

VLOGA ZUNAJCELIČNIH CISTEINSKIH PROTEAZ PRI PROCESIRANJU MEMBRANSKIH PROTEINOV

Katarina Hočevar

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija

Mentor: prof. ddr. Boris Turk, Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, Ljubljana, Slovenija

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. dr. Marko Fonović, predsednik, MPŠ in Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39,
Ljubljana, Slovenija

doc. dr. Nataša Kopitar Jerala, članica, MPŠ in Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39,
Ljubljana, Slovenija

prof. dr. Ana Plemenitaš, članica, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg
2, Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Katarina Hočevar

VLOGA ZUNAJCELIČNIH CISTEINSKIH PROTEAZ
PRI PROCESIRANJU MEMBRANSKIH PROTEINOV

Doktorska disertacija

ROLE OF EXTRACELLULAR CYSTEINE PROTEASES
IN THE PROCESSING OF MEMBRANE PROTEINS

Doctoral Dissertation

Mentor: prof. ddr. Boris Turk

Ljubljana, Slovenija, avgust, 2020

Zahvala

Zahvala vsem, ki so prispevali k izdelavi tega dela.

Za strokovno pomoč in vodstvo se zahvaljujem:

- mentorju prof. ddr. Borisu Turku,
- članom komisije prof. dr. Marku Fonoviću, doc. dr. Nataši Kopitar Jerala in prof. dr. Ani Plemenitaš,
- sodelavcem na Odseku B1: dr. Barbari Sobotič, dr. Nežki Kavčič, dr. Janji Božič, Moniki Biasizzo, dr. Tini Zavašnik-Bregant ter dr. Mateju Vizovišku,
- raziskovalni skupini na Odseku za Mikrobiologijo, Fakulteti za biokemijo, biofiziko in biotehnologijo na Jagiellonski fakulteti v Krakovu na Poljskem: prof. dr. Janu Potempi, dr. Joanni Kozieł, dr. Alicii Wong ter dr. Izabeli Ciastoń,
- Barbari Potempa iz Centra za oralno zdravje in sistemske bolezni, Univerze v Louisville, Kentucky, ZDA
- Vsem prostovoljcem, ki so darovali kri za izolacijo seruma.

Za financiranje se zahvaljujem:

- Agenciji za Raziskovanje Republike Slovenije
- Javnemu skladu za razvoj kadrov in štipendije Republike Slovenije
- Slovenskemu biokemijskemu društvu

Za moralno podporo se zahvaljujem:

- možu Roku
- staršem in prijateljem

Povzetek

Šeding ali procesiranje zunajceličnih membranskih proteinov je pojem, ki dobiva vedno več pozornosti. Sprva je veljalo, da so tega sposobne le določene metalo-proteaze, dandanes pa je vedno več različnih proteaz, vključno s cisteinskimi proteazami, ki jih uvrščamo med šedaze. Med drugim imajo te lastnosti tudi cisteinski katepsini, posebno katepsina L in S, ki ju v tumorsko mikrookolje izločajo tako tumorske celice, kot tudi imunske in druge celice, ki so se infiltrirale v stromo tumorja.

Opazili smo, da delovanje katepsinov L in S vpliva na aktivacijo komplementnega sistema na površini tumorskih celic. Po tretiranju celic s katepsinomoma je bila aktivacija komplementa znižana. Zanimalo nas je, na katero pot in katero stopnjo aktivacije komplementa katepsina najbolj vplivata in kateri so njuni fiziološki substrati. Ugotovili smo, da je zaradi šedinga katepsina L in S najbolj prizadeta klasična pot aktivacije komplementa in da je glavna tarčna molekula v tej kaskadi C1q. To je prva in prepoznavna molekula klasične poti aktivacije komplementnega sistema. Z nadaljnjimi eksperimenti smo pokazali, da je potencialni vezavni partner C1q adhezijska molekula CD44 in da je šeding le-te tisti korak, zaradi katerega je aktivacija komplementa zmanjšana. Predpostavljamo, da se po odcepitvi CD44 z membrane na odcepljenem fragmentu izpostavijo kriptična mesta, ki vežejo C1q z izredno veliko afiniteto, kar onemogoči nadaljnjo aktivacijo komplementa. S tem smo predstavili nov način obrambe tumorskih celic pred imunskim sistemom.

Poleg katepsinov smo se ukvarjali tudi s cisteinskimi proteazami bakterijskega izvora – z gingipaini, ki jih izločajo patogene bakterije *Porphyromonas gingivalis*, povzročiteljice paradontalne bolezni. Predvidevali smo, da so tudi gingipaini šedaze in da s proteolizo površinskih proteinov deregulirajo aktivacijo komplementnega sistema. Vendar pa smo ugotovili, da gingipaini cepijo predvsem adhezijske molekule, regulatorjev komplementnega sistema pa nismo identificirali kot gingipainske substrate. V primeru gingipainskih cepitev zunajceličnih membranskih proteinov smo opazili, da je šeding le prvi korak v procesu razgradnje. Obsežnost šedinga oz. razgradnje je odvisna od koncentracije gingipainov, kar je povezano z napredovanjem bolezni. V začetni fazi paradontalne bolezni, je gingipainov in bakterij *P. gingivalis* v ustni votlini malo, zato je tudi cepitev zunajceličnih substratov malo in šeding lahko opazimo. Ko pa se bolezen razvije dalje in je koncentracija gingipainov višja, prevlada nespecifična razgradnja membranskih proteinov. Na ta način gingipaini onemogočijo imunski sistem, spremenijo regulatorne in signalizacijske poti ter verjetno sprožijo anoikis, programirano celično smrt gostiteljskih epiteljskih celic, ki je posledica izgube stika s sosednjimi celicami. Posebno slednja ima verjetno velik pomen, saj je bila večina identificiranih substratov gingipainov v naših eksperimentih ravno adhezijskih molekul. Hkrati pa je eden izmed glavnih simptomov in posledica paradontalne bolezni ravno razgradnja dlesničnega tkiva, ki je v veliki meri lahko posledica anoikisa.

Abstract

Processing of extracellular membrane proteins also known as ectodomain shedding is a biochemical process that has recently started getting increasing attention. Initially, it was believed that only metalloproteases were able to act as sheddases, but nowadays there are more and more proteases, including cysteine proteases and gingipains, which are recognized as sheddases.

Among others, cysteine cathepsins, especially cathepsins L and S, can act as sheddases under special circumstances, i.e. when released into extracellular milieu. In the tumor microenvironment, both cathepsins are secreted by tumor cells, as well as by immune and other cells that have infiltrated into the tumour stroma. We observed that cathepsin L affects the activation of the complement system on the surface of tumor cells. After treatment with the enzyme, complement activation on the surface of breast cancer tumour cells was reduced. Our aim was therefore to determine which pathway of complement activation is the most affected by the cathepsins and at what step of this pathway it has the biggest effect. Furthermore, we wanted to identify the physiological substrates of cathepsin L that are responsible for reduction of complement activation. We found out that shedding of cathepsin L and S predominantly affects the classical pathway of complement activation. Moreover, the main target molecule in this cascade is C1q. This is the most upstream molecule of the classical pathway of activation, which is responsible for recognition of non-self cells. Further experiments have shown that the binding partner of C1q is the adhesion molecule CD44 and that its shedding is a step in which the complement activation is reduced. We proposed that after shedding of CD44, the cleaved fragment exposes some cryptic sites that bind C1q with an affinity, thereby preventing further activation of the complement although C1q can also bind to CD44 on intact cells. We further suggest that this is a new way how tumour cells evade the immune system.

In addition to cathepsins, we also worked with cysteine proteases of bacterial origin - gingipains secreted by the pathogenic bacteria *Porphyromonas gingivalis*, the causative agent of periodontitis. It was assumed that gingipains were also sheddases and that the proteolysis of surface proteins dysregulated the activation of the complement system. However, it turned out that gingipains mostly cleave adhesion proteins, while we could not identify any complement regulators as gingipain substrates. It should be noted that gingipain shedding is only the first step in the process of degradation of extracellular membrane proteins. The extent of shedding or degradation depends on the concentration of gingipains, which is associated with the progression of the disease. In the initial phase of the periodontitis, the concentration of gingipains and *P. gingivalis* bacteria is low in the oral cavity, which is why the processing of extracellular substrates is limited and shedding can be observed. However, when the disease develops and the concentration of gingipains is higher, the unregulated degradation of membrane proteins prevails. In this way, gingipains dysregulate the immune system and regulatory and signaling pathways, and trigger anoikis, programmed cell death of host epithelial cells, resulting from the loss of contacts with adjacent cells. In particular, the latter is probably of great significance, since most of the identified gingipain substrates in our experiments were adhesion molecules. At

the same time, one of the main symptoms and the consequence of periodontitis is the destruction of soft gum tissue and alveolar bone in later stages, which can largely be due to anoikis.

Kazalo

Zahvala.....	vii
Povzetek.....	ix
Abstract	xi
Kazalo	xiii
Slike.....	xvii
Tabele.....	xix
Kratice	xxi
Standardne oznake aminokislin.....	xxv
1 Uvod.....	1
1.1 IMUNSKI SISTEM	1
1.1.1 Komplementni sistem.....	2
1.1.1.1 Klasična pot aktivacije komplementa	2
1.1.1.2 Lektinska pot aktivacije komplementa	5
1.1.1.3 Alternativna pot aktivacije komplementa.....	6
1.1.1.4 Posledice aktivacije komplementa.....	8
1.1.1.5 Regulatorji komplementa.....	9
1.2 PROTEAZE.....	11
1.2.1 Procesiranje zunajceličnih domen membranskih proteinov ali šeding	12
1.2.2 Serinske proteaze.....	14
1.2.3 Cisteinske proteze	14
1.2.3.1 Mehanizem delovanja cisteinskih proteaz	15
1.2.3.2 Cisteinski katepsini.....	15
1.2.3.2.1 Struktura in substratna specifičnost katepsina L.....	16
1.2.3.2.2 Fiziološka vloga cisteinskih katepsinov	18
1.2.3.2.3 Rak	19
1.2.3.2.4 Tumorsko mikrookolje	20
1.2.3.2.5 Vloga imunskega sistema in komplementa pri raku.....	21
1.2.3.2.6 Cisteinski katepsini v tumorskem mikrookolju	23
1.2.3.2.7 Cisteinski katepsini in komplement	25
1.2.3.2.8 Cisteinski katepsini kot šedaze	25
1.2.3.3 Gingipaini	26
1.2.3.3.1 Paradontalna bolezen	26

