotavljali tudi pri celicah NK (Wex et al, 2003; Baran et al., 2006). Čeprav je bilo desetletje nazaj objavljeno, da se perforin aktivira s proteolitično cepitvijo v kislem okolju sekretornih granul (Uellner et al., 1997), pa proteinaza, ki je odgovorna za to cepitev, še ni identificirana. Pokazali so, da je proteolitska cepitev inhibirana z amonijevim kloridom, konkanamicinom A, leupeptinom ter E-64.

Naši rezultati kažejo, da imajo človeške celice NK (NK-92, KHGY1, YT 5) in mišji CTL, inkubirani z inhibitorjem cisteinskih katepsinov E-64d ter z inhibitorjem katepsina L L1, zmanjšano sposobnost za pobijanje tarčnih celic (Sliki 15, 16), kar nakazuje na vlogo katepsinov v tem procesu. Opazili smo tudi, da daljši ko je čas inkubacije z inhibitorjem L1, bolj učinkovito je inhibirana citotoksičnost celic NK-92 (Slika 16C in D). To kaže na vlogo katepsinov v procesih, ki so časovno odvisni in so lahko povezani s sintezo ter procesiranjem določenega proteina, na katerega imajo katepsini vpliv (v našem primeru je to perforin).

E-64d lahko poleg cisteinskih katepsinov inhibira tudi kalpaine. Ker smo želeli identificirati proteinazo, ki ima vlogo pri citotoksičnosti celic NK ter procesiranju perforina, smo naredili nekaj eksperimentov tudi z inhibitorjem kalpainov, kalpastatinom. Kalpastatin ni imel vpliva na citotoksičnost celic NK (Slika 15B). Poročali so, da so kalpainsi lokalizirani v endoplazmatskem retikulumu (Samantha et al., 2010). Študije kolokalizacij perforina in markerja za endoplazmatski retikulum PDI niso pokazale kolokalizacije, kar posledično kaže na to, da se perforin ter kalpainsi ne nahajajo v istem veziklu (Slika 11B).

Človeški perforin je glikoziliran na dveh mestih – prvo je na 205. aminokislini na aminokislinskem zaporedju NAST (zaporedje asparagin, alanin, serin, treonin), drugo pa na C-terminalnemu delu na 549. aminokislini in aminokislinskem zaporedju NRSG (zaporedje asparagin, arginin, serin, glicin) (Lichtenheld et al., 1988). Uellnerjeva s sodelavci je predlagala hipotezo, da procesiranje C-terminalnega dela poteka tako, da se odcepi C-terminalni del, ki je N-glikoziliran. To hipotezo smo potrdili z eksperimenti s tunikanamicinom, pri čemer smo pokazali, da ob blokadi N-glikozilacije s tunkanamicinom in istočasni inkubaciji z E-64d ne dobimo enake lise za perforin, kot če bi inkubirali celice samo

z E-64d (lisa ~70 kDa). V tem primeru dobimo liso ~60 kDa, ki je podobna kot pri procesiranem perforinu. Iz tega sledi, da katepsini odcepijo C-terminalni del perforina, ki je N-glikoziliran (Slika 13). Hipotezo bi dodatno lahko potrdili, če bi imeli specifična protitelesa, katera bi prepoznala C-terminalni del človeškega perforina. Z uporabo le-teh bi morali videti razliko med kontrolnimi celicami NK (procesiran perforin) in celicami NK, ki bi bile inkubirane s tunikanamicinom ter E-64d (neprocessiran in deglikoziliran perforin). Podobno bi lahko tak eksperiment naredili na mišjih celicah NK. V tem primeru bi lahko uporabili specifična protitelesa proti C-terminalnemu delu mišjega perforina. Smo pa s protitelesi za C-terminalni del mišjega perforina (6G7/1F10) naredil *in vitro* cepitve mišjega perforina z katepsinom L in eksperimente na mišjih celicah NK, ki smo jih tretirali z inhibitorji cisteinskih katepsinov.

Nenavadno je, da ima vsaka celična linija človeških celic NK drugačen nivo izražanja perforina (Slika 12) kot tudi nivo grancimov B in H (Slika 18). Celice YT imajo ogromno perforina v primerjavi s celicami NK-92 in ob dodatku E-64d dobimo liso, ki je izrazito heterogena. Tako sklepamo, da je perforin glikoziliran, in da so glikani, ki so vezani na perforin, heterogeni ter različnih molskih mas. Kljub temu da imajo celice YT kot tudi celice YT 5 veliko perforina v primerjavi s celicami KHGY1 in celicami NK-92 (Slika 12), celice YT ne pobijajo tarčnih celic K562, celice YT 5 pa zelo slabo pobijajo tarčne celice K562 (Slika 16 B). To je v nasprotju s tem, da izražajo bistveno večje količine perforina kot ostale celične linije NK. Obstaja možnost, da celična linija celic YT slabše izraža receptorje za prepoznavanje tarč, posledično ne pride do eksocitoze sekretornih granul ter pobijanja tarč. Nivo izražanja posameznih receptorjev bi lahko ugotovili s pretočnim citometrom, tako da bi primerjali nivo izražanja enakih receptorjev na celicah YT in nekih drugih celicah NK, ki bi učinkovito pobijale iste tarčne celice.

V celicah NK so prisotni katepsini B, C, H, L, S, X in W (NCBI GEO: GSE7764). *In vitro* eksperimenti so pokazali, da so katepsini B, K, L in S cepijo ter deaktivirajo perforin (Slika 9), kar ne izključuje možnosti, da so ti katepsini sposobni deaktivirati perforin na površini CTL med samim citotoksičnim testom.

Objavljeno je bilo, da katepsin B razgradi ter inaktivira perforin na površini celic, poleg tega so pokazali, da nivo katepsina L na površini CTL med degranulacijo ostaja nespremenjen (Bajali et al., 2002). Kasnejše študije, pri katerih so uporabili CTL, izolirane iz miši z izbitim genom za katepsin B, vloge katepsina B niso potrdile (Baran et al., 2006). Narejene so bile tudi študije o vlogi katepsina W v mišjih CTL. Citotoksični testi na CTL, izoliranih iz miši z izbitim genom za katepsin W, so pokazali, da katepsin W ni pomemben za citotoksičnost CTL (Ondr et al., 2004; Stoeckle et al., 2009). Poskusili smo ugotoviti, če imajo ostali katepsini

vlogo pri aktivaciji, inaktivaciji ali procesiranju perforina.

Za katepsin C je bilo objavljeno, da procesira grancim B v CTL (Bidere et al., 2002). Kasnejše študije na CTL izoliranih iz miši z izbitim genom za katepsin C so pokazale, da je procesiranje grancima B manjše ampak še vedno učinkovito kot pri CTL izoliranih miši divjega tipa. Poleg tega je pobijanje tarčnih celic CTL izoliranih iz miši z izbitim genom za katepsin C malo manj učinkovito kot pobijanje CTL izoliranih miši divjega tipa. Sklepali so, da so v tem procesu lahko udeležene tudi druge proteinaze (Sutton et al., 2007, Meade et al., 2009).

Z označevanjem proteinov s specifičnimi protitelesi in konfokalno mikroskopijo smo pokazali, da perforin ni kolokaliziran s katepsinoma B ter S, da pa delno kolokalizira s katepsinom L (Slika 11). Delna kolokalizacija je lahko posledica tega, da so sekretorne granule dinamični organeli (Stinchcombe et al., 2007), preko katerih se določeni proteini izmenjujejo. Obstaja možnost, da sta kolokalizirana samo v določenih granulah ali/in ob določenem trenutku. Če povzamemo članke, ki so bili do sedaj objavljeni na temo katepsinov v CTL ter celicah NK, katepsin L še ni bil obravnavan, hkrati pa so naši rezultati kazali na vlogo katepsina L pri procesiranju perforina in posledično njegovi vlogi pri citotoksičnosti CTL ter celic NK.

Poleg delne kolokalizacije perforina in katepsina L smo pokazali kolokalizacijo katepsina L ter cistatina F (Slika 11). Cistatin F je selektivno izražen v imunskih celicah in je edini cistatin, ki je sintetiziran kot neaktivni disulfidno vezani dimerni prekurzor. Pokazali so, da je glavna tarča cistatina F v imunskih celicah katepsin C, ki regulira aktivacijo grancimov (Hamilton et al., 2008). *In vitro* cistatin F inhibira katepsine F, H, K, L, S, V, X, C (Langerholm et al., 2005, Hamilton et al., 2008). Obstaja možnost, da cistatin F regulira aktivnost katepsina L v celicah NK in ima podoben vpliv na citotoksičnost celic NK kot ga imata inhibitor E-64d in inhibitor katepsina L L1. Pokazali smo povečano lokalizacijo cistatina F v sekretornih granula celic YT (Konjar et al., 2010). Ker smo istočasno dokazali povečano aktivnost katepsinov L in S, sklepamo, da je ob IL-2 stimulaciji poglavitna tarča cistatina F katepsin C. Objavili so namreč, da je aktivnost katepsina C v celicah NK znižana ob IL-2 stimulaciji (Meade et al., 2006).

Procesiranje perforina poteka v kislem okolju (pH 5.5), ki je optimalno za aktivnost katepsina L. Pri nevtralnem pH-ju se katepsin L inaktivira v nekaj minutah (Barrett et al., 1981; Turk et al., 1998). S specifičnimi protitelesi za C-terminalni del perforina smo *in vitro* pokazali, da katepsin L preferenčno odcepi C-terminalni del perforina v koncentracijsko odvisnem razmerju (Slika 14), lahko pa cepi perforin tudi na drugih mestih (Slika 14). *In vivo* lahko pride do te preferenčne cepitve v sekretornih granulah, v katerih je perforin shranjen v

kompleksu s seriglicinom in grancimom B ter je zaščiten pred razgradnjo (Metkar et al., 2002).