1.2.3.3.2	Gingipain RgpB	28
1.2.3.3.3	Gingipain HRgpA	28
1.2.3.3.4	Gingipain Kgp.....	29
1.2.3.3.5	Fiziološka vloga gingipainov.....	30
1.2.3.3.6	Gingipaini in komplementni sistem.....	31
1.2.3.3.7	Gingipaini kot šedaze	33
2	Namen dela in hipotezi	35
2.1	NAMEN DELA	35
2.2	HIPOTEZI	35
3	Materiali in metode	37
3.1	MATERIALI	37
3.1.1	Kemikalije	37
3.1.2	Pufri	38
3.1.3	Proteaze.....	41
3.1.4	Inhibitorji	41
3.1.5	Protitelesa	41
3.1.6	Serum	42
3.1.7	Celične linije.....	42
3.1.8	Gojišča za celice.....	42
3.1.9	Bakterije.....	42
3.1.10	Gojišča za bakterije	42
3.1.11	Predpripravljeni reagenti.....	42
3.1.12	Laboratorijska oprema.....	43
3.2	METODE	44
3.2.1	Gojenje celičnih linij	44
3.2.2	Odtajanje celic.....	44
3.2.3	Precepljanje celic in štetje živih celic.....	44
3.2.4	Zamrzovanje celic	45
3.2.5	Določanje deleža živih oz. apoptotskih celic	45
3.2.6	Gojenje anaerobnih bakterij	46
3.2.7	Odtajanje anaerobnih bakterij.....	46
3.2.8	Precepljanje anaerobnih bakterij	46
3.2.9	Izolacija seruma	46
3.2.10	Določanje celotne proteinske koncentracije	47
3.2.11	Meritev aktivnosti in aktivne koncentracije proteaz.....	47
3.2.12	Elektroforeza NaDS-PAGE	49
3.2.13	Prenos po Westernu in imunodetekcija	49
3.2.14	Tretiranje celic s katepsini in serumom	50
3.2.15	Imuno-označevanje celic	50
3.2.16	Pretočna citometrija	51
3.2.17	Afinitetna kromatografija	52
3.2.18	Priprava celičnega lizata.....	52

3.2.19	Vezava biotiniliranega proteina C1q na streptavidinske magnetne kroglice.....	52
3.2.20	Diferenciacija celične linije U-937 v makrofage	53
3.2.21	Priprava sekretoma makrofagov.....	53
3.2.22	Tretiranje celic z gingipaini.....	53
3.2.23	Tretiranje celic z bakterijami	53
3.2.24	Svetlobna mikroskopija s CO ₂ komoro	54
3.2.25	Masna spektrometrija.....	54
3.2.25.1	Priprava vzorca za masno spektrometrijo.....	54
3.2.25.2	Analiza vzorcev na masnem spektrometru.....	55
3.2.25.3	Analiza rezultatov z masne spektrometrije.....	56
4	Rezultati.....	57
4.1	VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI AKTIVACIJI KOMPLEMENTA NA POVRŠINI TUMORSKIH CELIC	57
4.1.1	Vpliv posameznih cisteinskih katepsinov na aktivacijo komplementa.....	57
4.1.2	Vpliv koncentracije katepsina L na aktivacijo komplementa	58
4.1.3	Vpliv katepsina L na aktivacijo komplementa je neodvisen od vrste tumorskih celic	59
4.1.4	Katepsin L najbolj vpliva na aktivacijo klasične poti aktivacije komplementa.....	59
4.1.5	Katepsin L vpliva že na vezavo C1q na celice	61
4.1.6	Identifikacija vezavnih partnerjev C1q	62
4.1.7	Sekretom makrofagov tudi zniža aktivacijo komplementa	63
4.2	VPLIV BAKTERIJSKIH PROTEAZ GINGIPAINOV NA POVRŠINO EPITELIJSKIH CELIC.....	65
4.2.1	Vpliv <i>P. gingivalis</i> na viabilnost celic TIGK.....	65
4.2.2	Višje koncentracije bakterij povzročijo prekomerno razgradnjo proteinov.....	66
4.2.3	Masnospektrometrična analiza šedomov TIGK, tretiranih z bakterijami <i>P. gingivalis</i>	67
4.2.4	Vpliv izoliranih gingipainov na viabilnost in adhezivnost celic TIGK	69
4.2.5	Določitev zunajceličnih membranskih substratov gingipainov	72
4.2.5.1	Tretiranje TIGK celic s 4 nM in 75 nM RgpB	72
4.2.5.2	Tretiranje TIGK celic s 4 nM in 75 nM HRgpA	75
4.2.5.3	Tretiranje TIGK celic s 4 nM in 75 nM Kgp.....	79
4.2.5.4	Povzetek rezultatov tretiranja TIGK celic z gingipaini	83
4.2.6	Potrditve gingipainskih cepitev proteina TFRC	86
4.2.7	Strukturne in funkcijske podobnosti identificiranih gingipainskih tarč	87
5	Razprava	89
5.1	CISTEINSKI KATEPSINI VPLIVAJO NA AKTIVACIJO KOMPLEMENTA.....	89
5.2	GINGIPAINI VPLIVAJO NA ADHEZIJO DLESNIČNIH EPITELIJSKIH CELIC.....	92
6	Zaključek	99

Literatura	101
Bibliografija	119
Biografija	121

Slike

Slika 1: Shematski prikaz konformacijskih sprememb ob aktivaciji molekule C1.....	3
Slika 2: Shematski prikaz aktivacije klasične poti aktivacije komplementa.....	4
Slika 3: Tvorba kompleksa MAC in posledična liza celice.....	5
Slika 4: Primerjava kompleksa C1 in kompleksa MBL-MASP.....	6
Slika 5: Shematski prikaz spontane aktivacije C3 na začetku alternativne poti.....	7
Slika 6: Shematski prikaz Schechter-Bergerjevega poimenovanja.....	11
Slika 7: Shematski prikaz šedinga.....	12
Slika 8: Shematski prikaz mehanizma cisteinskih proteaz.....	15
Slika 9: Struktura katapsina L.....	17
Slika 10: iceLogo predstavitev substratne specifičnosti za katapsin L.....	17
Slika 11: Glavne značilnosti rakavih celic.....	19
Slika 12: Raznolikost celic v tumorskem mikrookolju.....	20
Slika 13: Dvojno delovanje komplementa na tumorje.....	21
Slika 14: Shematski prikaz imuno-urejanja.....	22
Slika 15: Celice tumorskega mikrookolja in katapsini, ki jih te celice izločajo.....	23
Slika 16: Razvoj paradontalne bolezni.....	27
Slika 17: Kristalna struktura gingipaina RgpB.....	28
Slika 18: Prikaz genskega zapisa gingipainov.....	29
Slika 19: Struktura katalitične domene Kgp.....	30
Slika 20: Shema aktivacijskih poti komplementa z označenimi mesti, kjer lahko gingipaini posredujejo in se vmešajo.....	32
Slika 21: Graf odvisnosti hitrosti od koncentracije inhibitorja.....	48
Slika 22: Shema pretočnega citometra.....	51
Slika 23: Delež vezanega C3b na površino tumorskih celic po tretiranju z različnimi proteazami.....	58
Slika 24: Vpliv koncentracije katapsina L na vezavo C3b na površino tumorskih celic.....	58
Slika 25: Delež vezanega C3b po tretiranju različnih celičnih linij z 0,2 M katapsinom L.....	59
Slika 26: Delež vezanega C3b na površino tumorskih celic po blokadi lektinske in/ali klasične poti aktivacije komplementa.....	60
Slika 27: Delež vezanega C3b na površino celic pri nižjih koncentracijah seruma.....	61
Slika 28: Razlike med količino vezave različnih komponent komplementnega sistema na površino tumorskih celic.....	61
Slika 29: Graf odvisnosti hitrosti proteolitske reakcije od koncentracije inhibitorja.....	63
Slika 30: Western blot sekretoma makrofagov.....	63
Slika 31: Delež vezanega C3b na površino tumorskih celic po tretiranju s sekretomom makrofagov.....	64

Slika 32: Delež živih celic TIGK po tretiranju z različnimi sevi in različnimi koncentracijami <i>P. gingivalis</i>	65
Slika 33: Gel po NaDS elektroforezi, pobarvan z barvilom Coomassie modro kaže količino proteinov v posameznem šedomu.....	66
Slika 34: Število identificiranih proteinov na masnem spektrometru v posameznem vzorcu, pripravljenem po postopku »in-gel«.....	67
Slika 35: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali z W83, MOI 100. Priprava po postopku »in-solution«.....	67
Slika 36: Gel sekretomov celic TIGK po inkubaciji z bakterijami <i>P. gingivalis</i> v razmerju MOI 25 in 100, pobarvan s srebrom.....	69
Slika 37: Spremljanje delovanja gingipainov na konfluentne celice TIGK pod svetlobnim mikroskopom.....	70
Slika 38: Spremljanje delovanja gingipaina Kgp na konfluentne celice TIGK pod svetlobnim mikroskopom.....	71
Slika 39: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 75 nM RgpB.....	72
Slika 40: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 4 nM RgpB.....	73
Slika 41: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 75 nM HRgpA.....	75
Slika 42: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 4 nM HRgpA.....	76
Slika 43: Presečni diagram skupnih substratov gingipainov RgpB in HRgpA.....	78
Slika 44: Graf hitrosti razgradnje kromogenih substratov gingipainov Kgp in RgpB pri enaki koncentraciji.....	79
Slika 45: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 4 nM Kgp.....	80
Slika 46: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 75 nM Kgp.....	81
Slika 47: Aminokislinske sekvence izbranih proteinov.....	85
Slika 48: Imunološka detekcija na Western blotu za Transferin receptor protein-1 v šedomu celic TIGK.....	86
Slika 49: Stolpčni diagram deležev posameznih zvitij oz. domen, prisotnih v vseh gingipainskih tarčah, ki smo jih uspeli identificirati z masno spektrometrijo.....	87
Slika 50: Graf deleža proteinov z določeno vezavo na membrano.....	87
Slika 51: Grafični povzetek delovanja gingipainov na površino gostiteljskih celicah.....	97

Tabele

Tabela 1: Pregled regulatorjev komplementa.....	9
Tabela 2: Seznam cisteinskih katepsinov in njihove peptidazne aktivnosti.....	16
Tabela 3: Seznam cisteinskih katepsinov, njihove lokacije v organizmu ter njihove fiziološke funkcije.....	18
Tabela 4: Seznam gingipainov.....	26
Tabela 5: Vzorci, substrati in način meritve aktivne koncentracije encimov.	48
Tabela 6: Sestava poliakrilamidnih gelov.	49
Tabela 7: Statistična vrednost P in pripadajoča oznaka na grafu.	52
Tabela 8: Seznam potencialnih vezavnih partnerjev za C1q, identificiranih z masno spektrometrijo.	62
Tabela 9: Število identificiranih proteinov v vzorcu sekretoma celic TIGK po tretiranju zW83 in pripravljenem po »in-solution« metodi glede na razmerje spektralnega štetja.	68
Tabela 10: Razporeditev identificiranih proteinov ($SCR \geq 3$) glede na njihovo celično lokalizacijo.	68
Tabela 11: Seznam potencialnih tarč gingipainov v sekretomu/šedomu celic TIGK inkubiranih z W83, MOI 100.....	68
Tabela 12: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 75 nM RgpB.....	72
Tabela 13: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 75 nM RgpB) v večjem številu.....	73
Tabela 14: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 4 nM RgpB.....	73
Tabela 15: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 4 nM RgpB) v večjem številu.....	74
Tabela 16: Seznam potencialnih tarč 4 nM gingipaina RgpB na površini celic TIGK.....	74
Tabela 17: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 75 nM HRgpA.	75
Tabela 18: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 75 nM HRgpA) v večjem številu.....	76
Tabela 19: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 4 nM HRgpA.....	76
Tabela 20: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 4 nM HRgpA) v večjem številu.....	77
Tabela 21: Seznam potencialnih membranskih tarč 4 nM HRgpA.	77
Tabela 22: Seznam skupnih tarč gingipainov HRgpA in RgpB.	78
Tabela 23: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 4 nM Kgp.....	80

Tabela 24: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 4 nM Kgp) v večjem številu.	80
Tabela 25: Seznam potencialnih membranskih tarč 4 nM Kgp.	81
Tabela 26: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 75 nM Kgp.	82
Tabela 27: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 75 nM Kgp) v večjem številu.	82
Tabela 28: Seznam potencialnih membranskih tarč 75 nM Kgp.	82
Tabela 29: Seznam membranskih proteinov, ki so bili identificirani s 4 nM RgpB, HRgpA in Kgp.	83
Tabela 30: GO anotacije vseh identificiranih proteinov.	88

Kratice

Ac-Lys-pNA	...	acetil-lizil-4-nitroanilid HCl
ACN	...	acetonitril
ADAM	...	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i> , dezintegrin in metaloproteaza
ALCAM	...	<i>Activated leukocyte cell adhesion molecule</i> , aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo
APP	...	<i>amiloid precursor protein</i> , prekuzorski protein amiloida
APS	...	amonijev persulfat
BCAM	...	<i>basal cell adhesion molecule</i> , molekula bazalne celične adhezije
BCR	...	<i>B cell receptor</i> , B-celični receptor
BMDC	...	<i>bone-marrow derived cells</i> , celice, ki izvirajo iz kostnega mozga
BSA	...	<i>bovine serum albumin</i> , goveji serumski albumin
C4BP	...	<i>C4-binding protein</i> , C4 vezavni protein
C9RP	...	<i>C9-related protein</i> , C9 podoben protein
CAM	...	<i>cell adhesion molecule</i> , molekula celične adhezije
CD	...	<i>cluster of differentiation</i> , označevalec pripadnosti
CFHR	...	<i>complement factor H related proteins</i> , proteini podobni faktorju komplementa H
CR	...	<i>complement receptor</i> , komplementni receptor
CSC	...	<i>cancer stem cell</i> , rakave matične celice
CSMD	...	<i>CUB and sushi multiple domains</i> , protein s številnimi CUB in Sushi domenami - 1
CTRL	...	kontrola
DAF	...	<i>decay- accelerating factor</i> , faktor, ki pospešuje razpad (C3 konvertaze)
DAMP	...	<i>danger associated molecular patterns</i> , molekulski signali nevarnosti
DMSO	...	dimetil-sulfoksid
DNA	...	<i>deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kislina

DPBS	...	Dulbeccov fosfatni pufer
DTT	...	ditiotreitol
ECM	...	<i>extracellular matrix</i> , zunajcelični matriks
EDTA	...	etilendiamintetraocetna kislina
EGF	...	<i>epidermal growth factor</i> , epidermalni rastni faktor
EGFR	...	<i>epidermal growth factor receptor</i> , receptor epidermalnega rastnega faktorja
EGTA	...	etilenglikoltetraocetna kislina
ENPP	...	<i>ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase</i> , ektonukleotidna fosfataza/fosfodiesteraza
ESI	...	<i>electron spray ionization</i> , ionizacija z razprševanjem elektronov
FBS	...	<i>fetal bovine serum</i> , fetusni serum goveda
FDR	...	<i>false discovery rate</i> , stopnja napačne prepoznave
FHL	...	<i>factor H-like Protein</i> , faktorju H podoben protein
HCD	...	<i>higher-energy collisional dissociation</i> , kolizijska disociacija pri visoki energiji
HEPES	...	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
Hi-FBS	...	<i>heat inactivated FBS</i> , toplotno inaktiviran FBS
IAA	...	<i>iodoacetamide</i> , jodoacetamid
IgSF	...	<i>immunoglobulin superfamily</i> , imunoglobulinska naddružina
IL	...	interlevkin
JAM	...	<i>junctional adhesion molecule</i> , adhezijska molekula celičnih stikov
Kat.	...	katapsin
L-BAPNA	...	Na-benzoil-L-arginil-4-nitroanilid HCl
L1CAM	...	<i>L1 cell adhesion molecule</i> , celična adhezijska molekula L1
LeuLeu-O-Me	...	L-levcil-L-levcin metilni ester
LPS	...	lipopolisaharid
MAC	...	<i>membrane attack complex</i> , membranski litični kompleks
MASP	...	<i>MBL-associated serine protease</i> , z MBL povezana serinska proteaza
MBL	...	<i>mannan-binding lectin</i> , lektin, ki veže manan
MCP	...	<i>membrane cofactor protein</i> , membranski kofaktorski protein
MDSC	...	<i>myeloid cell-derived suppressor cell</i> , supresorske celice mieloidnega izvora

MHC	... <i>major histocompatibility complex</i> , poglavitni histokompatibilnostni kompleks
MMP	... <i>matrix metalloprotease</i> , metaloproteaza matriksa
MOI	... <i>multiplicity of infection</i> , multipliciteta infekcije oz. razmerje med številom bakterijskih celic in tarčnih celic
NaDS	... natrijev dodecil sulfat
NHS	... <i>natural human serum</i> , naravni humani serum
NK celica	... <i>natural killer cell</i> , celice ubijalke
NOD	... <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> , oligomerizacijska domena, ki veže nukleotid
NP-40	... Nonident P40 oz. oktilfenoksipolietoksiletanol
OMV	... <i>outer membrane vesicle</i> , membranski vezikel
<i>P. gingivalis</i> , <i>P.g.</i>	... <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PAGE	... <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> , poliakrilamidna gelska elektroforeza
PAR	... <i>protease activated receptor</i> , receptor, ki ga aktivira proteaza
PBS	... <i>phosphate buffer saline</i> , fosfatni pufer z NaCl
PI	... <i>propidium iodide</i> , propidijev jodid
PMA	... <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i> , forbol 12-miristat 13-acetat
PRR	... <i>pattern recognition receptor</i> , vzorčno prepoznavni receptor
PS	... <i>phosphatidylserine</i> , fosfatidil serin
SCR	... <i>spectral count ratio</i> , razmerje med številom spektrov
SLRP	... <i>small leucine-rich proteoglycan</i> , majhen z levcinom bogat proteoglikan
sMAP	... <i>small MBL-associated protein</i> , majhen na MBL vezan protein
SUSD	... <i>Sushi domains-containing protein</i> , protein, ki vsebuje Sushi domene
TACE	... <i>tumor necrosis factor-α-converting enzyme</i> , encim pretvorbe TNF α
TAM	... <i>tumor associated macrophage</i> , s tumorjem povezani makrofagi
TCEP	... tris(2-karboksietil)fosfin
TEMED	... N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TFRC	... Transferinski receptor
TIGK	... <i>Telomerase Immortalized Gingival Keratinocytes</i> , telomeražno imortalizirani gingivalni keratinociti
TIMP	... <i>tissue inhibitor of metalloprotease</i> , tkivni inhibitor metaloproteaz

TLR	...	<i>Toll-like receptor</i> , Toll-u podoben receptor
TNF	...	<i>tumor necrosis factor</i> ; dejavnik tumorske nekroze
TNFR	...	<i>tumor necrosis factor receptor</i> , receptor dejavnika tumorske nekroze
uPA	...	<i>urokinase-type plasminogen activator</i> , urokinazni aktivator plazminogena
uPAR	...	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i> , receptor urokinaznega aktivatorja plazminogena
Z-Phe-Arg-AMC	...	N-benzoiloksikarbonil-fenilalanil-arginil-7-amino-4-metilkumarin

Standardne oznake aminokislin

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

Poglavje 1

Uvod

1.1 Imunski sistem

Imunski sistem združuje različne načine obrambe našega telesa pred patogenimi mikrobi, toksičnimi in alergenimi snovmi ter spremenjenimi lastnimi celicami. Poglavitna naloga imunskega sistema je tudi razločevanje med lastnimi in tujimi oz. spremenjenimi celicami, ki mu sledi odstranjevanje potencialno nevarnih celic oz. proteinov iz telesa.

V grobem imunski sistem delimo na naravno (prirojeno) imunost in na specifično (pridobljeno) imunost. Prirojena imunost deluje bolj splošno in je prisotna ves čas v enaki obliki, se ne razvija in spreminja s časom. Pridobljeno imunost pa kot že ime pove, pridobimo postopoma. Telo mora najprej priti v stik z določenim antigenom, da lahko potem pripravi specifičen odziv nanj. To poteka tako, da se izdelajo protitelesa in citotoksične celice proti antigenu, telo jih shrani in ob naslednjem stiku hitreje odreagira. Naravna imunost je prva obrambna linija v boju proti okužbi - vedno se aktivira takoj, ampak pri tem ni specifična. Nasprotno pa je pridobljena imunost zelo specifična in deluje le na točno določen antigen. Vendar pa za svojo aktivacijo potrebuje več časa in začne delovati nekoliko kasneje. Ko pa se aktivira, pa okrepi naravno imunost in delovanje usmeri proti točno določenemu antigenu, celici ali organizmu.

Naravno imunost sestavljajo anatomske in mehanične ovire, ki preprečujejo vdor tujkov v telo (primer: sluznica, koža), nespecifične baktericidne snovi (primer: mlečna kislina v potu, nizek pH, lizocim), efektorski mehanizmi, ki se sprožijo ob prepoznavi tujka v telesu in aktivirajo nadaljnje obrambne mehanizme (primer: komplementni sistem, naravne celice ubijalke) ter endocitoza in fagocitoza, kjer gre za prepoznavo tujka s pomočjo PRR receptorjev (*pattern recognition receptor*, vzorčno-prepoznavni receptor) kot so na primer TLR ali NOD receptorji. Prepoznavi tujka sledi njegova internalizacija v za to specializirane monocite (npr. makrofage) in posledična razgradnja tujka.

Nosilci pridobljene imunosti so limfociti - celice, ki prepoznajo antigene in nato v odgovor na njih izdelujejo protitelesa in specifične celice ubijalke. Poznamo limfocite B, ki so izdelovalci protiteles, ki jih potem ali izločajo v okolico in s tem spodbudijo odstranitev tujka iz telesa (plazmatske ali efektorske celice), ali pa nastala protitelesa shranijo za naslednji stik s tujkom. To so spominske celice in so temelj pridobljene imunosti. Druga skupina limfocitov so limfociti T, ki prepoznavajo antigene, predstavljene na antigen-predstavljalajočih celicah (npr. makrofagih, dendritičnih celicah). Tudi te se delijo na spominske celice in na efektorske celice. Slednje se lahko razvijejo v citotoksične celice T, ki okužene celice ubijejo ali pa na celice T pomagalko, ki pomagajo pri imunskem odzivu tako, da izločajo citokine in aktivirajo druge celice imunskega sistema (npr. celice B in makrofage).

Imunski odziv lahko delimo tudi na drugačen način, npr. na humoralno in celično posredovano imunost. Humoralna imunost je tista, ki izvira iz tekočine, to je iz krvi oz. medcelične tekočine. V to skupino spadajo protitelesa, citokini, baktericidni proteini v krvi in komplementni sistem. Celično posredovana imunost pa je tista, ki izvira iz celic, načeloma limfocitov [1-3]. Imunski sistem je izredno kompleksen in obsežen. Za potrebe tega dela se bomo osredotočili samo na en del imunskega sistema, to je komplementni sistem, ki je opisan v nadaljevanju.