Pokazali smo že, da imata inhibitorja E-64d in L1 vpliv na citotoksičnost človeških celic NK. Nato smo hoteli preveriti še efekt inhibitorjev na citotoksičnost primarnih CTL, izoliranih iz transgene miši, pri katerih CTL izražajo T-celični receptor OT-1, specifičen za peptid ovalbumina SIINFEKL. Inkubacija mišjih OT-1 CTL z inhibitorjema E-64d ter L1 skoraj popolnoma prepreči pobijanje tarčnih celic (Slika 19). Medtem ko je inhibitor katepsina L L1 precej specifičen v *in vitro* študijah, lahko v celičnih kulturah učinkovito inhibira še nekatere druge katepsine, in zato ne moremo izključiti vloge ostalih proteaz pri procesiranju perforina. Efekt inhibitorjev E-64d in L1 na OT-1 CTL je večji kot na človeške celice NK pri pobijanju tarčnih celic. To je lahko posledica različnega izražanja perforina v OT-1 CTL, človeških ter mišjih celicah NK. OT-1 CTL v primerjavi s človeškimi ali mišjimi celicami NK izražajo zelo male količine perforina. Pri CTL se granule in perforin sintetizirajo šele, ko celice prepoznajo specifičen antigen in se aktivirajo (Shresta et al., 1998), medtem ko se pri mišjih celicah NK granule in perforin sintetizirajo med stimulacijo z IL-2 (Farrar et al., 1981). Možno je, da je življenska doba perforina v OT-1 CTL zelo kratka, tako da se v 24 urah sintetizira ves perforin, ki se nato porabi za pobijanje tarčnih celic. Torej če je v teh 24 urah prisoten inhibitor, se nastali perforin ne procesira v aktivno obliko, zato imajo inhibitorji večji inhibični vpliv na citotoksičnost kot na človeških ali mišjih celicah NK, saj imajo te celice NK večje zaloge perforina, tudi tistega, ki je bil v njih že 24 ur pred dodatkom inhibitorjev in je bil že sprocesiran v sekretornih granulah.

Inhibitorji cisteinskih katepsinsov so vplivali predvsem na procesiranje perforina, ki se je sintetiziral v času inkubacije z inhibitorji, torej v 24 urah v večini poskusov, zato je bilo smiselno, da preverimo vpliv inhibitorjev tudi v sistemih, kjer je perforin predhodno transficiran v celice. Tako smo lahko pogledali učinek inhibitorjev samo na sveže sintetiziran perforin, ki je nastajal ob prisotnosti inhibitorjev. V poskusih, kjer smo človeške celice NK inkubirali z inhibitorji, smo pri imunodetekciji perforina vedno opazili dve lisi, eno za procesirano in eno za neprocesirano obliko. Procesirana oblika je po vsej verjetnosti perforin, ki se je procesiral pred dodatkom inhibitorjev cisteinskih katepsinsov (Slika 12). Iz eksperimenta, kjer smo predhodno transficirali celice RBL z mišjim perforinom, smo z imunodetekcijo C-terminalnega dela perforina opazili kar precejšno razliko med celicami RBL, ki so bile inkubirane z E-64d, in netretiranimi celicami RBL (Slika 34). Pri eksperimentu s prehodno transficiranim človeškim perforinom v OT-1 CTL iz miši z izbitim genom za perforin smo opazili, da inhibitor L1 povsem inhibira citotoksičnost teh celic. To še dodatno potrjuje našo hipotezo, da je procesiranje perforina ključno za citotoksičnost, in da

perforin v neprocesirani obliki nima litičnih sposobnosti.

Obstaja možnost, da imata inhibitorja E-64d ter L1, ki zmanjšata citotoksičnost OT-1 CTL, poleg vpliva na procesiranje perforina še kakšen drug vpliv na citotoksičnost OT-1 CTL. Pokazali smo že, da ne vplivata na aktivnost grancimov v človeških celicah NK (Slika 18), zato smo preverili njun vpliv na degranulacijo CTL, pri čemer smo s pretočno citometrijo merili izražanje membranskega proteina CD107 na površini CTL med samim citotoksičnim testom. Pokazali smo, da se OT-1 CTL, inkubirani z inhibitorjema E-64d in L1 ali netretirani enako dobro degranulirajo med citotoksičnim testom (Slika 26).

Katepsin L je potreben za razgradnjo invariantne verige molekul PHK II v timusu in posledično za antigensko prezentacijo. Pri miši z izbitim genom za katepsin L se je število celic CD4⁺ v timusu ter periferiji zmanjšalo iz 80 % na 60 %, medtem ko se je število celic CD8⁺ povišalo (Nakagawa et al., 1998). V naših eksperimentih smo opazili manjše razlike v učinkovitosti pobijanja tarčnih celic OT-1 CTL in celic NK katepsin L ničelnih miši. Tretji dan aktivacije so OT-1 CTL ter celice NK izolirane katepsin L ničelnih miši pobijale tarčne celice bolje v primerjavi z OT-1 CTL in celicami NK izoliranimi miši divjega tipa (Sliki 26 in 27). Četrty dan aktivacije so OT-1 CTL in celice NK izolirane katepsin L ničelnih miši še vedno bolj učinkovito pobijale tarčne celice kot OT-1 CTL ter celic NK izolirane miši divjega tipa, vendar je bila razlika manjša kot pri tretjem dnevu (Sliki 26 in 27). Obstaja možnost, da so se celice NK ter CTL katepsin L ničelnih miši hitreje aktivirale kot celice NK in CTL divjega tipa, zato so hitreje postale citotoksične, pri čemer bi lahko sklepali, da katepsin L upočasni aktivacijo celic NK ter CTL. To lahko nakazuje na funkcije katepsina L pri aktivaciji CTL z antigenim peptidom in aktivaciji celic NK z IL-2, tako da katepsin L upočasni aktivacijo CTL ter celic NK. Te hipoteze, kakor tudi možnih mehanizmov, ki to določajo, zaradi pomanjkanja časa nismo uspeli preveriti. Kar nekaj objav je že poročalo o jedrni funkciji katepsina L. Pokazano je bilo, da je lahko vključen v regulacijo celičnega cikla, tako da proteolitično procesira transkripcijski faktor CUX1 v jedru (Goulet et al., 2004), sodeluje pa tudi pri cepitvi histona H3 (Duncan et al., 2008). Poročali so tudi, da pomankanje katepsina L vpliva na razporeditev heterokromatina v jedru (Grigoryev et al., 1999), zato obstaja možnost, da katepsin L prek funkcij v jedru regulira aktivacijo CTL ter celic NK.

Aktivnost katepsina L v jedru pa je regulirana tudi z endogenimi inhibitorji. Pokazali smo, da stefin B interagira s histoni in katepsinom L v jedru astrocitnih celic T98G ter v mišjih fibroblastih, to pa vpliva na napredovanje celičnega cikla v S-fazo (Čeru et al., 2010). Preverili smo, če vezava histonov na stefin B vpliva na inhibicijo katepsina L. *In vitro* visoke koncentracije histonov zvišajo inhibicijo katepsina L s stefinom B (Slika 31). Pred kratkim so pokazali, da katepsin L ni edina proteinaza, prisotna v jedru. Goulet in sodelavci so

predlagali, da je cepljena oblika katepsina F aktivna v jedru (Goulet et al., 2004; Maubach et al., 2008). Maubach ter sodelavci so objavili, da je regulacija aktivnosti katepsina F v jedru matičnih jetrnih celic regulirana s stefinom B, kar ima posledično vpliv na transkripcijo dveh aktivacijskih markerjev (Maubach et al., 2008). Razlika med pobijanjem tarčnih celic OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši in OT-1 CTL miši divjega tipa ni bila takšna, kot smo pričakovali, posebej če primerjamo rezultate divjega tipa OT-1 CTL, inkubiranih z inhibitorjema L1 ter E-64d, kjer je bilo pobijanje tarčnih celic manjše. Ker so v primeru izbitega gena za določen katepsin – katepsin B (Baran et al., 2006), katepsin W (Ondr et al., 2004), katepsin C (Sutton et al., 2007; Meade et al., 2009) – sklepali na redundanco med katepsini, smo tudi v našem primeru preverili izražanje in aktivnost katepsinov v OT-1 CTL ter celicah NK katepsin L ničelnih miši. Poleg tega pa smo preverili vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na OT-1 CTL in celice NK katepsin L ničelnih miši. Pri meritvah celokupne aktivnosti cisteinskih katepsinov v lizatih OT-1 CTL (Slika 24) ter celicah NK (rezultati niso pokazani) nismo opazili razlik med lizati OT-1 CTL divjega tipa oziroma katepsin L ničelnih miši. Z imunodetekcijo katepsinov B, D, S v lizatih OT-1 CTL in celicah NK divjega tipa ter katepsina L ničelnih miši (rezultati niso pokazani) smo pokazali, da je izražanje teh katepsinov nespremenjeno. Inhibitorji cisteinskih katepsinov pa so zmanjšali citotoksičnost OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši (Slika 22). Nespremenjena aktivnost katepsinov v OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši ter vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov na citotoksičnost OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši tudi v našem primeru kažejo na redundanco med katepsini.

Inhibitorja cisteinskih katepsinov sta imela vpliv na citotoksičnost mišjih OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši (Slika 22), ne pa na citotoksičnost celic NK katepsin L ničelnih miši (Slika 27). Rezultati citotoksičnih testov na celicah NK miši divjega tipa kot tudi katepsin L ničelnih miši, tretiranimi z inhibitorjema, se ne skladajo z rezultati, ki smo jih dobili pri mišjih OT-1 CTL in človeških celicah NK, katere smo inkubirali z inhibitorji cisteinskih katepsinov. Aktivirani OT-1 CTL in aktivirane celice NK izražajo različne količine perforina. V mišjih OT-1 CTL z imunodetekcijo nismo mogli dokazati perforina, medtem ko mišje celice NK izražajo precejšnje količine perforina (Slika 28). V CTL se granule sintetizirajo, ob aktivaciji (Griffiths et al., 1997; Shresta et al., 1998). Mirujoče človeške celice NK izražajo perforin, grancima A in B ter so citotoksične. Mirujoče mišje celice NK vsebujejo grancim A, in malo perforina ter grancima B, vendar pa izražajo mRNA za vse tri gene. Po aktivaciji z IL-2 ali IL-15 prevedejo mRNA na proteinski nivo izražanja perforina, grancima A in B (Fehinger et al., 2007). Sklepamo lahko, da imajo mišje celice NK, ki so aktivirane z IL-2, precejšnje zaloge procesiranega perforina, zato 24-urne inkubacije z inhibitorji nimajo vpliva na

citotoksičnost, ker imajo mišje celice NK zaloge procesiranega perforina, ki se je sprocesiral že pred dodatkom inhibitorjev.

Imunodetekcija perforina v celicah NK katepsin L ničelnih miši je pokazala višji nivo neprocesiranega perforina kot pri celicah NK miši divjega tipa, kar kaže na to, da katepsin L procesira perforin, čeprav so lahko tudi druge proteaze udeležene pri procesiranju perforina. Inkubacije z inhibitorji, tako pri celicah NK katepsin L ničelnih miši kot pri divjem tipu, so vodile do povišanja neprocesirane oblike perforina, kar kaže da je v celicah NK katepsin L ničelnih miši še vedno aktivna neka druga proteinaza, občutljiva na E-64d. Ta proteinaza je aktivna in procesira perforin. Večja količina neprocesirane oblike perforina v celicah NK katepsin L ničelnih miši kot v celicah NK divjega tipa (KatL^{+/+}) po tretmajih z inhibitorjem L1 potrjuje, da katepsin L sodeluje pri procesiranju perforina.