1.1.1 Komplementni sistem

Komplementni sistem je eden izmed glavnih predstavnikov humoralnega imunskega odziva. Ime komplement izvira iz začetkov raziskovanj na področju biokemije seruma (serologije), ko je Bourdet leta 1896 ugotovil, da je v krvi poleg protiteles še nekaj, kar jim pomaga pri obrambi telesa in s protitelesi sodeluje ter jih dopolnjuje [4]. V angleščini so za to uporabili glagol *to complement*, kar pomeni dopolnjevati, mi pa smo angleško besedo prevzeli in nastal je izraz komplementni sistem.

Komplementni sistem sestavlja več kot 30 plazemskih proteinov, ki lahko prepoznavajo različne tujke, predvsem antigene na površini celic - to so lahko proteini na spremenjenih oz. okuženih lastnih celicah ali na bakterijskih celicah. Prepoznavi sledi aktivacija kaskade serinskih proteaz - komponent komplementnega sistema, ki privede do fagocitoze ali lize tarčnih celic, hkrati pa se sproži tudi vnetje. Aktivacija komplementa lahko poteče po treh različnih poteh: po klasični poti, lektinski poti ter alternativni poti [1, 5].

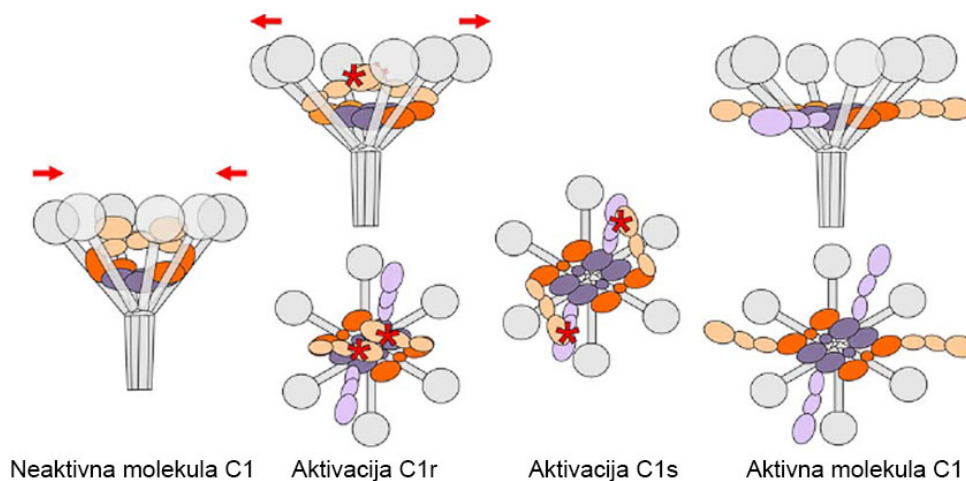
1.1.1.1 Klasična pot aktivacije komplementa

Klasična pot aktivacije komplementa je bila odkrita prva in je najbolj poznana pot, čeprav je filogenetsko verjetno mlajša od alternativne poti. Pri klasični poti aktivacije je bistveno, da gre za prepoznavo imunskih kompleksov (kompleksa med antigenom in protitelesom) na površini celice. Zato pogosto to pot prištevamo k pridobljeni imunosti in ne k naravni, kamor sicer uvrščamo komplementni sistem.

Proces aktivacije klasične poti se začne, ko prva komponenta komplementnega sistema, imenovana C1, prepozna kompleks antigena s protitelesi tipa IgG ali IgM in se veže nanj. Poleg omenjenih kompleksov obstajajo še druge molekule, na katere se C1 veže. Te molekule so značilne za bakterijske celice, mikoplazmo, viruse in parazite, med njimi pa so tudi C-reaktivni protein, β -amiloidni peptid, lipid A, DNA, amiloid P, heparin, apoptotske oz. nekrotske celice in še nekatere druge molekule [6-8]. Z vezavo C1 na katerokoli izmed teh molekul se sproži nadaljnja kaskada klasične poti komplementnega sistema.

Komponenta C1 je sestavljena iz prepoznavne molekule C1q ter serinskih proteaz C1r in C1s (Slika 1). Za vezavo C1s in C1r je potrebna prisotnost kalcijevih ionov (Ca^{2+}) [9]. C1q je heksamer, sestavljen iz treh verig (označenih z: veriga A, B in C), ki so v molekuli C1q vsaka v 6 kopijah in skupaj tvorijo šest domen C1q. Struktura C1q spominja na šop tulipanov. Steblo tulipanov predstavlja kolagenu podobna N-končna iztegnjena domena, kjer je vseh šest kopij verig A, B in C tesno zvitih. Tako imenovane cvetove šestih tulipanov pa predstavljajo globularne domene vseh šestih kopij teh verig [6, 7, 10]. Ravno globularne domene so tiste, ki prepoznajo protitelesa in se vežejo na Fc regijo njihove težke verige. Da se C1q aktivira, se mora vezati na vsaj dve težki verigi hkrati. Ta pogoj znanstveniki razlagajo kot varovalni mehanizem, da se komplement ne bi aktiviral kar na protitelesih, ki krožijo po krvnem obtoku [11].

Aktiven C1s cepi naslednjo molekulo v kaskadi, to je C4. Pri tej cepitvi oz. aktivaciji se sprostí aktiven fragment (anafilatoksin) C4a v okolje, v preostanku molekule C4, ki ga označimo s C4b, se izpostavi tioesterska vez in se kovalentno poveže z najbližjo nukleofilno skupino na površini celice oz. na protitelesu [5, 6].

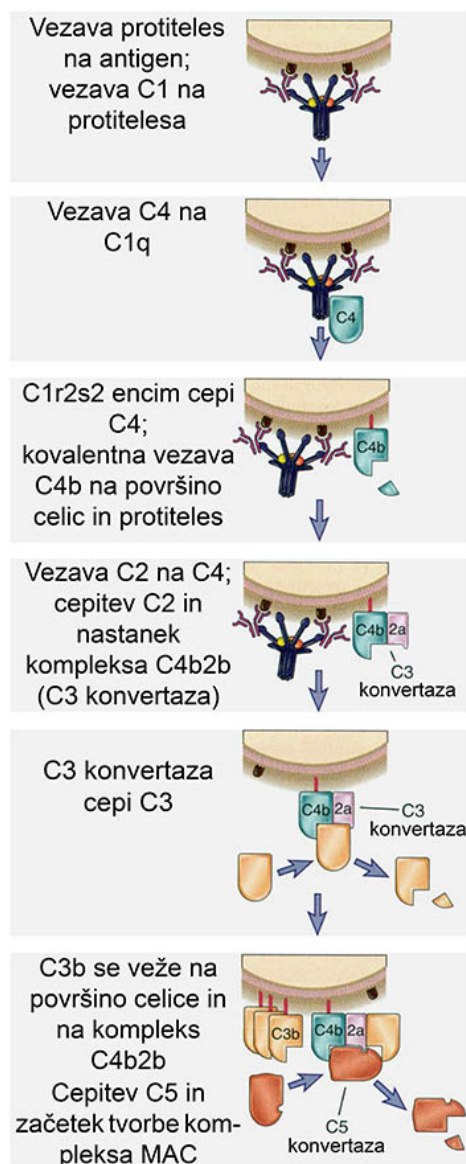


Slika 1: **Shematski prikaz konformacijskih sprememb ob aktivaciji molekule C1.** Z leve proti desni si sledijo: neaktivna molekula C1, kjer je tetramer C1rC1s znotraj globularnih glav; vezava C1 na dve Fc regiji protitelesa sproži konformacijsko spremembo, ki aktivira C1r; aktiven C1r aktivira še C1s in tako dobimo aktivno molekulo C1, ki ima sposobnost cepiti C4. Povzeto po [12].

Za vezavo naslednje molekule, C2, na C4b je potrebna prisotnost magnezijevih ionov, Mg^{2+} [13]. Ko se C2 enkrat veže na C4b, ga C1s proteaza cepi na dva dela: manjši C2b se sprostí v okolje, večji C2a pa se veže na C4b in skupaj tvorita kompleks C4bC2a, znan tudi pod imenom klasična C3-konvertaza. V tem kompleksu C4b veže naslednjo komponento komplementnega sistema, molekulo C3, ki jo serinska proteaza C2a cepi na C3a in C3b - od tod tudi ime C3-konvertaza [1, 5].

Molekula C3 je najpomembnejša in osrednja molekula komplementnega sistema. Po cepitvi na C3b in C3a, se slednji fragment sprostí v okolje kot anafilatoksin, C3b pa po cepitvi izpostavi tioestersko vez, preko katere se lahko kovalentno veže na površino celice. V tej obliki lahko deluje kot opsonin za fagocite ali pa se veže s C3-konvertazo (C4bC2a) in tvori novo konvertazo: C4bC2aC3b ali klasično C5-konvertazo (Slika 2). Kadar se C3b veže na faktor B, skupaj tvorita alternativno C5-konvertazo [1, 5].

C3b je lahko tudi substrat za nadaljnjo razgradnjo in tako nastanejo novi fragmenti z različnimi vlogami. Faktor I s pomočjo kofaktorja H cepi C3b v iC3b in C3f. Slednji fragment je izredno majhen (2 kDa) in verjetno nima dodatne funkcije, iC3b pa je vezavni faktor za CR3 (komplementni receptor 3) in tako marker za fagocitozo (imenovan tudi opsonin). Faktor I lahko s pomočjo kofaktorja CR1 razgradi iC3b na C3c in C3dg. Slednji je vezavni partner za CR2 (komplementni receptor 2) in sodeluje pri ojačenju aktivacije celic B. Serinske proteaze lahko razgradnjo še nadaljujejo, saj iz C3c odcepijo C3e, C3dg pa razgradijo na C3d in C3g [14, 15].

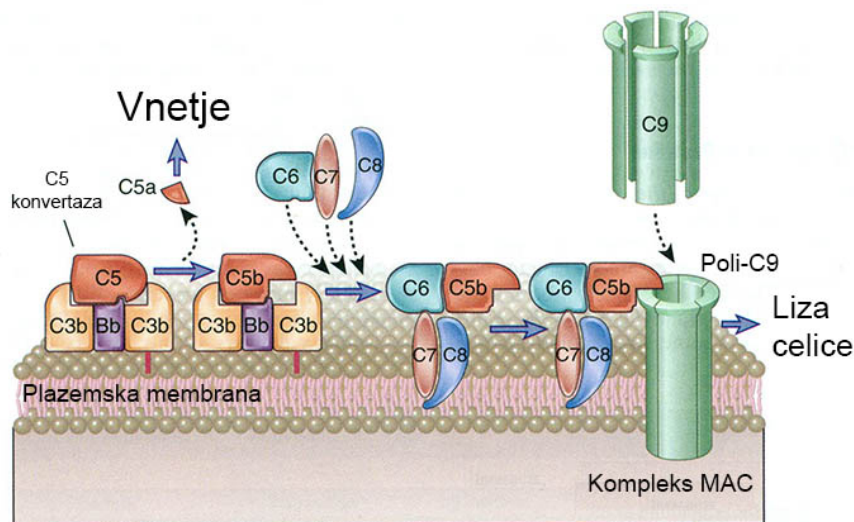


Slika 2: **Shematski prikaz aktivacije klasične poti aktivacije komplementa.** Povzeto po [5].

Nadaljnji koraki aktivacije komplementnega sistema so enaki za vse tri poti aktivacije komplementa. Pravzaprav niti ne gre več za del aktivacije, ampak za posledice aktivacije, to je tvorba kompleksa MAC (membranski litični kompleks) (Slika 3).

Torej, C5-konvertaza veže naslednjo molekulo komplementa, C5 in jo cepi na izredno močan anafilatoksin in kemoatraktant C5a [16] ter fragment C5b, ki predstavlja začetek tvorbe kompleksa MAC. Po vezavi C5b na membrano celice sledi vezava molekul C6 in C7. Slednja komponenta komplementnega sistema je hidrofozna in se že delno vsidra v lipidno celično membrano, kjer potem postane močan receptor za še bolj hidrofozen C8. Nanj se veže še transmembranska molekula C9 in ob tem spremeni svojo konformacijo, pri čemer se izpostavi hidrofozna regija, ki služi za usidranje v membrano. Na aktivirano molekulo C9 se vežejo naslednje molekule C9, ki se vse usidrajo v membrano (rečemo, da polimerizirajo v membrani) in s tem tvorijo pore v membrani. Tako nastali kompleks imenujemo kompleks MAC. Sama tvorba kompleksa MAC predstavlja začetek lize celice,

saj novonastale pore omogočajo prehod molekul vode in ionov v in iz celice, kar nadalje pripelje do porušenia osmotskega tlaka in do posledičnega poka celice [1, 5, 14, 17, 18]. Poleg C9 poznamo tudi C9RP (*C9-related protein*, C9 podoben protein), ki opravlja podobno vlogo kot C9, s to razliko, da C9RP lahko tvori pore sam od sebe in za to ne potrebuje na membrano vezanega C5b-8 [14].



Slika 3: **Tvorba kompleksa MAC in posledična liza celice.** Tvorba kompleksa MAC se začne s C5-konvertazo. Ta cepi molekulo C5 na C5b in C5a. C5b se veže na membrano, nanj pa se zaporedoma vežejo molekule C6, C7 in C8, ki s svojimi hidrofobnimi regijami omogočijo usidranje tega kompleksa v membrano. V zadnjem koraku tvorbe kompleksa MAC se veže še molekula C9, ki v membrani polimerizira in tako ustvari pore, ki sprožijo lizo celice. Povzeto po [5].

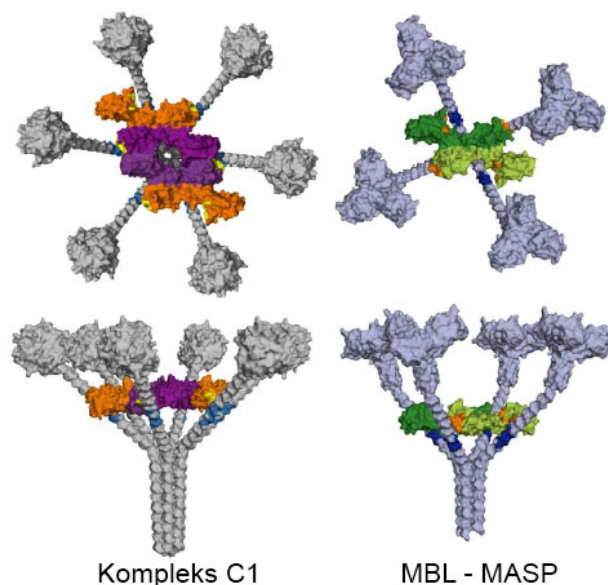
1.1.1.2 Lektinska pot aktivacije komplementa

Lektinska pot aktivacije komplementa je po mehanizmu zelo podobna klasični. Razlika je le v prepoznavni molekuli ter proteinih, na katere se le-ta veže. Lektinska pot se aktivira v odsotnosti protiteles, na površini tujih celic pa prepozna ne-lastne organske snovi, kot so na primer oligosaharidi na kvasovkah, virusih in nekaterih bakterijskih celicah.

Osnovna prepoznavna molekula lektinske poti je MBL (*mannan-binding lectin*, lektin, ki veže manan) oz. nekateri fikolini (L-fikolin, M-fikolin in H-fikolin), ki so po strukturi vsi zelo podobni C1 (Slika 4). Prav tako imajo globularno glavo in kolagenu podobno N-končno domeno. Razlika je v številu verig, ki to strukturo sestavljajo. C1q ima tri različne verige, ki skupaj tvorijo šest globularnih domen. MBL pa ima le en tip verige, ta pa tvori različne strukture: od dimerov do heksameroev. Na kolagenu podobno N-končno domeno MBL se vežeta serinski proteazi MASP (*MBL-associated serine protease*, z MBL povezana serinska proteaza). Trenutno najbolj raziskani sta molekuli MASP-1 in MASP-2, za kateri se predvideva, da sta analoga C1r in C1s [19, 20]. MBL se od C1q razlikuje tudi v tem, da se v MBL oligomer veže dimer serinskih proteaz, torej le po ena molekula MASP-1 in ena molekula MASP-2, in ne tetramer, kot je to v primeru C1q. Takoj po vezavi kompleksa MBL na površino celice, poteče sočasna avtoaktivacija serinskih proteaz MASP-1 in MASP-2 [12, 21]. Tudi za lektinsko pot je prisotnost kalcijevih ionov bistvenega pomena, saj vsak MASP-1-MASP-2 kompleks za svojo avtoaktivacijo potrebuje šest Ca^{2+} ionov [8, 12].

Poleg MASP-1 in -2 so odkrili še eno serinsko protezo - MASP-3 in še protein brez encimske aktivnosti - sMAP (*small MBL-associated protein*, majhen z MBL povezan

protein), ki verjetno skrbi za regulacijo aktivacije lektinske poti [22]. Zanimivo je, da MASP-3 ne cepi C2, C4 in C3, zanj ni značilna avtoaktivacija in tudi njegova točna vloga še ni znana. Vemo tudi, da izmed vseh MASP proteinov le MASP-2 cepi C4 in nato še C2 in tako omogoči nadaljevanje aktivacijske kaskade komplementa, kot jo poznamo pri klasični poti [23, 24].



Slika 4: **Primerjava kompleksa C1 in kompleksa MBL-MASP.** V kompleksu C1 (levo) vijolična barva predstavlja C1r, oranžna pa C1s. V kompleksu MBL-MASP na desni sta proteazi MASP-1 (temno zelena) in MASP-2 (svetlo zelena). Povzeto po [12].

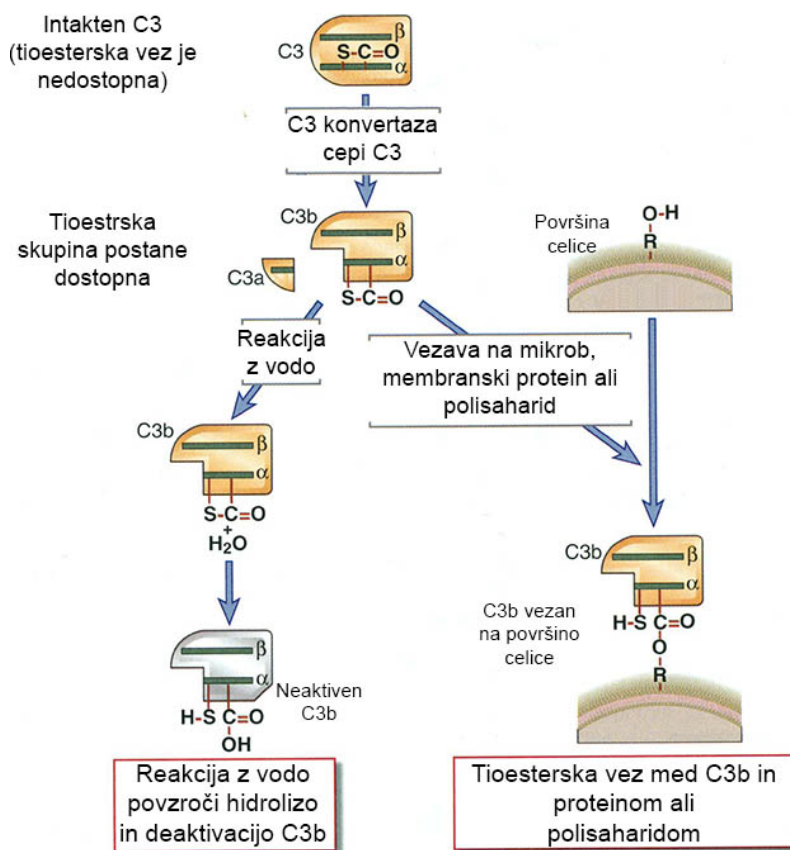
Aktivacija komplementa preko lektinske poti se torej začne s prepoznavo in posledično vezavo MBL na ogljikove hidrate na tujih (bakterijskih, parazitskih) celicah. Ta vezava sproži konformacijsko spremembo, ki je odgovorna za avtoaktivacijo serinskih proteaz MASP-1 in MASP-2. Slednja nato cepi C4 na dva dela: na C4a in C4b, ki se veže na površino celice. Naslednja komponenta komplementnega sistema, C2 se veže na C4b, kjer jo MASP-2 cepi na C2a in C2b. C2a se veže na C4b in skupaj tvorita C3-konvertazo - kompleks, ki cepi centralno komponento komplementnega sistema, C3. Nadaljevanje aktivacije poteka po prej opisanem postopku: sledi nastanek C5-konvertaze in tvorba kompleksa MAC [5].

1.1.1.3 Alternativna pot aktivacije komplementa

Z vidika filogeneze alternativna pot predstavlja najstarejšo obliko aktivacije komplementa, vendar so jo odkrili najkasneje [25]. Od klasične in lektinske poti se razlikuje predvsem po svojem začetku. Tukaj namreč ne gre za vezavo prepoznavne molekule na protitelesa oz. ne-lastne proteine, pač pa za spontano tvorbo aktivnega fragmenta C3 molekule, ki se veže na površino ne-lastnih celic in tako začne aktivacijo komplementa. Na ta način komplement ves čas preverja stanje v telesu in se lahko zelo hitro aktivira ob morebitni prepoznavi spremenjenih oz. tujih celic [26].

Sama aktivacija se torej začne v plazmi s t.i. konverzijo (angleško *tickover*), ki poteka s hitrostjo približno 0,005% celotnega C3 v plazmi/min [27]. Pri tej konverziji se v C3 izpostavi tioesterska vez, ki je dovzetna za nukleofilni napad, preko katerega se veže na najbližjo površino celice (vezava poteka na hidroksilne ali amino skupine membranskih

proteinov ali polisaharidov). Lahko pa nukleofilni napad izvede molekula vode in tako inaktivira C3. Tako dejansko trenutno mikroskopje cepljenega C3 odloča o tem, ali se bo aktivacija alternativne poti začela ali pa bo le-ta v hipu preprečena [14, 27]. Shema aktivacije komplementa po alternativni poti je na naslednji sliki (Slika 5).



Slika 5: Shematski prikaz spontane aktivacije C3 na začetku alternativne poti. Ko C3-konvertaza cepi C3, se izpostavi tioesterska vez v fragmentu C3b. Ta lahko reagira z molekulo vode (leva stran sheme), ki po vezavi deaktivira C3b. Če pa se C3b s svojo tioestersko vezjo veže na površino mikroba (desna stran sheme), pa je to znak za aktivacijo komplementa po alternativni poti. Povzeto po [5].