Miši z izbitim genom za katepsin L ter miši z izbitim genom za katepsin B ali S nimajo enakega imunsko pomanjkljivega fenotipa kot miši z izbitim genom za perforin (Reinheckel et al., 2001; Shi et al., 1999). Pred kratkim je bilo objavljeno, da miši z izbitim genom za asparagil endopeptidazo (AEP) razvijejo klasične sindrome, ki nakazujejo na hemofagocitno limfocitocitozo (HLH), pri čemer njihove celice NK slabše pobijajo tarčne celice (Chan et al., 2009). E-64d ne inhibira AEP (Chen et al., 1997), tako da AEP direktno ne cepi perforina, vendar pa AEP cepi katepsine B, H ter L, in sicer iz enoverižne v dvoverižno obliko (Shirahama et al., 2003), pri čemer sta obe obliki tako enoverižna kot dvoverižna oblika encimsko aktivni. Možno je, da nekaj proteaz cepi perforin, te proteaze pa procesira AEP. V sistemu, kjer je pomanjkanje katepsina L, lahko obstaja redundanca, zato ostali katepsini aktivirajo perforin. Izguba proteaze, kot je AEP, ki ima sposobnost, da procesira številne druge katepsine, pa lahko posledično vpliva na procesiranje perforina. Pri človeku vpliva mutacij pri AEP, posledično zmanjšano citotoksičnost pri CTL in celicah NK in pojav bolezni HLH še niso raziskovali.

Perforin, grancimi in še nekaj drugih molekul, ki so pomembne za citotoksičnost celic NK, se povišajo ob aktivaciji CTL z IL-2 (Janas et al., 2005). Pri meritvah celokupne katepsinske aktivnosti s substratom z-Phe-Arg-AMC smo potrdili povišano aktivnost katepsinov pri stimulaciji celicah YT z IL-2 (Slika 30). S probo DCG-04, ki se veže v aktivno mesto encima smo med stimulacijo z IL-2 v celicah YT lahko detektirali povišano aktivnost katepsina S ali L (Slika 30). Pri katepsinu S nismo uspeli določiti kolokalizacije s perforinom pri nestimuliranih in stimuliranih celicah YT (rezultati niso pokazani), tako da je verjetno, da je povišanje aktivnosti katepsinov pri stimulaciji z IL-2 na račun katepsina L, kar tudi lahko kaže na pomembno vlogo katepsina L pri citotoksičnosti celic NK.

Zaključimo lahko, da imajo katepsini vpliv na procesiranje perforina in posledično

citotoksičnost človeških celic NK ter mišjih CTL. Kljub temu da katepsin L prispeva k procesiranju perforina, je v njegovi odsotnosti aktivnost ostalih proteaz v sekretornih granulah zadostna, tako da efektorske funkcije celic NK in CTL niso prizadete.

6 Zaključki

- *In vitro* katepsini B, L, S in K cepijo in deaktivirajo perforin.
- Perforin delno kolokalizira s katepsinom L, ne pa s katepsinoma B in S in se primarno nahaja v sekretornih granulah in ne v endoplazmaskem retikulumu.
- Inhibitorji cisteinskih katepsinov E-64d in L1 inhibirajo procesiranje perforina v človeških celičnih linijah celic NK (celice YT, YT 5, NK-92, KHGY1), poleg tega katepsin L preferenčno cepi rekombinantni perforin blizu C-terminala.
- Inkubacija človeških celic NK, mišjih OT-1 CTL z inhibitorjem cisteinskih katepsinov E-64d in L1 povzročita vidno inhibicijo od perforina odvisne smrti tarčnih celic ter zmanjšano procesiranje perforina, ne vplivata pa na citotoksičnost mišjih celic NK.
- Inhibitorja cisteinskih katepsinov E-64d in L1 popolnoma inhibirata aktivnost katepsinov v človeških celicah NK, poleg tega ne vplivata na aktivnost grancimov A, B in H v človeških celicah NK.
- Inhibitor cisteinskih katepsinov E-64d in L1 ne vplivata na degranuliranost OT-1 CTL
- V nasprotju z našimi pričakovanji, so v prvih dneh po aktivaciji, celice NK katepsin L ničelnih miši še bolj učinkovito pobijale tarčne celice, kot kontrolne celice NK, kar kaže verjetno na funkcijo katepsina L v jedru celic. Ugotovili smo da katepsin L interagira s stefinom B in histoni v jedru celic T98G (Čeru in sod., 2010). Serpin SpiA3G pa je kolokaliziran z katepsinom L v jedru makrofagov (Konjar et al., 2010).
- Inhibitorji cisteinskih imajo še vedno vpliv na citotoksičnost OT-1 CTL katetepsin L ničelnih miši, nimata pa vpliva na citotoksičnost celic NK katepsin L ničelnih miši.
- Sklepamo, da so katepsini, ki se nahajajo v sekretornih granulah, nujni za procesiranje perforina v njegovo aktivno obliko, in da je katepsin L pomemben, vendar ga lahko nadomestijo tudi drugi katepsini.

7 Zahvale

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Nataši Kopitar-Jerala za mentorstvo in pregled doktorske naloge, somentorju ddr. Borisu Turku za strokovno pomoč in prof. dr. Vitu Turku za nasvete.

Zahvaljujem se za potrpežljivost in krtičnost pri pregledu moje doktorske naloge komisiji v sestavi prof. dr. Alojzu Ihanu, dr. med., prof. dr. Gregorju Anderluhu in doc.dr. Veronici Stoki.

Prof. dr. Joeju Trapaniju in dr. Vivien Sutton se zahvaljujem za vso strokovno pomoč in nasvete pri raziskovalnem delu, ki sem ga opravila na PeterMaccallum Cancer Centru v Melburnu.

Raziskovalni skupini dr. Joeja Trapanija se zahvaljujem za rekombinantni mišji perforin, protitelesa za perforin, za strokovne nasvete in prijetno vzdušje v laboratoriju.

Hvala dr. Ericu Vivierju in dr. Philipu Birdu za celice NK-92 in celice K562, dr. Marku Smithu za celice YT 5, Garnettu Suck za celice KHGYG1, Franku Carbone za celice EL-4, dr. Maretu Miheliču za rekombinantni mišji katepsin L, dr. Jamesu Powersu za substrat za grancim B, dr. Jose Villadangosu za pomoč pri dostavi katepsin L ničelnih miši, dr. Thomasu Reinheckelu, dr. Christophu Petersu za katepsin L ničene miši, dr. Hideu Yagiti za P1-8 protitelesa.

Hvala sodelavcem vseh treh biokemijskih odsekov na inštitutu Jožefa Stefan za vse strokovne nasvete in prijetno vzdušje v laboratoriju.

Hvala vsem prijateljem in družini, ki so me podpirali in spodbujali v vseh teh letih nastajanja mojega doktorata.

8 Literatura in viri

- Abbas, A.K., Lichman A.H.. Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Saunders:562 (2003).
- Abbas, A.K., Lichman A.H.. Basic immunology, Philadelphia, Saunders (2007).
- Abrahamson M., Alvarez-Fernandez M. and Nathanson C. M. Cystatins. *Biochem Soc Symp*, 179-99 (2003).
- Andoniou, C.E., Coudert, J.D., Degli-Esposti, M.A. Killers and beyond: NK-cell-mediated control of immune responses. *Eur J Immunol* **38**, 2938-42 (2008).
- Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., Henkart, P.A. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* **196**, 493-503 (2002).
- Baran, K., Ciccone, A., Peters, C., Yagita, H., Bird, P.I., Villadangos, J.A., Trapani, J.A. Cytotoxic T lymphocytes from cathepsin B-deficient mice survive normally in vitro and in vivo after encountering and killing target cells. *J Biol Chem* **281**, 30485-91 (2006).
- Barrett, A.J., Kirschke, H. Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* **80 Pt C**, 535-61 (1981).
- 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. *Am J Pathol* **161**, 693-703 (2002).
- Bidere, N., Briet, M., Durrbach, A., Dumont, C., Feldmann, J., Charpentier, B., de Saint-Basile, G., Senik, A. Selective inhibition of dipeptidyl peptidase I, not caspases, prevents the partial processing of procaspase-3 in CD3-activated human CD8(+) T lymphocytes. *J Biol Chem* **277**, 32339-47 (2002).
- Bolitho, P., Street, S.E., Westwood, J.A., Edelmann, W., Macgregor, D., Waring, P., Murray, W.K., Godfrey, D.I., Trapani, J.A., Johnstone, R.W., Smyth, M.J. Perforin-mediated suppression of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2723-8 (2009).
- Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L., Moretta, A. Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol* **26**, 221-6 (2005).

- Bowers, W.E., de Duve, C. Lysosomes in lymphoid tissue. II. Intracellular distribution of acid hydrolases. *J Cell Biol* **32**, 339-48 (1967).
- Buhling, F., Rocken, C., Brasch, F., Hartig, R., Yasuda, Y., Saftig, P., Bromme, D., Welte, T. Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis. *Am J Pathol* **164**, 2203-16 (2004).
- Bulyanko Y. A., Hsing L. C., Mason R. W., Tremethick D. J. and Grigoryev S. A. Cathepsin L stabilizes the histone modification landscape on the Y chromosome and pericentromeric heterochromatin. *Mol Cell Biol* **26**, 4172-84 (2006).
- Burkhardt J. K., Hester S., Lapham C. K. and Argon Y. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J Cell Biol* **111**, 2327-40 (1990).
- Castillo, E.F., Stonier, S.W., Frasca, L., Schluns, K.S. Dendritic cells support the in vivo development and maintenance of NK cells via IL-15 trans-presentation. *J Immunol* **183**, 4948-56 (2009).
- Chan, C.B., Abe, M., Hashimoto, N., Hao, C., Williams, I.R., Liu, X., Nakao, S., Yamamoto, A., Zheng, C., Henter, J.I., Meeths, M., Nordenskjold, M., Li, S.Y., Hara-Nishimura, I., Asano, M., Ye, K. Mice lacking asparaginyl endopeptidase develop disorders resembling hemophagocytic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 468-73 (2009).
- Chan, C.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J. Can NK cells be a therapeutic target in human cancer? *Eur J Immunol* **38**, 2964-8 (2008).
- Chen J. M., Dando P. M., Rawlings N. D., Brown M. A., Young N. E., Stevens R. A., Hewitt E., Watts C. and Barrett A. J. Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem* **272**, 8090-8(1997).
- Chapman, H.A., Riese, R.J., Shi, G.P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* **59**, 63-88 (1997).
- Chia, J., Yeo, K.P., Whisstock, J.C., Dunstone, M.A., Trapani, J.A., Voskoboinik, I. Temperature sensitivity of human perforin mutants unmasks subtotal loss of cytotoxicity, delayed FHL, and a predisposition to cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9809-14 (2009).
- Cirman T., Oresic K., Mazovec G. D., Turk V., Reed J. C., Myers R. M., Salvesen G. S. and Turk B. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem* **279**, 3578-87 (2004).
- Clark, W.R. Immunology. The hole truth about perforin. *Nature* **369**, 16-7 (1994).
- Colonna, M. NK cells: new issues and challenges. Preface. *Eur J Immunol* **38**, 2927-9 (2008).