Kadar se C3 veže na površino celice, rečemo, da se je aktivacija alternativne poti komplementa res začela. Vezani C3 imenujemo C3b-podoben faktor, na katerega se v prisotnosti magnezijevih ionov veže serinska proteaza imenovana faktor B. S to vezavo faktor B postane dovzeten za proteolitsko cepitev, ki jo izvede serinska proteaza faktor D. Tvori se manjši Ba fragment, ki se sprosti v okolico in večji Bb fragment, ki se veže na C3b-podoben faktor in skupaj predstavljata začetno alternativno C3-konvertazo. Nova molekula C3 iz plazme se lahko veže na to konvertazo. Faktor B je serinska proteaza in cepi novi C3 tako, da nastaneta aktivna fragmenta C3a in C3b. Prvi se sprosti v okolico, kjer deluje kot anafilatoksin, drugi pa se s svojo tioestersko vezjo pritrdi na površino celice, kjer ponovno veže faktor B, ga cepi v fragment Bb in nato skupaj tvorita pravo alternativno C3-konvertazo, C3bBb. Vendar pa je le-ta dokaj nestabilna in hitro razpade, zato je za nadaljevanje aktivacije alternativne poti nujno potrebna prisotnost properdina (oz. faktorja P), ki poskrbi za stabilizacijo alternativne C3-konvertaze [25]. Tako nastajajoči C3b se

lahko veže na površino tujih celic kot opsonin ali pa nadaljuje aktivacijo komplementa v C5-konvertazo in dalje do tvorbe kompleksa MAC [5, 28, 29].

Alternativna pot lahko služi tudi kot ojačenje aktivacije po klasični ali lektinski poti, saj se lahko faktor B veže na C3b, ki je nastal po kateri koli poti. Skupaj potem tvorita alternativno C3-konvertazo, ki poskrbi za nastanek še večje količine C3b [5, 28, 29].

1.1.1.4 Posledice aktivacije komplementa

Aktivacija komplementa se kaže na več načinov: liza okužene, spremenjene oz. ne-lastne celice, označevanje take celice za fagocitozo ter sprožanje vnetja in dotok imunskih celic na mesto prepoznavne spremenjenih celic.

Prva posledica aktivacije je nastanek kompleksa MAC, ki je povzročitelj tvorbe por v celično membrano in posledične lize celic. Vendar pa to ni edina in verjetno tudi ne glavna posledica aktivacije komplementa. Zavedati se je treba, da nastanek por v membrano poteka le na sesalskih celicah, ki nimajo celične stene, večina bakterijskih in glivičnih celic pa je razvila različne mehanizme preprečevanja nastajanja kompleksa MAC v njihovi steni [5]. Gram-negativne bakterije so na tem področju še bolj posebne: imajo namreč zunanjo lipidno membrano, periplazemsko špranjo s peptidoglikani in nato še notranjo ali citoplazemsko lipidno membrano. Kompleks MAC sam načeloma ne more preluknjati vseh plasti Gram negativne membrane. Vseeno pa je bila liza celic opažena, zato strokovnjaki predvidevajo, da se to dogaja v večih korakih. V prvem valu aktivacije komplementa je preluknjana le zunanja membrana, ki pa še ne pomeni tudi celične smrti, pač pa le omogoča dostop do notranje citoplazemske membrane nadaljnjim baktericidnim molekulam. V drugem valu aktivacije komplementa pa začno bakterijske celice umirati. Točnega mehanizma tega dogajanja še ne poznamo. Do sedaj je znanih le nekaj ugotovitev in nekaj teorij: v drugem koraku komplement najverjetneje napada t.i. območje bioadhezije med zunanjo membrano in citoplazemsko membrano. Novejše raziskave so pokazale, da je za komplementno lizo Gram-negativnih celic bistvenega pomena tudi C5-konvertaza. Čeprav sama po sebi ni sestavni del kompleksa MAC, je za uspešno luknjanje Gram-negativnih celičnih sten nujna [30, 31].

Tekom aktivacije komplementa nastajata C3b in neaktiven iC3b (tak, ki ne more nadaljevati aktivacijske kaskade) ter C4b, ki se kovalentno vežejo na nukleofilne skupine na površino celice, kjer poteka aktivacija komplementa. S to vezavo celice označijo za fagocitozo, zato jim rečemo tudi opsonin. Fagocitne celice, npr. makrofagi, nevtrofilci, eozinofilci, bazofilci in drugi imajo receptorje za te opsonine in, ko se z njimi povežejo, jim da to znak za začetek fagocitoze celice. Receptorji, ki prepoznajo te opsonine so: CR1 (angleško *complement receptor 1*) za C3b, CR3 za iC3b ter CR4 za C4b [1, 5, 6].

Posledica aktivacije komplementa je tudi sprožitev vnetja. Ob aktivaciji vseh treh poti komplementa, se v okolico sproščata anafilatoksina C3a in C5a, ki aktivirata nevtrofilce in mastocite, s tem pa se sproži akutno vnetje. Najmočnejši anafilatoksin je C5a, sledi mu C3a, bistveno manj pomemben anafilatoksin pa je tudi C4a (ocenjujejo, da je C3a 100x močnejši anafilatoksin od C4a) [16].

Poleg teh funkcij komplementa, ki so vse usmerjene v odstranjevanje celic patogenov iz sistema, poznamo še nekaj dodatnih vlog. Ena izmed njih je čiščenje imunskih kompleksov iz obtoka. Imunski kompleks sestavlja topen antigen in protitelesa, vezana nanj. Težava nastane, ko ti kompleksi nenadzorovano rastejo, postanejo netopni in kot taki lahko sprožijo močno vnetno reakcijo. Če komplement te komplekse prepozna, se molekula C1 ali MBL veže na Fc regijo vezanih protiteles in s tem prepreči vezavo novih protiteles na imunski kompleks, hkrati pa ga z opsonini označi za fagocitozo [14, 32].

Stranski produkt aktivacije komplementa je tudi C3dg - fragment, ki nastane pri cepitvi C3. C3dg se veže na površino označene celice oz. v bližino antigena in tam deluje kot pomemben receptor za celice B. Namreč, ko se celica B veže na antigen s svojim receptorjem, se hkrati povežeta tudi C3dg in CR2 (receptor komplementa 2), ki je ko-receptor za BCR (B-celični receptor za antigene), kar posledično sproži hitrejši in močnejši odziv celic B [5]. Fragmenta C3a in C5a pa vplivata na antigen-predstavljajoče celice tako, da antigene predstavljajo hitreje in s tem stimulirajo proliferacijo celic T. Na ta način produkti aktivacije komplementa spodbudijo in pospešijo aktivacijo limfocitov in njihov odziv na tujek v telesu [5, 32].

1.1.1.5 Regulatorji komplementa

Aktivacija komplementa ima veliko različnih posledic, zato je izredno pomembno, da je le-ta strogo regulirana in se sproži le na okuženih oz. tujih celicah, nikakor pa ne na lastnih. Kadar se komplement sproži zaradi prisotnosti tujka, mora biti tudi ta aktivacija regulirana, da ne povzroči škode tudi na okoliških tkivih. V tabeli spodaj (Tabela 1) so naštetni vsi do sedaj znani regulatorji komplementa.

Tabela 1: Pregled regulatorjev komplementa. Povzeto po [5, 6, 8, 12, 14, 29, 33-35].

Protein	Vezavni partner	Vloga
C1 inhibitor	C1r, C1s	Inhibitor serinskih proteaz. Veže se v aktivno mesto C1r in C1s in prepreči aktivacijo v plazmi.
C4BP (<i>C4-binding protein</i> , C4 vezavni protein)	C4b	Veže se na C4b v C3-konvertazi in sproži razpad le-te z disociacijo C2a. Prepreči neželeno aktivacijo komplementa na lastnih celicah.
CD46 ali MCP (<i>membrane cofactor protein</i> , membranski kofaktorski protein)	C3b, iC3b, C4b	Kofaktor za faktor I, sodeluje pri cepitvi C3b in C4b in prepreči neželeno tvorbo C3 konvertaze.
CD55 ali DAF (<i>decay-accelerating factor</i> , faktor, ki pospešuje razpad)	C4b2a, C3bBb	Veže se na C3-konvertazo in sproži njen razpad z disociacijo C2a oz. Bb. Prepreči neželeno aktivacijo komplementa na lastnih celicah.
CD59	C7, C8	Prepreči vezavo C9 na C7 in C8 in s tem ustavi tvorbo kompleksa MAC ter neželeno lizo celic.
CFHR1 – CFHR5 (<i>Complement Factor H Related Proteins</i> , proteini podobni faktorju komplementa H)	C3b, C3dg	Točne funkcije in lastnosti teh proteinov še niso popolnoma znane. Vemo le, da so podobni faktorju H in verjetno delujejo na podoben način.

CR1 (CD35)	C1q , C3b, iC3b, C4b,	Sodeluje pri razgradnji C3b kot kofaktor za faktor I. Pospešuje razpad C3 in C5 konvertaze. Deluje kot receptor za C1q in C3b.
CR2 (CD21)	iC3b, C3dg, C3d	Kofaktor za faktor I za cepitev iC3b, receptor na celicah B za iC3b.
CR1g	C3b, iC3b	Nahaja se na površini Kupferjevih celic in sodeluje pri prepoznavi opsoninov in fagocitozi označenih celic. Selektivni inhibitor alternativne poti.
CSMD1 (<i>CUB and Sushi Multiple Domains -1</i>, protein s številnimi CUB in Sushi domenami - 1)	Ni znan.	Najverjetneje regulira klasično pot aktivacije komplementa.
Faktor I	C4b, C3b	Serinska proteaza, ki cepi C3b in C4b na neaktivne fragmente. Potrebuje kofaktorje, da prepreči neželjeno aktivacijo komplementa na lastnih celicah.
Faktor H	C3b	Sodeluje pri razgradnji C3b kot kofaktor za faktor I.
FHL-1 (<i>Factor H-like Protein</i>, faktorju H podoben protein)	C3b, Bb	Pospeši razpad C-konvertaz, deluje tudi kot kofaktor za faktor I.
Karboksipeptidaza-N	anafilatoksini	Cepi končni Arg- in Lys-ostanek in tako inaktivira anafilatoksine.
Nefritični faktorji	C3bBb in C4bC2a	Veže se na C3 konvertazo in jo stabilizira.
Properdin	C3bBb	Veže se na alternativno C3-konvertazo in jo stabilizira.
Serum protein S (Vitronektin)	C7	Prepreči nastanek kompleksa MAC tako, da se veže na lipofilne skupine.
SLRP (<i>Small leucine-rich proteoglycan</i>, majhen z levcinom bogat proteoglikan)	C1q	Odvisno od mesta vezave na C1q so SLRP proteini lahko pozitivni ali negativni regulatorji komplementa.
SP-40,40	kompleks MAC	Preprečuje nastanek kompleksa MAC.
SUSD4b (<i>Sushi domains-containing protein</i>, protein, ki vsebuje Sushi domene)	C2	Onemogoča pravilno cepitev C2 in preprečuje tvorbo klasične C3-konvertaze.