- Coulombe, R., Grochulski, P., Sivaraman, J., Menard, R., Mort, J.S., Cygler, M. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J* **15**, 5492-503 (1996).
- Cullen, S.P., Martin, S.J. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* **15**, 251-62 (2008).
- Čeru S., Konjar S., Maher K., Repnik U., Krizaj I., Bencina M., Renko M., Nepveu A., Zerovnik E., Turk B. and Kopitar-Jerala N. Stefin B interacts with histones and cathepsin L in nucleus. *J Biol Chem* (januar 2010).
- Dahl, S.W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V., Turk, B. Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry* **40**, 1671-8 (2001).
- de Duve, C. The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol* **7**, 847-9 (2005).
- Devadas, S., Das, J., Liu, C., Zhang, L., Roberts, A.I., Pan, Z., Moore, P.A., Das, G., Shi, Y. Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity* **25**, 237-47 (2006).
- Duncan, E.M., Muratore-Schroeder, T.L., Cook, R.G., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Allis, C.D. Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell* **135**, 284-94 (2008).
- Farquhar, J.W., Claireaux, A.E. Familial haemophagocytic reticulosis. *Arch Dis Child* **27**, 519-25 (1952).
- Farrar, W.L., Johnson, H.M., Farrar, J.J. Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. *J Immunol* **126**, 1120-5 (1981).
- Fischer, A., Latour, S., de Saint Basile, G. Genetic defects affecting lymphocyte cytotoxicity. *Curr Opin Immunol* **19**, 348-53 (2007).
- Fisman, D.N. Hemophagocytic syndromes and infection. *Emerg Infect Dis* **6**, 601-8 (2000).
- Fehniger, T.A., Cai, S.F., Cao, X., Bredemeyer, A.J., Presti, R.M., French, A.R., Ley, T.J. Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* **26**, 798-811 (2007).
- Felbor, U., Kessler, B., Mothes, W., Goebel, H.H., Ploegh, H.L., Bronson, R.T., Olsen, B.R. Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7883-8 (2002).

- Gaffen, S.L. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* **14**, 63-77 (2001).
- Gasque P., Jones J., Singhrao S. K. and Morgan B. Identification of an astrocyte cell population from human brain that expresses perforin, a cytotoxic protein implicated in immune defense. *J Exp Med* **187**, 451-60 (1998).
- Goulet, B., Baruch, A., Moon, N.S., Poirier, M., Sansregret, L.L., Erickson, A., Bogyo, M., Nepveu, A. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol Cell* **14**, 207-19 (2004).
- Greenbaum, D., Medzihradzky, K.F., Burlingame, A., Bogyo, M. Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chem Biol* **7**, 569-81 (2000).
- Griffiths, G.M. Protein sorting and secretion during CTL killing. *Semin Immunol* **9**, 109-15 (1997).
- Griffiths G. M. Endocytosing the death sentence. *J Cell Biol* **160**, 155-6. (2003).
- Grigoryev S. A., Bednar J. and Woodcock C. L. MENT, a heterochromatin protein that mediates higher order chromatin folding, is a new serpin family member. *J Biol Chem* **274**, 5626-36 (1999).
- Grujic, M., Braga, T., Lukinius, A., Eloranta, M.L., Knight, S.D., Pejler, G., Abrink, M. (2005) Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *J Biol Chem* **280**, 33411-8 (2003).
- Guarnaccia, S.P., Shaper, J.H., Schnaar, R.L. Tunicamycin inhibits ganglioside biosynthesis in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1551-5 (1983).
- Hadders, M.A., Beringer, D.X., Gros, P. Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science* **317**, 1552-4 (2007).
- Halangk, W., Lerch, M.M., Brandt-Nedelev, B., Roth, W., Ruthenbuerger, 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. *J Clin Invest* **106**, 773-81(2000).
- Hamilton, G., Colbert, J.D., Schuettelkopf, A.W., Watts, C. Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis. *EMBO J* **27**, 499-508 (2008).
- Hamerman J. A., Hayashi F., Schroeder L. A., Gygi S. P., Haas A. L., Hampson L., Coughlin P., Aebersold R. and Aderem A. Serpin 2a is induced in activated macrophages and conjugates to a ubiquitin homolog. *J Immunol* **168**, 2415-23(2002).
- Henkart, P.A., Millard, P.J., Reynolds, C.W., Henkart, M.P. Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors. *J Exp Med* **160**,

75-93 (1984).

Henter, J.I., Elinder, G., Soder, O., Ost, A. Incidence in Sweden and clinical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr Scand* **80**, 428-35 (1991).

Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H., Ley, T.J. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* **76**, 977-87 (1994).

Honey K., Benlagha K., Beers C., Forbush K., Teyton L., Kleijmeer M. J., Rudensky A. Y. and Bendelac A. Thymocyte expression of cathepsin L is essential for NKT cell development. *Nat Immunol* **3**, 1069-74 (2002).

Hsu, K.F., Wu, C.L., Huang, S.C., Wu, C.M., Hsiao, J.R., Yo, Y.T., Chen, Y.H., Shiau, A.L., Chou, C.Y. Cathepsin L mediates resveratrol-induced autophagy and apoptotic cell death in cervical cancer cells. *Autophagy* **5** (2009).

Humphries, D.E., Stevens, R.L. Regulation of the gene that encodes the peptide core of heparin proteoglycan and other proteoglycans that are stored in the secretory granules of hematopoietic cells. *Adv Exp Med Biol* **313**, 59-67 (1992).

Hwang, J.Y., Ohira, T., Hirono, I., Aoki, T. A pore-forming protein, perforin, from a non-mammalian organism, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics* **56**, 360-7 (2004).

Janas, M.L., Groves, P., Kienzle, N., Kelso, A. IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8+ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol* **175**, 8003-10 (2005).

Johnson, H., Scorrano, L., Korsmeyer, S.J., Ley, T.J. Cell death induced by granzyme C. *Blood* **101**, 3093-101 (2003).

Kagi, D., Odermatt, B., Seiler, P., Zinkernagel, R.M., Mak, T.W., Hengartner, H. Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J Exp Med* **186**, 989-97 (1997).

Kaiserman, D., Bird, C.H., Sun, J., Matthews, A., Ung, K., Whisstock, J.C., Thompson, P.E., Trapani, J.A., Bird, P.I. The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *J Cell Biol* **175**, 619-30 (2006).

Kawasaki, A., Shinkai, Y., Kuwana, Y., Furuya, A., Iigo, Y., Hanai, N., Itoh, S., Yagita, H., Okumura, K. Perforin, a pore-forming protein detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells. *Int Immunol* **2**, 677-84 (1990).

Kelly, J.M., Waterhouse, N.J., Cretney, E., Browne, K.A., Ellis, S., Trapani, J.A., Smyth, M.J. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *J Biol Chem* **279**,

22236-42 (2004).

Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., Lieberman, J. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* **23**, 249-62 (2005).

Kirschke, H., Wiederanders, B., Bromme, D., Rinne, A. Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J* **264**, 467-73 (1989).

Kolset, S.O., Tveit, H. Serglycin--structure and biology. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1073-85 (2008).

Kopitar-Jerala N. The role of cystatins in cells of the immune system. *FEBS Lett* **580**, 6295-301(2006).

Kummer, J.A., Kamp, A.M., Citarella, F., Horrevoets, A.J., Hack, C.E. Expression of human recombinant granzyme A zymogen and its activation by the cysteine proteinase cathepsin C. *J Biol Chem* **271**, 9281-6 (1996).

Kupfer, A., Dennert, G. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol* **133**, 2762-6 (1984).

Kupfer, A., Dennert, G., Singer, S.J. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 7224-8 (1983).

Lah, T.T., Kos, J. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem* **379**, 125-30 (1998).

Langerholc, T., Zavasnik-Bergant, V., Turk, B., Turk, V., Abrahamson, M., Kos, J. Inhibitory properties of cystatin F and its localization in U937 promonocyte cells. *FEBS J* **272**, 1535-45 (2005).

Lang, A., Horler, D., Baici, A. The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis. *J Rheumatol* **27**, 1970-9 (2000).

Lalioti M. D., Scott H. S., Buresi C., Rossier C., Bottani A., Morris M. A., Malafosse A. and Antonarakis S. E. Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy. *Nature* **386**, 847-51(1997).

Lennon-Dumenil, A.M., Roberts, R.A., Valentijn, K., Driessen, C., Overkleeft, H.S., Erickson, A., Peters, P.J., Bikoff, E., Ploegh, H.L., Wolf Bryant, P. The p41 isoform of invariant chain is a chaperone for cathepsin L. *EMBO J* **20**, 4055-64 (2001).

- Lenarcic B. and Turk V. Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D. *J Biol Chem* **274**, 563-6 (1999).
- Lichtenheld, M.G., Olsen, K.J., Lu, P., Lowrey, D.M., Hameed, A., Hengartner, H., Podack, E.R. Structure and function of human perforin. *Nature* **335**, 448-51 (1988).
- Litman, G.W., Cannon, J.P., Dishaw, L.J. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol* **5**, 866-79 (2005).
- Lieberman, J., Fan, Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* **15**, 553-9 (2003).
- Liu, J., Sukhova, G.K., Yang, J.T., Sun, J., Ma, L., Ren, A., Xu, W.H., Fu, H., Dolganov, G.M., Hu, C., Libby, P., Shi, G.P. Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells. *Atherosclerosis* **184**, 302-11 (2006).
- Liu, C.C., Rafii, S., Granelli-Piperno, A., Trapani, J.A., Young, J.D. Perforin and serine esterase gene expression in stimulated human T cells. Kinetics, mitogen requirements, and effects of cyclosporin A. *J Exp Med* **170**, 2105-18 (1989).
- Liu, C.C., Walsh, C.M., Young, J.D. Perforin: structure and function. *Immunol Today* **16**, 194-201 (1995).
- Liu N., Wang Y. and Ashton-Rickardt P. G. Serine protease inhibitor 2A inhibits caspase-independent cell death. *FEBS Lett* **569**, 49-53 (2004).
- Ljunggren, H.G., Karre, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* **11**, 237-44 (1990).
- Masson, D., Tschopp, J. Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J Biol Chem* **260**, 9069-72 (1985).
- Maubach G., Lim M. C. and Zhuo L. Nuclear cathepsin F regulates activation markers in rat hepatic stellate cells. *Mol Biol Cell* **19**, 4238-48 (2008).
- McGrath, M.E. The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**, 181-204 (1999).
- Meade, J.L., Wilson, E.B., Holmes, T.D., de Wynter, E.A., Brett, P., Straszynski, L., Ballard, P.A., Trapani, J.A., McDermott, M.F., Cook, G.P. Proteolytic activation of the cytotoxic phenotype during human NK cell development. *J Immunol* **183**, 803-13 (2009).
- Menasche, G., Feldmann, J., Fischer, A., de Saint Basile, G. Primary hemophagocytic

syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunol Rev* **203**, 165-79 (2005).

Metkar, S.S., Mena, C., Pardo, J., Wang, B., Wallich, R., Freudenberg, M., Kim, S., Raja, S.M., Shi, L., Simon, M.M., Froelich, C.J. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. *Immunity* **29**, 720-33 (2008).

Metkar, S.S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S.M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J.A., Froelich, C.J. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* **16**, 417-28 (2002).

Metkar S. S., Mena C., Pardo J., Wang B., Wallich R., Freudenberg M., Kim S., Raja S. M., Shi L., Simon M. M. and Froelich C. J. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. *Immunity* **29**, 720-33 (2008).

Mihelic M., Dobersek A., Guncar G. and Turk D. Inhibitory fragment from the p41 form of invariant chain can regulate activity of cysteine cathepsins in antigen presentation. *J Biol Chem* **283**, 14453-60 (2008).

Molleran Lee, S., Villanueva, J., Sumegi, J., Zhang, K., Kogawa, K., Davis, J., Filipovich, A.H. Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* **41**, 137-44 (2004).

Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* **3**, 6-8 (2002).

Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., Gallo, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**, 1007-8 (1976).

Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M.J., Heibein, J.A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C.F., Gaudie, J., Bleackley, R.C. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* **103**, 491-500 (2000).

Munker, R., Marini, F., Jiang, S., Savary, C., Owen-Schaub, L., Andreeff, M. Expression of CD95(FAS) by gene transfer does not sensitize K562 to Fas-killing. *Hematol Cell Ther* **39**, 75-8 (1997).

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**, 450-3 (1998).

Nalefski, E.A., Falke, J.J. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* **5**, 2375-90 (1996).

- Ondr, J.K., Pham, C.T. Characterization of murine cathepsin W and its role in cell-mediated cytotoxicity. *J Biol Chem* **279**, 27525-33 (2004).
- Parker, M.W., Feil, S.C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* **88**, 91-142 (2005).
- Peitsch, M.C., Amiguet, P., Guy, R., Brunner, J., Maizel, J.V., Jr., Tschopp, J. Localization and molecular modelling of the membrane-inserted domain of the ninth component of human complement and perforin. *Mol Immunol* **27**, 589-602 (1990).
- Petermann, I., Mayer, C., Stypmann, J., Biniossek, M.L., Tobin, D.J., Engelen, M.A., Dandekar, T., Grune, T., Schild, L., Peters, C., Reinheckel, T. Lysosomal, cytoskeletal, and metabolic alterations in cardiomyopathy of cathepsin L knockout mice. *FASEB J* **20**, 1266-8 (2006).
- Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W., Geuze, H.J. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* **173**, 1099-109 (1991).
- Pham, C.T., Thomas, D.A., Mercer, J.D., Ley, T.J. Production of fully active recombinant murine granzyme B in yeast. *J Biol Chem* **273**, 1629-33 (1998).
- Podack, E.R., Young, J.D., Cohn, Z.A. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8629-33 (1985).
- Polgar, L. Mercaptide-imidazolium ion-pair: the reactive nucleophile in papain catalysis. *FEBS Lett* **47**, 15-8 (1974).
- Potts, W., Bowyer, J., Jones, H., Tucker, D., Freemont, A.J., Millest, A., Martin, C., Vernon, W., Neerunjun, D., Slyn, G., Harper, F., Maciewicz, R. Cathepsin L-deficient mice exhibit abnormal skin and bone development and show increased resistance to osteoporosis following ovariectomy. *Int J Exp Pathol* **85**, 85-96 (2004).
- Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., Lopez-Otin, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* **4**, 544-58 (2003).
- Raja, S.M., Wang, B., Dantuluri, M., Desai, U.R., Demeler, B., Spiegel, K., Metkar, S.S., Froelich, C.J. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J Biol Chem* **277**, 49523-30 (2002).
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Barrett, A.J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **34**, D270-2 (2006).

- Reinheckel, T., Deussing, J., Roth, W., Peters, C. Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol Chem* **382**, 735-41 (2001).
- Reinheckel, T., Hagemann, S., Dollwet-Mack, S., Martinez, E., Lohmuller, T., Zlatkovic, G., Tobin, D.J., Maas-Szabowski, N., Peters, C. The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. *J Cell Sci* **118**, 3387-95 (2005).
- Riccio M., Di Giaimo R., Pianetti S., Palmieri P. P., Melli M. and Santi S. Nuclear localization of cystatin B, the cathepsin inhibitor implicated in myoclonus epilepsy (EPM1). *Exp Cell Res* **262**, 84-94 (2001).
- Robker, R.L., Russell, D.L., Espey, L.L., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., Richards, J.S. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4689-94 (2000).
- Rochel, N., Cowan, J. Negative cooperativity exhibited by the lytic amino-terminal domain of human perforin: implications for perforin-mediated cell lysis. *Chem Biol* **3**, 31-6 (1996).
- Rosado, C.J., Buckle, A.M., Law, R.H., Butcher, R.E., Kan, W.T., Bird, C.H., Ung, K., Browne, K.A., Baran, K., Bashtannyk-Puhlovich, T.A., Faux, N.G., Wong, W., Porter, C.J., Pike, R.N., Ellisdon, A.M., Pearce, M.C., Bottomley, S.P., Emsley, J., Smith, A.I., Rossjohn, J., Hartland, E.L., Voskoboinik, I., Trapani, J.A., Bird, P.I., Dunstone, M.A., Whisstock, J.C. A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science* **317**, 1548-51 (2007).
- Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V.A., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J., Anton-Lamprecht, I., Von Figura, K., Paus, R., Peters, C. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* **14**, 2075-86 (2000).
- Rudensky, A., Beers, C. Lysosomal cysteine proteases and antigen presentation. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 81-95 (2006).
- Russell, J.H., Ley, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**, 323-70 (2002).
- Santoro, A., Cannella, S., Trizzino, A., Lo Nigro, L., Corsello, G., Arico, M. A single amino acid change A91V in perforin: a novel, frequent predisposing factor to childhood acute lymphoblastic leukemia? *Haematologica* **90**, 697-8 (2005).
- Saier, M.H., Jr., Tran, C.V., Barabote, R.D. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res* **34**, D181-6 (2006).

- Samanta K., Kar P., Chakraborti T., Shaikh S. and Chakraborti S. Characteristic properties of endoplasmic reticulum membrane m-calpain, calpastatin and lumen m-calpain: a comparative study between membrane and lumen m-calpains. *J Biochem* (2010).
- Savary C. A., Lotzova E. and Klostergaard J. Interleukin 2-activated large granular lymphocytes: cytotoxic efficiency and mechanism of killing of tumor cell lines. *Immunol Lett* **21**, 145-51(1989).
- Schick C., Pemberton P. A., Shi G. P., Kamachi Y., Cataltepe S., Bartuski A. J., Gornstein E. R., Bromme D., Chapman H. A. and Silverman G. A. Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* **37**, 5258-66 (1998).
- Seemuller, E., Lupas, A., Baumeister, W. Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature* **382**, 468-71 (1996).
- Shresta, S., Pham, C.T., Thomas, D.A., Graubert, T.A., Ley, T.J. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* **10**, 581-7 (1998).
- 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).
- Shiver, J.W., Su, L., Henkart, P.A. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* **71**, 315-22 (1992).
- Shirahama-Noda K., Yamamoto A., Sugihara K., Hashimoto N., Asano M., Nishimura M. and Hara-Nishimura I. Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice. *J Biol Chem* **278**, 33194-9 (2003).
- Smith, R., Turk, V. Cathepsin D: rapid isolation by affinity chromatography on haemoglobin-agarose resin. *Eur J Biochem* **48**, 245-54 (1974).
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., Trapani, J.A. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* **192**, 755-60 (2000).
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Cretney, E., Kelly, J.M., Snook, M.B., Forbes, C.A., Scalzo, A.A. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol* **162**, 6658-62 (1999).
- Son, Y.I., Dallal, R.M., Mailliard, R.B., Egawa, S., Jonak, Z.L., Lotze, M.T. Interleukin-18 (IL-18) synergizes with IL-2 to enhance cytotoxicity, interferon-gamma production, and expansion of natural killer cells. *Cancer Res* **61**, 884-8 (2001).
- Steckel, E.W., Welbaum, B.E., Sodetz, J.M. Evidence of direct insertion of terminal

- complement proteins into cell membrane bilayers during cytolysis. Labeling by a photosensitive membrane probe reveals a major role for the eighth and ninth components. *J Biol Chem* **258**, 4318-24 (1983).
- Street, S.E., Trapani, J.A., MacGregor, D., Smyth, M.J. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* **196**, 129-34 (2002).
- Stepp, S.E., Dufourcq-Lagelouse, R., Le Deist, F., Bhawan, S., Certain, S., Mathew, P.A., Henter, J.I., Bennett, M., Fischer, A., de Saint Basile, G., Kumar, V. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* **286**, 1957-9 (1999).
- Sterry, S.J., Kelly, J.M., Turner, S.J., Carbone, F.R. T cell receptor V alpha bias can be determined by TCR-contact residues within an MHC-bound peptide. *Immunol Cell Biol* **73**, 89-94 (1995).
- Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., Griffiths, G.M. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* **15**, 751-61 (2001).
- Stinchcombe, J.C., Griffiths, G.M. Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 495-517 (2007).
- Stoeckle, C., Gouttefangeas, C., Hammer, M., Weber, E., Melms, A., Tolosa, E. Cathepsin W expressed exclusively in CD8+ T cells and NK cells, is secreted during target cell killing but is not essential for cytotoxicity in human CTLs. *Exp Hematol* **37**, 266-75 (2009).
- Stoka, V., Turk, B., Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB Life* **57**, 347-53 (2005).
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6234-9 (2002).
- Sun, R., Li, A.L., Wei, H.M., Tian, Z.G. Expression of prolactin receptor and response to prolactin stimulation of human NK cell lines. *Cell Res* **14**, 67-73 (2004).
- Sutton, V.R., Waterhouse, N.J., Browne, K.A., Sedelies, K., Ciccone, A., Anthony, D., Koskinen, A., Mullbacher, A., Trapani, J.A. Residual active granzyme B in cathepsin C-null lymphocytes is sufficient for perforin-dependent target cell apoptosis. *J Cell Biol* **176**, 425-33 (2007).
- Sutton, V.R., Vaux, D.L., Trapani, J.A. Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* **158**, 5783-90 (1997).