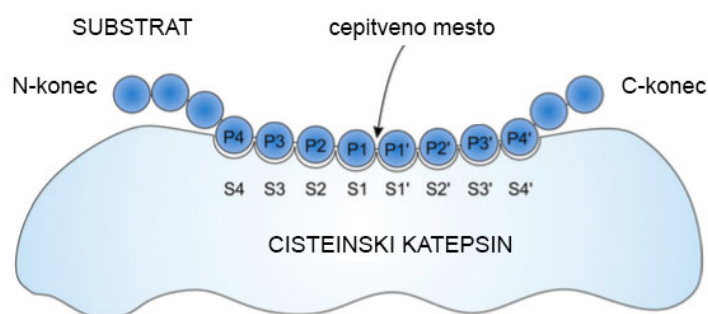
Kot je razvidno v tabeli zgoraj (Tabela 1) različni regulatorji delujejo na različne stopnje aktivacije komplementa, od čisto prve molekule v kaskadi, to je C1, pa vse do zadnje molekule, kompleksa MAC. Da je regulacija natančna in vedno prisotna, imamo v telesu tako membranske regulatorje komplementa kot tudi plazemske, ki zagotovijo stalen nadzor nad aktivacijo komplementa in takojšnje preprečevanje prekomernega delovanja. Zaključimo lahko, da večina trenutno znanih regulatorjev komplementnega sistema regulira tvorbo C3-konvertaze in njeno delovanje. To je seveda razumljivo, saj je C3-konvertaza osrednja molekula vseh treh poti aktivacije komplementa in zato potrebuje največ nadzora [5, 8].

1.2 Proteaze

Proteaze so skupina encimov, ki cepijo peptidno vez v proteinih in peptidih in predstavljajo eno večjih in bolj pomembnih skupin proteinov. Proteaze so lahko zelo majhni proteini, kot npr. katapsini, ki so veliki le okoli 30 kDa, lahko pa so to velike beljakovine, sestavljene iz večih domen – primer je proteasom z molekulsko maso do 1,2 MDa. Tudi glede specifičnosti se proteaze med seboj zelo razlikujejo: nekatere so zelo specifične in cepijo samo za določenim aminokislinskim zaporedjem, kot so npr. serinske proteaze komplementnega sistema (C1r in C1s), lahko pa so nespecifične in cepijo za več različnimi aminokislinskimi ostanki v peptidni verigi. To so na primer katapsini in proteasom.

Dalje lahko proteaze delimo glede na njihovo lokacijo v celici. Približno polovica vseh znanih proteaz je zunajceličnih, ostale pa so lahko intramembranske v plazemski membrani ali pa v membranah celičnih organelov, večina pa jih je intracelularnih. Glede na kemijsko naravo katalitičnega mesta delimo proteaze na cisteinske, serinske, aspartatne, treoninske in metalo-proteaze. Prve tri skupine so v sesalskih celicah zelo pogoste, zadnji dve pa sta v človeških celicah v zelo majhnih količinah [36].

Vsaka proteaza ima aktivno mesto, kamor se veže substrat in kjer poteče proteolitična cepitev. Samo aktivno mesto se nahaja v žepu v encimu in ima posebno nomenklaturu, imenovano tudi Schechter-Bergerjeva nomenklatura, ki izvira že iz leta 1967 [37].



Slika 6: **Shematski prikaz Schechter-Bergerjevega poimenovanja.** Substrat (temno modra veriga) se veže v encim (svetlo modra barva) v katalitično mesto tako, da se mesta na substratu, označena s črko P, ujemajo v mesta na encimu, označena s črko S. V sredini se nahaja cepitveno mesto, to je kraj, kjer encim cepi substrat. Povzeto po [38].

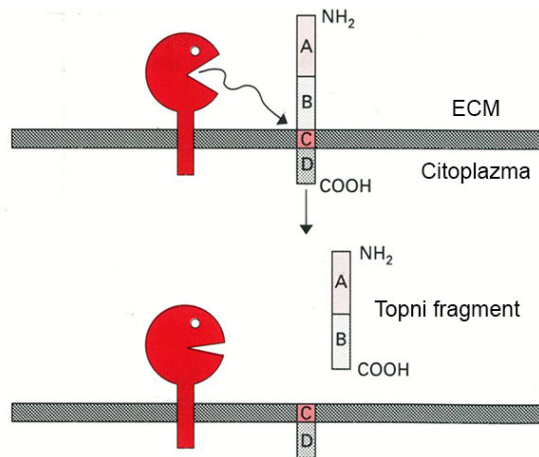
Raziskovalca Schechter in Berger sta preučevala velikost aktivnega mesta v encimu papainu. Ugotovila sta, da je treba aktivno mesto dojemati kot kompleks substrata in encima in prišla do zaključkov o njegovi dvojni vlogi. To sta vezava substrata na encim in kataliza proteolitične cepitve. Uspešnost teh dveh nalog aktivnega mesta papaina določata splošno aktivnost encima na določen substrat (poli-alanin, ki je bil sestavljen iz dveh do

šestih monomernih enot). Ugotovila sta, da je aktivno mesto papaina moč razdeliti na 7 podenot, kjer lahko vsaka veže en aminokislinski ostanek substrata. Te aminokislinske ostanki v kompleksu substrat-encim v aktivnem mestu sta označila s črkami P in S. P so aminokislinski ostanki na substratu, S pa so njihova vezavna mesta na encimu. Na sredini je peptidna vez, ki se cepi, od nje pa se v obe smeri začne štetje mest. Navzgor, torej proti C-koncu substrata imajo mesta oznako ', na primer P1', S1', kar pomeni *prime site*, po slovensko mesto-črtica. Navzdol od cepljene vezi pa so *non-prime site* (Slika 6) [37].

Glede na raznolikost proteaz imajo tudi veliko različnih vlog in kot take sodelujejo pri številnih celičnih procesih in signalizacijah. Ko govorimo o proteazni signalizaciji, se moramo zavedati, da je to ireverzibilen proces, pri katerem se signal prenaša s cepitvijo proteina. Na tak način lahko proteaze aktivirajo ali inaktivirajo citokine ali pa izpostavijo kriptična mesta v cepljenem proteinu. Mnoge proteaze lahko izvajajo zunajcelično cepitev membranskih proteinov ali pa celo šeding, to je procesiranje membranskih proteinov tik ob membrani. Proteaze tako sodelujejo pri celični smrti, celični proliferaciji, migraciji, presnovi in predelavi proteinov ter so del številnih kaskad, kot npr. komplementni sistem in kaskada strjevanja krvi [36, 39].

1.2.1 Procesiranje zunajceličnih domen membranskih proteinov ali šeding

Beseda šeding izhaja iz angleščine, kjer glagol »to shed« pomeni leviti se (v primeru kače), ogoliti se (v primeru, ko živali odvržejo svojo dlako), pustiti odpasti (na primer listje jeseni). Iz tega glagola je nastal samostalniki »shedding«, ki pa se uporablja tudi v celični biologiji in opisuje (v grobem povedano) cepitev oz. striženje membranskih proteinov tik ob membrani (Slika 7).



Slika 7: **Shematski prikaz šedinga.** Proteaza - šedaza se približa membranskemu proteinu in ga cepi v bližini membrane. Nastali topni fragment ni podvržen nadaljnji proteolizi in ima v okolici novo fiziološko vlogo. Na sliki je narisana transmembranska proteaza, vendar pa so šedaze lahko tudi izločene iz celice v topni obliki. Povzeto po [40].

Bolj specifično je šeding procesiranje zunajceličnih domen transmembranskih proteinov tik ob celični membrani oz. v njeni bližini (10 - 35 aminokislinskih ostankov stran od membrane). Gre torej za omejeno proteolizo zunajceličnih domen membranskih proteinov in sproščanje odcepljenih domen v zunajcelično okolje. Le-te imajo lahko v okolju novo vlogo, ali pa so ponovno podvržene proteolitskemu procesiranju in razgradnji do te mere, da nimajo več biološke funkcije. Potencialne tarče za tovrstno proteolitsko razgradnjo so

lahko vsi transmembranski in v membrano usidrani proteini (citokini, rastni faktorji, adhezijske molekule, encimi, imunoregulatorji in drugi), kar pomeni, da so na ta način lahko regulirane praktično vse celične signalne in ostale poti, ki so povezane z membranskimi proteini. V zadnjih letih je bilo pokazano, da šeding ne poteka samo ob plazemski membrani, kot je bilo sprva razumljeno, pač pa se odvija na praktično vseh membranah, torej tudi znotraj celice - na membranah celičnih organelov [41-43].

V zdravem organizmu je šeding nujno potreben del delovanja npr. rastnih faktorjev. Znano je, da se EGF (*epidermal growth factor*, epidermalni rastni faktor) in TNF (*tumor necrosis factor*, dejavnik tumorske nekroze) sintetizirata kot transmembranski molekuli, ki postaneta aktivni šele po procesu šedinga. Na svoj receptor se tako dejansko lahko vežeta šele, ko ju šedaza (najverjetneje iz družine ADAM in TACE) odcepi od membrane in sprostí v zunajcelično okolje [44]. Poteka lahko tudi nasproten proces: šeding receptorjev s površine celic. Odcepljeni del receptorja se lahko v medceličnini veže s svojimi ligandi na način, da prepreči njihovo delovanje - ligand, vezan v kompleks izgubi svojo funkcijo. Primer take blokade delovanja je vezava citokina IL-6 (interleukin-6) na odcepljeni receptor IL-6-R (receptor za IL-6). Tak IL-6 se ne more več vezati na membranski receptor in sprožiti nadaljnje aktivacije signalnih poti. V drugih primerih pa lahko v serumu nastali kompleks liganda in odcepljenega receptorja sproži aktivacijo signalnih poti. Primer je receptor za citokin IL-4 (interleukin 4), ki po vezavi liganda v kompleks, le-tega obvaruje pred nadaljnjo razgradnjo s strani proteaz v okolici in ga tako varno pripelje na cilj. Tak mehanizem je imenovan tudi »*carrier protein receptor*« oz. receptorski prenašalec proteina. Še več, kompleks liganda in receptorja je tudi zaloga citokina za primere, ko bi ga v sistemu primanjkovalo [40]. Poleg odcepljene zunajcelične domene, ima novo oz. spremenjeno funkcijo lahko tudi preostanek membranskega proteina, torej tisti del, ki je ostal vezan na membrano. Raziskave so pokazale, da se znotrajcelični del takega receptorja lahko odcepi z membrane in prenese v jedro, kjer vpliva na prepisovanje genov [45, 46]. Pomemben pa je tudi za cepitev adhezijskih molekul (npr. L-selektin) na površini limfocitov, kar tem celicam omogoča potovanje skozi endotelij pri pojavu vnetja [47].

Kadar pa je zunajcelično procesiranje preobširno in je s površine celice odstranjenih preveč proteinov, pa to vodi v porušenje homeostaze in tudi v bolezensko stanje, kot je npr. rak [48, 49], Alzheimerjeva bolezen [50] in različne vnetne bolezni [51-53].