- 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. *Am J Pathol* **160**, 1807-21(2002).
- Trapani, J.A. Dual mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic lymphocytes. *Int Rev Cytol* **182**, 111-92 (1998).
- Tschopp, J., Masson, D., Stanley, K.K. Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature* **322**, 831-4 (1986).
- Turk, B., Turk, D., Salvesen, G.S. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des* **8**, 1623-37 (2002).
- Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 785-99 (2006).
- Turk, V., Turk, B., Turk, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* **20**, 4629-33 (2001).
- Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M., Turk, B. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem* **379**, 137-47 (1998).
- Uellner, R., Zvelebil, M.J., Hopkins, J., Jones, J., MacDougall, L.K., Morgan, B.P., Podack, E., Waterfield, M.D., Griffiths, G.M. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J* **16**, 7287-96 (1997).
- Urbich, C., Heeschen, C., Aicher, A., Sasaki, K., Bruhl, T., Farhadi, M.R., Vajkoczy, P., Hofmann, W.K., Peters, C., Pennacchio, L.A., Abolmaali, N.D., Chavakis, E., Reinheckel, T., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med* **11**, 206-13 (2005).
- Voskoboinik, I., Smyth, M.J., Trapani, J.A. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* **6**, 940-52 (2006).
- Voskoboinik, I., Thia, M.C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M.J., Trapani, J.A. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem* **280**, 8426-34 (2005).
- Voskoboinik I., Thia M. C., De Bono A., Browne K., Cretney E., Jackson J. T., Darcy P. K., Jane S. M., Smyth M. J. and Trapani J. A. The functional basis for hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with co-inherited missense mutations in the perforin (PFN1) gene. *J Exp Med* **200**, 811-6 (2004).

- von Figura, K., Steckel, F., Conary, J., Hasilik, A., Shaw, E. Heterogeneity in late-onset metachromatic leukodystrophy. Effect of inhibitors of cysteine proteinases. *Am J Hum Genet* **39**, 371-82 (1986).
- Wex, T., Wex, H., Hartig, R., Wilhelmsen, S., Malfertheiner, P. Functional involvement of cathepsin W in the cytotoxic activity of NK-92 cells. *FEBS Lett* **552**, 115-9 (2003).
- Zimmer, J., Andres, E., Hentges, F. NK cells and Treg cells: a fascinating dance cheek to cheek. *Eur J Immunol* **38**, 2942-5 (2008).
- Zhou, W., Tsai, H.M. N-Glycans of ADAMTS13 modulate its secretion and von Willebrand factor cleaving activity. *Blood* **113**, 929-35 (2009).
- Yamazaki, T., Aoki, Y. Cathepsin G enhances human natural killer cytotoxicity. *Immunology* **93**, 115-21 (1998).
- Yodoi J., Teshigawara K., Nikaido T., Fukui K., Noma T., Honjo T., Takigawa M., Sasaki M., Minato N., Tsudo M. and et al. TCGF (IL 2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL 2 receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J Immunol* **134**, 1623-30 (1985).
- Yu C. R., Ortaldo J. R., Curiel R. E., Young H. A., Anderson S. K. and Gosselin P. Role of a STAT binding site in the regulation of the human perforin promoter. *J Immunol* **162**, 2785-90 (1999).
- Yu W. R., Liu T., Fehlings T. K. and Fehlings M. G. Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury. *Eur J Neurosci* **29**, 114-31 (2009).

Kazalo slik (Format: List of)

Slika 1: <i>Funkcija inhibitornih receptorjev celic NK</i> . A: Inhibitorni receptorji celic NK prepoznajo molekule PHK razreda I v kompleksu s peptidom, kar zagotavlja, da celice NK ne napadejo zdravih gostiteljskih celic B: Celice NK se aktivirajo ob stiku z okuženimi celicami, pri katerih je izražanje molekul PHK razreda I zmanjšano. Pri pomanjkanju molekul PHK razreda I inhibitorni receptorji niso udeleženi, so pa udeleženi aktivacijski receptorji. Rezultat je, da celice NK v tem primeru pobijejo okužene celice.	7
Slika 2: <i>Stopnje aktivacije T-limfocitov</i> . Naivne T-celice prepoznajo antigenski peptid vezan na molekulo PHK razreda I na APC (antigenski predstavitevni celici). T-celice se odzovejo, tako da producirajo citokine (npr. IL-2) in izražajo receptorje zanje. Rezultat je klonska ekspanzija T-celic in diferenciacija v različne efektorske funkcije T-celic.	9
Slika 3: <i>Prepoznavanje tarčnih celic pri CTL</i> . CTL izražajo. T-celični receptor (TCR), ki prepozna antigenski peptid na površini tarčne celice. Le-ta je vezan na molekulo PHK razreda I. T-celični receptor prepozna na površini tarčne celice molekulo PHK razreda I in kratki antigenski peptid (9–10 aminokislin), ki sedi na površini molekule PHK razreda I. Celice na ta način lahko predstavijo antigenski peptid, katerega so pridobile z okužbo s paraziti ali virusi ali pri drugih malignih spremembah. Majhni antigenski peptidi se transportirajo v endoplazmatski retikulum (ER), kjer se vežejo z molekulo PHK razreda I in nato transportirajo na površje tarčne celice.....	10
Slika 4: <i>Smrt tarčne celice, sprožena preko sekretornih granul CTL/celic NK</i> . Na sliki je prikazana interakcija T-celičnega receptorja (TCR) CTL z molekulami PHK razreda I in antigenim peptidom na tarčni celici, kar vodi do signalizacije preko fosfoinozitol kinaze 3 (PI3K). Le-ta sproži polarizacijo sekretornih granul ter eksocitozo granularnih toksinov. Pri tem pride do aktivacije Fas receptorja, ki sproži apoptozo v tarčnih celicah, ali pa do sproščanja vsebine sekretornih granul (perforina, grancimov in ostalih komponent), ki v tarčni celici sprožijo celično smrt.	11
Slika 5: <i>Polarizacija sekretornih granul CTL pri stiku s tarčno celico</i> . Imunofluorescenčne slike (zgoraj) in shema (spodaj) prikazujejo stopnje polarizacije mikrotubulov citoskeleta (označen z rdečo na zgornji sliki in s tankimi črnimi linijami na spodnji sliki) ter sekretorne granule (zgoraj zelene, spodaj oranžne) v CTL med tvorbo imunološke sinapse med CTL in tarčno celico. Iz slike je razvidno, da se v odsotnosti tarčnih celic MTOC (mikrotubularni organizacijski center; označen z rdečo) nahaja ob jedru. Ko CTL pride v stik s tarčno celico (b-d), se začnejo mikrotubuli in MTOC polarizirati proti slednji. Sekretorne granule na koncu sprostijo svojo vsebino v sekretorno režo (d).....	12
Slika 6: <i>Model pore, ki jo tvorijo proteini MACPF v lipidnem dvosloju (na osnovi strukture Plu-MACPF, PDB ID: 2QP2)</i>	14
Slika 7: <i>Shematski prikaz funkcionalnih domen perforina</i> . Pri perforinu se najprej odcepi N-terminalni signalni peptid. Signalnemu peptidu sledi litični peptid (pozitivno nabiti N-terminalni peptid). Sledita regiji nizke homologije, katerih vloga še ni znana. Centralni del je amfipatični- α -heliks, domena, ki je zelo podobna proteinom MAC (ang. membrane attack complex), tej regiji pa sledita domena podobna epidermalnemu rastnemu faktorju, ki nima znane vloge pri perforinu in domena C2, ki je pomembna pri citotoksični aktivnosti in vezavi na membrano. Zadnjih 12-20 aminokislin na C-terminalnem delu se proteolitično odcepi pri aktivaciji perforina.	15
Tabela 1 : <i>Seznam trenutno znanih grancimov (s podatki o njihovem specifičnem izražanju in specifičnosti njihovih substratov)</i>	19

- Slika 8: *Predlagani modeli celične smrti sprožene preko CTL/celic NK*. A: Prvi model, ki je bil razvit v osemdesetih, ko je bil perforin prvič izoliran in takrat so tudi odrili membranolične lastnosti perforina. Celica je umrla zaradi porušnja homeostaze plazemske membrane, s čimer je v celico vdrla prekomerna količina vode. B: Ko so ugotovili, da perforin funkcionira skupaj z grancim B, se je model dopolnil. Nova hipoteza je predlagala, da perforin naredi pore, skozi katere grancim B pasivno prehaja v citosol tarčne celice. C: V devetdesetih letih so odkritja predlagala, da grancim B vstopi v tarčno celico z endocitozo neodvisno od perforina. Poleg tega pa perforin v manjših količinah (skupaj z grancimom A in B) inducira hitro apoptozo v tarčni celici; pore perforina naj bi bile premajhne, da bi skozi njih učinkovito prehajali grancimi. Ni pa še bilo pojasnjeno, kako naj bi grancim B prišel iz endosoma v citosol. Domnevalo se je, da naj bi grancim B vstopil preko manoz-6-fosfatnega receptorja. D: Model je podoben prejšnjemu, s tem da predlaga vstop kompleksa seriglicina-perforina-grancima B v endosom.....21
- Slika 9: *In vitro cepitve rekombinantnega mišjega perforina z rekombinatnimi mišjimi katepsini*. Imunodetekcija mišjega perforina s protitelesi P1-8. Rekombinatni mišji perforin smo inkubirali z mišjimi katepsini B, K, L in S v molarnem razmerju 5 : 1 (pfn: katepsin) 25 minut na 37 °C.36
- Slika 10: *Liza ovčjih eritrocitov s perforinom in perforinom, predinkubiranim s katepsini*. Rekombinantni mišji perforin smo inkubirali z rekombinatnimi mišjimi katepsini. Liza ovčjih eritrocitov je potekala 20 minut na 37 °C. Hemoglobin, sproščen iz ovčjih eritrocitov, je bil detektiran kot absorbanca pri 405 nm % lize = (ODvzorec 405 nm – ODspon. 405 nm)/(ODmaxdH₂O – ODspon.405 nm).37
- Slika 11: *Kolokalizacije perforina z lamp-1, PDI, katepsini B, L in S*. Katepsine B, L, S, PDI, Lamp-1 ter perforin v celicah YT smo označili z imunofluorescenco. Uporabili smo specifična monoklonska in poliklonska protitelesa. Katepsine B, L, S, PDI in lamp-1, cistatin F smo označili s primarnimi zajčjimi protitelesi ter sekundarnimi kozjimi (antizajčjimi) protitelesi Alexa Flour TM488 (zelena barva). Perforin smo označili s primarnimi mišjimi protitelesi in sekundarnimi kozjimi (antimišjimi) protitelesi Alexa Flour TM 546 (rdeča barva). Pripravili smo tudi preparate mešanih kultur celic NK-92 in tarčnih celic K562, označenimi s CFSE, v katerih smo nato označili katepsin L ter perforin (kot zgoraj opisano) Celice K562 smo označili z barvilom CFSE. (Slika 11G).....40
- Slika 12: *Inhibicija procesiranja perforina z E-64d, L1 in NH₄Cl v celicah NK*. Imunodetekcija perforina pod redukcijskimi pogoji. A: Celična linija YT. Celice smo gojili v prisotnosti ali odsotnosti E-64d, 30 μM, L1, 20 μM, NH₄Cl, 10 mM in IL-2, 100 U/ml. Na gele SDS-PAGE smo nanegli 100 μg proteina. Imunodetekcija perforina je bila narejena z mišjimi monoklonci: Pf-344; 1-kontrola; 2-kontrola + IL-2; 3-E-64d; 4-E-64d + IL-2; 5-L1; 6-L1 + IL-2; 7-NH₄Cl; 8-NH₄Cl + IL-2. B: Celična linija YT 5. Celice smo gojili v prisotnosti ali odsotnosti E-64d, 20 μM, L1, 10 μM, NH₄Cl, 10 mM. Na SDS-PAGE smo nanegli 50 μg proteina. Imunodetekcija perforina je bila narejena s protitelesi P1-8: 1-kontrola; 2- E-64d; 3- L1; 4- NH₄Cl. C: Celične linije NK-92, YT 5 in KHGY1. Celice smo gojili v prisotnosti ali odsotnosti L1, 20 μM, NH₄Cl, 10 mM. Na SDS-PAGE smo nanegli 100 μg proteina. Imunodetekcija perforina je bila narejena s protitelesi P1-8 : 1-NK-92; 2- NK-92, L1; 3-NK-92, NH₄Cl; 4-YT 5; 5-YT 5, L1; 6-YT 5, NH₄Cl; 7-KHGY1; 8-KHGY1, L1; 9-KHGY1, NH₄Cl.....41
- Slika 13: *Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov in tunikanimicina na procesiranje in N-glikozilacijo perforina*. Celice YT smo gojili v prisotnosti ali odsotnosti E-64d, 20 μM, L1, 10 μM, tunikanimicina, 1 ug/ml in NH₄Cl, 15 mM. Na gele SDS-PAGE smo nanegli 100 μg proteina, imunodetekcija je bila narejena s protitelesi Pfn-344; 1-kontrola; 2-E-64d, 24 h; 3-L1, 24 h; 4-NH₄Cl, 24 h; 5-E-64d, 24 h + tunikanimicin, 8 h; 6-E-64d, 24 h + tunikanimicin, 22h; 7-E-64d, 24 h + tunikanimicin, 22 h + tunikanimicin, 8 h; 8-tunikanimicin, 8 h.43

- Slika 14: *Katepsin L cepi C-terminalni del perforina pri povišanih koncentracijah*. Rekombinantni mišji perforin smo inkubirali z rekombinantnim mišjim katepsinom L v različnih molarnih razmerjih. Koncentracija perforina je bila pri vseh razmerjih perforin (pfn): katepsin L (kat. L) konstantna. A: Imunodetekcija perforina s C-terminalnimi protitelesi (6G7/1F10); 1-pfn, pufer HE; 2-pfn, pufer pH 5.5; 3-pfn: kat. L = 1 : 0.04; 4-pfn: kat. L = 1 : 0.1; 5-pfn: kat. L = 1 : 0.2; 6-pfn : kat. L = 1 : 1; 7-pfn : kat. L + L1 = 1 : 1. B: Imunodetekcija perforina s protitelesi P1-8; 1-pfn, pufer HE; 2-pfn, pufer pH 5.5; 3- pfn : kat. L = 1 : 0.04; 4-pfn : kat. L = 1 : 0.1; 5-pfn : kat. L = 1 : 0.2; 6-pfn : kat. L = 1 : 1; 7-pfn : kat. L + L1 = 1 : 1. C: Imunodetekcija perforina s C-terminalnimi protitelesi (6G7/1F10) (1. dan); 1-pfn, pufer HE; 2-pfn, pufer pH 5.5; 3-pfn : kat. L = 1 : 0.1; 4-pfn : kat. L = 1 : 0.2; 5-pfn : kat. L = 1 : 1; 6-pfn : kat. L + L1 = 1 : 1. D: Imunodetekcija perforina s protitelesi P1-8 (2. dan, membrana C); 1-pfn, pufer HE; 2-pfn, pufer pH 5.5; 3-pfn : kat. L = 1 : 0.1; 4-pfn : kat. L = 1 : 0.2; 5-pfn : kat. L = 1 : 1; 6-pfn : kat. L + L1 = 1 : 1. 45
- Slika 15: *Inhibitorja L1 in E-64d zmanjšata citotoksičnost celic NK-92, kalapastatin pa ne vpliva na citotoksičnost celic NK-92 (merjenje citotoksičnosti s pretočno citometrijo)*. A: Tarčne celice K562 smo označili s barvilom CFSE, na ta način smo jih s pretočnim citometrom analizirali ločeno od celic NK. Efektorske in tarčne celice smo inkubirali 5 ur v ploščah s 96 luknjicami. B: Procent mrtvih celic smo določili tako, da smo celice označili z aneksinom V- PE in PI-jem ter jih nato analizirali s pretočnim citometrom. 47
- Slika 16: *L1 in E-64d zmanjšata citotoksičnost celic NK-92 in YT 5 (detekcija citotoksičnosti z merjenjem sproščanja kroma)*. Celice NK-92 ter celice YT 5 smo inkubirali z inhibitorjema E-64d in L1 pri koncentracijah ter časih, kot so zapisani v legendah ob diagramih. Tarčne celice K562 smo označili z izotopom ^{51}Cr in inkubirali z efektorskimi celicami 4 ure. Podatki, predstavljeni v diagramih, predstavljajo povprečje treh meritev +/- standardna deviacija. A: Kontrolni eksperiment; celice NK-92, inkubirane z enako količino DMSO kot v eksperimentih, kjer smo celice inkubirali z inhibitorji. B: Celice YT 5 smo inkubirali 24 ur ali 24 ur plus 4 ure med citotoksičnim testom z L1. C: Celice NK-92 smo inkubirali 24 ur ali 24 ur plus 4 ure med citotoksičnim testom z L1. D: Celice NK-92 smo inkubirali 24 ur ali 2 ure z L1, 24 ur z E-64d in kontrolni eksperiment z EGTA. E: Procent inhibicije citotoksičnosti celic NK-92 iz diagramov C ter D, izračunan iz vrednosti % specifičnega sproščanja izotopa ^{51}Cr pri vsakem E/T razmerju; % inhibicije = (kontrola - vzorec)/kontrola \times 100. 49
- Slika 17: *Inhibitorja E-64d in L1 blokirata aktivnost katepsinov*. Celice NK-92 ter celice YT 5 smo pustili netretirane in tretirane z inhibitorji 24 ur. Celične lizate celic NK smo uporabili za merjenje katepsinske aktivnosti s flourogenim substratom z-Phe-Arg-AMC, kot je opisano v metodah. A: Celice NK-92, inkubirane z inhibitorjema E-64d in L1. B: Celice YT 5, inkubirane z inhibitorjema E-64d in L1. 50
- Slika 18: *Inhibitor L1 ne vpliva na aktivnost grancimov A, B in H v celicah NK-92*. Celice NK-92 so bile 24 ur tretirane ali netretirane z L1. A: Triptazno aktivnost (grancim A) smo določili s cepitvijo substrata BLT. B: Aspazno aktivnost smo izmerili preko hidrolize peptidnega estra substrata Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl, ki ga specifično cepi grancim B. C: Kimazno aktivnost (grancim H) smo izmerili s cepitvijo substrata Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl. Podani rezultati so bili ponovljeni vsaj trikrat in so povprečje treh meritev +/-SEM. D: Imunodetekcija grancima B v vseh treh celičnih linijah. E: Imunodetekcija grancima H v vseh treh celičnih linijah. 51
- Slika 19: *Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov E-64d in L1 na citotoksičnost OT-1 dt (B6) CTL*. A: Citotoksičnost mišjih OT-1 CTL, inkubiranih z E-64d. Liza s ^{51}Cr označenimi in s peptidom SINFEKL stimuliranimi tarčnimi celicami EL4 z OT-1 dt - divji tip - (B6) CTL. OT-1 dt (B6) CTL so bili inkubirali z inhibitorjem E-64d, časi inkubacij so napisani ob diagramih. Rezultati, ki so podani v diagramih, predstavljajo povprečje triplikatov +/- S.D. Poskusi so bili ponovljeni vsaj trikrat. B: Procent inhibicije citotoksičnosti OT-1 dt(B6) CTL z E-64d (diagram A), izračunan iz vrednosti procenta specifičnega sproščanja izotopa ^{51}Cr pri vsakem razmerju E/T; % inhibicije = (kontrola - vzorec)/kontrola \times 100. C: Citotoksičnost mišjih OT-1 CTL, inkubiranih z L1. Liza s ^{51}Cr označenimi in s peptidom SIINFEKL stimuliranimi tarčnimi celicami EL4 z OT-1 dt (B6) CTL. OT-1 dt (B6) CTL so bili tretirani z inhibitorjem L1, časi inkubaciji so napisani ob diagramih. Rezultati, ki so podani v diagramih, predstavljajo povprečje triplikatov +/- S.D. Poskusi so bili ponovljeni vsaj trikrat. D: Procent inhibicije citotoksičnosti OT-1 dt(B6) CTL z L1 (diagram C), izračunani iz vrednosti procenta specifičnega sproščanja izotopa ^{51}Cr pri vsakem razmerju E/T; % inhibicije = (kontrola - vzorec) / kontrola \times 100. 53

- Slika 20: *Fenotipizacija CTL miši divjega tipa in katepsin L ničelnih miši*. Tretji dan po žrtvovanju miši ter aktivaciji splenocitov z LPS in s peptidom SIINFEKL ter očiščenju populacije centrifugiranjem v gradientom Ficoll smo preverili aktivacijo CTL. Le-te smo označili z aktivacijskimi markerji CD19 in CD69 ter preverili prisotnost receptorja OT-1 ($V\alpha 2$), prisotnost receptorja CD8⁺ in odsotnost receptorja CD4⁺. Vse eksperimente smo naredili tako, da smo CTL inkubirali s protitelesi, ki prepoznajo posamezne receptorje, ter vzorce nato analizirali s pretočnim citometrom.56
- Slika 21: *Citotoksičnost OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši*. Liza s ⁵¹Cr označenimi in s peptidom SIINFEKL stimuliranimi tarčnimi celicami EL4 s CTL iz OT-1 transgene miši z izbitim genom za katepsin L (KatL^{-/-}), singensko OT-1 miš divjega tipa (KatL^{+/+}) in OT-1 miši divjega tipa po 4 urah. Rezultati predstavljajo povprečje več meritev. Poskusi so bili ponovljeni vsaj trikrat. A: Citotoksičnost OT-1 CTL tretji dan aktivacije, Kat L^{-/-} (n = 4), Kat L^{+/+} (n = 2), DT (n = 2). B: Citotoksičnost OT-1 CTL četrti dan aktivacije, Kat L^{-/-} (n = 4), Kat L^{+/+} (n = 2) DT (n = 2). C: Citotoksičnost OT-1 CTL; povprečje tretjega in četrtega dneva aktivacije skupaj. Cat L^{-/-} (n = 4), Cat L^{+/+} (n = 2) DT (n = 2) ter citotoksični test z nepulziranimi celicami EL4.57
- Slika 22: *Inhibicija citotoksičnosti OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši in miši divjega tipa inkubiranih z E-64d in L1*. Liza s ⁵¹Cr označenimi in s peptidom SIINFEKL stimuliranimi tarčnimi celicami EL4 z OT-1 CTL iz (dt ali katepsin L^{-/-}) po 4 urah. CTL so bili tretirani z inhibitorjema E-64d in L1 pri koncentracijah in časih, kot so napisani ob diagramu. Rezultati predstavljajo povprečje triplikatov +/- S.D. A: Citotoksični test divjega tipa OT-1 CTL z inhibitorjema. B: Citotoksični test OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši z inhibitorjema. C: Procent inhibicije citotoksičnosti, izračunan iz vrednosti procenta specifičnega sproščanja izotopa ⁵¹Cr pri vsakem razmerju E/T; % inhibicije = (kontrola – vzorec)/kontrola × 100.....59
- Slika 23: *Degranulacija mišjih OT-1 CTL divjega tipa, tretiranih z inhibitorjema E-64d in L1, ter degranulacija OT-1 CTL katepsin L ničelnih miši*. OT-1 CTL smo dodali tarčnim celicam EL4, stimuliranimi s peptidom SIINFEKL, EG7 in EL4 (efektorske celice OT-1 CTL : tarčne celice = 2 : 1) v prisotnosti protitelesa CD107 ter golgi stopom (blokira recikliranje sekretornih granul). Po inkubaciji smo dodali protitelesa CD8⁺. A: OT-1 CTL tretirani ali netretirani z inhibitorji 24 ur. B: OT-1 CTL (dt(B6), KatL^{-/-}, KatL^{+/+}). * Poleg tarčnih celic EL4 stimuliranih s peptidom SIINFEKL smo uporabili tarčne celice EG7ova, ki nam jih ni bilo treba predhodno stimulirati s peptidom SIINFEKL, ker le-tega izražajo.61
- Slika 24: *Aktivnost katepsinov v lizatih OT-1 CTL miši divjega tipa in katepsin L ničelnih miši*. Merili smo cepitev fluorogenega substrata z-Phe-Arg-Amc pri pH 5.5. v lizatih OT-1 CTL (dt(B6), KatL^{-/-}, KatL^{+/+}), kot je opisano v metodah in materialih. Meritve smo ponovili vsaj trikrat.62
- Slika 25: *Priprava primarnih celic NK katepsin L ničelnih miši in miši divjega tipa*. Ocena čistosti populacije z markerji za OT-1 CTL (označevanje $V\alpha 2$ in CD8⁺) ter za celice NK (označevanje NK1.1) pred in po negativni selekciji na koloni MACS.63
- Slika 26: *Citotoksičnost celic NK miši divjega tipa in katepsin L ničelnih miši*. Liza s ⁵¹Cr označenimi tarčnimi celicami YAC-1 s celicami NK (dt (B6), KatL^{-/-}, KatL^{+/+}). Citotoksični testi so bili narejeni tretji in četrti dan po aktivaciji. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev.64
- Slika 27: *Citotoksičnost celic NK miši divjega tipa in celic NK katepsin L ničelnih miši, inkubiranih z E-64d in L1*. Liza s ⁵¹Cr označenimi celicami YAC-1 s celicami NK miši divjega tipa in katepsin L ničelnih miši. Celice NK so bile inkubirane 24 ur z inhibitorjema E-64d in L1. Rezultati predstavljajo povprečje triplikatov +/- S.D.65
- Slika 28: *Inhibicija procesiranja perforina z inhibitorjema cisteinskih katepsinov L1 in E-64d*. v celicah NK miši singenega divjega tipa in katepsin L ničelnih miši. Imunodetekcija perforina s protitelesi P1-8 in 6G7/1F10 v celicah NK (KatL^{-/-}, KatL^{+/+}). Na oba gela smo nanegli identična vzorca. Prva membrana je bila razvita s protitelesi P1-8, druga membrana pa s 6G7/1F10.66

- Slika 29: *Vpliv inhibitorjev cisteinskih katepsinov E-64d in L1 na transficiran perforin v OT-1 CTL perforin ničelnih miši in celice RBL.* A: Imunodetekcija perforina s protitelesi za C-terminalnimi del perforina (6G7/1F10) v transficiranih celicah RBL z mišjim perforinom, inkubiranim 24 ur z E-64d, 20 μ M. B: Imunodetekcija perforina s protitelesi P1-8 na membrani A, naslednji dan. C: Liza s 51 Cr-označenimi in s peptidom SIINFEKL stimuliranimi tarčnimi celicami EL4 s transficiranim človeškim perforinom v OT-1 CTL, perforin ničelnih miši, ki so bili inkubirani 24 ur z L1. Rezultati predstavljajo povprečje triplikatov +/- S.D. 69
- Slika 30: *Vpliv IL-2 na aktivnost katepsinov v celicah YT in izražanje perforina v mišjih celicah NK* A: Cepitev fluorogenega substrata z-Phe-Arg-AMC pri pH 5.5 v celicah YT, stimuliranih in nestimuliranih z IL-2, kot je opisano v metodah in materialih. B: Označevanje aktivnega mesta katepsinov s probo DCG-04 v celicah YT, stimuliranih in nestimuliranih z IL-2 100 U/ml, kot je opisano v metodah in materialih. Na gel je naneseo po 50 μ g proteina (v vsaki liniji). C: Ekspresija perforina v mišjih celicah NK po različnih dnevih aktivacije. Na gel je naneseo po 25 μ g proteina (v vsaki liniji). 70
- Slika 31: *Kolokalizacija cistatina F in perforin v celicah YT.* Cistatin F in perforin v celicah YT smo označili z imunofluorescenco. Perforin smo označili s primarnimi mišjimi protitelesi in sekundarnimi kozjimi (antimišjimi) protitelesi Alexa Flour TM 546 (rdeča barva). Cistatin F smo označili s primarnimi zajčjimi protitelesi ter sekundarnimi kozjimi (antizajčjimi) protitelesi Alexa Flour TM488 (zelena barva). Kolokalizacija med cistatinom F in perforinom se vidi kot rumene lise. Slike so bile posnete pri enakih nastavitvah, tako da lahko nivo cistatina F v nestimuliranih in nestimuliranih primerjamo. Slike smo ponovili vsaj trikrat. Merilo na slikah je 10 μ m. A: Nestimulirane celice YT B: IL-2 stimulirane celice YT. 71
- Slika 32: *Vezava stefina B na histone poveča inhibicijo stefina B na katepsin L* A: Histoni ne inhibirajo katepsina L. Katepsin L (21,5 nM) smo inkubirali z različnimi koncentracijami histonov. Rezultati so podani kot povprečje vsaj treh neodvisnih eksperimentov. B: Dodatek histonov je povečal inhibitorno aktivnost stefina B na katepsin L. Stefin B (15 nM) smo predinkubirali z različnimi koncentracijami histonov (10,8–2,15 μ M), nato smo dodali katepsin L (21,5 nM). Rezultati predstavljajo povprečje vsaj treh neodvisnih eksperimentov. 73
- Slika 33: *Kolokalizacija serpina A3G in katepsina L v mišjih makrofagih RAW 264.7.* Serpin A3G in katepsin L smo v mišjih makrofagih RAW 264,7 označili z imunofluorescenco. Katepsin L smo označili s primarnimi mišjimi protitelesi in sekundarnimi kozjimi (antimišjimi) protitelesi Alexa Flour TM 546 (rdeča barva). Serpin A3G smo označili s primarnimi zajčjimi protitelesi ter sekundarnimi kozjimi (antizajčjimi) protitelesi Alexa Flour TM488 (zelena barva). Kolokalizacija med katepsinom L in serpinom A3G se vidi kot rumene lise. Slike smo ponovili vsaj trikrat. Merilo na slikah je 10 μ m. Celice smo pustili nestimulirane (A) ali inkubirane z 300 UI/ml IFN- γ preko noči, naslednji dan pa smo jim dodali še z 100ng/ml LPS (18 h) (B). 74