Proteaze, ki lahko na ta način cepijo proteine z membrane, se imenujejo šedaze. Da je protein lahko šedaza, mora imeti proteolitične sposobnosti, se nahajati na zunanji strani celične membrane ter cepiti membranske proteine v bližini membrane same. Za šeding je bistveno, da odcepljena domena ostane aktivna in je proteaza ne razgradi dalje. Najnovejša definicija deli šedaze na kanonične in nekanonične šedaze. Kanonične šedaze so tiste proteaze, ki cepijo substrate na določeni razdalji od membrane, medtem ko so nekanonične šedaze tiste, ki cepijo substrate znotraj transmembranske domene ali pa na robu membrane [43]. Prva znana šedaza je bila metaloproteaza TACE (*TNF α converting enzyme*, encim pretvorbe TNF α) oz. z drugim imenom ADAM17, ki so jo odkrili leta 1997 [54]. Sledila so odkritja še drugih šedaz, vse iz skupine metaloproteaz z atomom cinka v aktivnem mestu. To so bile proteaze iz družin ADAM (ADAM9, ADAM12, ADAM10) in MMP (MMP-2, MMP-9, MMP-14) [41]. Sprva je veljalo, da so šedaze lahko le iz skupine metaloproteaz, kasneje pa so med šedaze uvrstili tudi nekatere serinske proteaze (npr. katepsin G in nevtrofilna elastaza) [55, 56]. Do danes se je število šedaz že močno povečalo in v splošnem velja, da so šedaze načeloma lahko iz katerekoli skupine proteaz. Tako sedaj mednje prištevamo med drugim tudi raznorazne bakterijske proteaze in lizosomske proteaze.

Pri našem delu smo se osredotočili na dve skupini potencialnih šedaz: na cisteinske katepsine, natančneje na katepsina L in S, ki sta lizosomski proteazi ter na gingipaine, bakterijske proteaze, ki jih izločajo patogene bakterije *Porphyromonas gingivalis*. V obeh primerih pa nas je zanimal predvsem vpliv izbranih šedaz na komplementni sistem.

1.2.2 Serinske proteaze

Serinske proteaze so najbolj pogosta vrsta proteolitičnih encimov, saj skorajda tretjino vseh proteaz klasificiramo v to skupino. Serinske proteaze so pomembne pri številnih fizioloških procesih, kot so homeostaza, strjevanje krvi, imunski odziv, prebava, oploditev, apoptoza in še nekatere signalne poti, kjer serinske proteaze skrbijo za prenos signalov [57].

Glede na substratno specifičnost serinske proteaze delimo v naslednje skupine: tripsinu podobne serinske proteaze, kimotripsinu podobne, elastazi podobne, subtilizinu podobne, kalikreini, katepsini in ostale. Kimotripsin je najbolj raziskana serinska proteaza in je navadno osnovni primer za razlago delovanja serinskih proteaz [58].

V aktivnem mestu serinskih proteaz je aminokislina serin, ki deluje kot nukleofil, v katalitični triadi pa sta še histidin in aspartat (asparaginska kislina). Vse tri aminokisline si med seboj »podajajo« proton (H^+), kar imenujemo »rele« mehanizem (v angleščini *charge relay*).

Na začetku reakcije cepitve peptidne vezi s pomočjo serinskih proteaz morata biti tako serin kot tudi histidin nabita. To se zgodi tako, da nukleofilni imidazol na histidinu odtegne proton z alkoholne skupine na serinu. Lahko bi rekli, da si proton »podata«. Negativen naboj naredi serin še bolj nukleofilni in posledično ta lahko izvede nukleofilni napad na C-atom karbonilne skupine substrata. Sledi acilacija C-atoma karbonilne skupine substrata na serin in tvorba tetraedričnega intermedata. Naboj intermedata se stabilizira z oksoanionsko luknjo, pozitivno nabit histidin pa lahko tvori vodikovo vez z aspartatom. V naslednjem koraku histidin deluje kot kislina in svoj proton odda intermediatu, čemur sledi odcep N-konca cepljenega substrata. Sledi drugi korak, to je deacilacija, ki je pravzaprav ponovitev prvega dela reakcije. Molekula vode izvede nukleofilni napad na C-atom karbonilne skupine substrata, ki je vezan na serin. Nastane še en tetraedrični intermedat, temu pa sledi odcep C-konca cepljenega substrata ter regeneracija serinskega in histidinskega aminokislinskega ostanka [57].

Tekom našega raziskovalnega dela smo se s serinskimi proteazami srečali pri komplementnem sistemu, kjer so praktično vse komponente komplementa, ki imajo encimsko aktivnost, serinske proteaze.

1.2.3 Cisteinske proteze

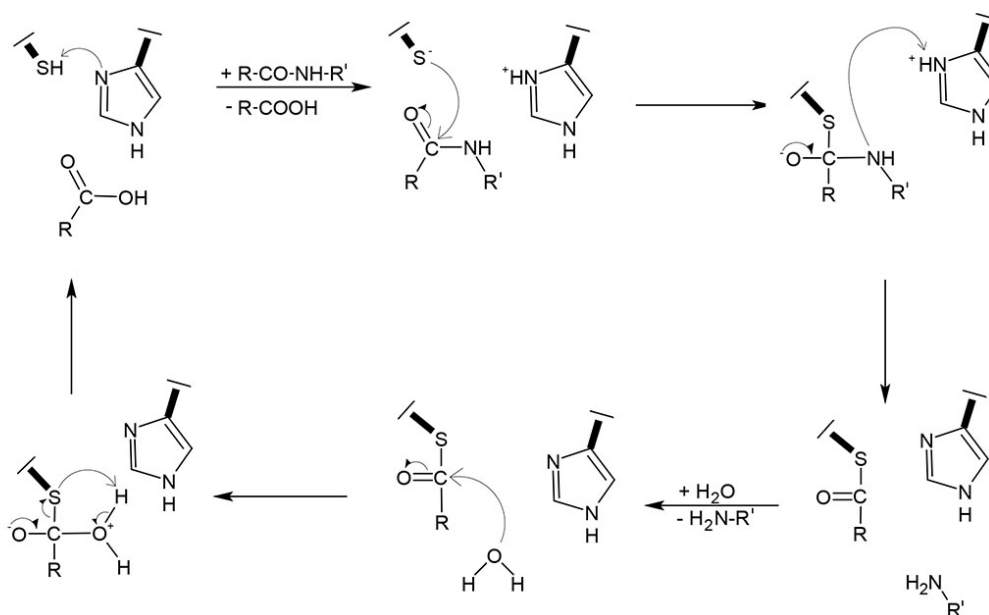
Skupina cisteinskih proteaz je v naravi zelo razširjena, saj jih najdemo tako pri virusih, prokariotih, kot tudi pri evkariontih. Človeški genom ima zapis za okoli 150 - 200 cisteinskih proteaz, kar je več kot 25% vseh proteaz [59]. Predstavniki cisteinskih proteaz so razdeljeni v več različnih klanov (CA, CD, CE, CF, CH, CL, CM, CN, CO, C-), glede na vrstni red aminokislinskih ostankov, ki sodelujejo pri katalizi. Toliko različnih klanov kaže na to, da so se cisteinske proteaze najverjetneje razvile iz različnih predhodnikov [60]. Najbolj poznan in preučen encim iz skupine cisteinskih proteaz je papain, prebavni encim izoliran iz papaje, ki je osnova za definicijo mehanizma cisteinskih proteaz, kot tudi označevanja aminokislinskih ostankov v encimih [61].

1.2.3.1 Mehanizem delovanja cisteinskih proteaz

V aktivnem mestu cisteinskih peptidaz sta aminokislinska ostanka cistein in histidin, ki ju imenujemo tudi katalitična diada. Nekateri pripisujejo pomembno vlogo tudi ostanku asparagina, asparaginske kisline ali glutamina, ki tako skupaj s cisteinom in histidinom tvori katalitično triado. Vendar pa se predvideva, da ta tretja aminokislina nima bistvenega vpliva na sam potek reakcije, pač pa le skrbi za pravilno pozicijo in tautomerno obliko imidazolnega obroča, da lahko reagira s cisteinskim ostankom [61].

Za potek reakcije cepitve substrata s pomočjo cisteinske proteaze morata biti oba aminokislinska ostanka nabita. Prvi korak je torej deprotonacija tiolne skupine cisteina. To se zgodi tako, da nukleofilni imidazol (na histidinu) odtegne H^+ s tiolata na cisteinu in s tem dobimo tiolat - imidazolni ionski par. Cisteinski aminokislinski ostanek je sedaj s tiolno skupino (S^-) nukleofil, ki izvede nukleofilni napad na C-atom v karbonylni skupini v substratu. Sledi acilacija substrata na encim, natančneje vezava karbonylnega C-atoma na tiolatno skupino, s katero se vzpostavi tioesterska vez in tvorba tetraedričnega intermediata. Naboj se stabilizira z nastankom oksoanionske luknje, nato pa sledi odcep najprej N-konca cepljenega proteina, kateremu sledi deprotonacija in regeneracija imidazola na histidinu. Naslednji nukleofilni napad izvede molekula vode, ki je v bližini in napade preostali del substrata, vezanega na tiolno skupino cisteina. Sledi nastanek še enega tetraedričnega intermediata, nato pa deacilacija in sprostitvev C-končnega dela substrata. S tem se regenerira tiolna skupina na cisteinu in celoten encim je pripravljen za naslednji substrat [62, 63].

Shematski prikaz poteka katalitskega mehanizma je na sliki spodaj (Slika 8).



Slika 8: Shematski prikaz mehanizma cisteinskih proteaz.

1.2.3.2 Cisteinski katepsini

Cisteinski katepsini so skupina lizosomskih proteaz, ki skrbijo za znotrajcelično razgradnjo proteinov. Pri človeku poznamo 11 cisteinskih katepsinov, ki so označeni s črkami: katepsin B, katepsin C, F, H, K, L, O, S, V, X in W [64-66]. Po MEROPS-u spadajo v klan CA in družino C1 papainu podobnih proteaz [60]. Kot že ime samo pove, se v aktivnem mestu cisteinskih katepsinov nahaja aminokislina cistein, za pravilno delovanje encima pa mora

biti prisoten še histidin. Skupaj tvorita tiolat-imidazolni ionski par, ki je bistven za uspešno hidrolizo substrata. Optimalni pogoji za aktivnost cisteinskih katepsinov so rahlo kisel pH in reducirajoče okolje [67]. Večina katepsinov ima endopeptidazno aktivnost (kar pomeni, da peptidno vez cepijo na sredini proteina), nekateri med njimi pa so eksopeptidaze (peptidno vez cepijo na koncu proteina, če je to na C-koncu, se imenuje karboksipeptidaza, če pa na N-koncu pa aminopeptidaza). Tabela 2 prikazuje delitev cisteinskih katepsinov glede na njihovo endo- oz. eksopeptidazno aktivnost.

Tabela 2: **Seznam cisteinskih katepsinov in njihove peptidazne aktivnosti.** Povzeto po [65, 66, 68, 69].

Katepsin	Peptidazna aktivnost
B	Endopeptidaza in karboksipeptidaza
C	Aminodipeptidaza, endopeptidaza
F	Endopeptidaza
H	Endopeptidaza in aminopeptidaza
K	Endopeptidaza
L	Endopeptidaza
O	Endopeptidaza
S	Endopeptidaza
V	Endopeptidaza
W	Endopeptidaza
X	Karboksipeptidaza

Vsi cisteinski katepsini se sintetizirajo kot neaktivni zimogeni, ki poleg aktivnega dela encima vsebujejo še signalni peptid in pro-peptid. Odcep signalnega peptida se zgodi ob prehodu skozi endoplazemski retikulum, istočasno pa poteka tudi dodatna glikozilacija proteinov, ki jim nato omogoča pravilno zvitje. Pro-peptid ima poleg naloge preprečevanja nepotrebne aktivacije encimov tudi vlogo usmerjanja katepsinov v lizosome [64, 66].

Iz kristalnih struktur je bilo na primeru katepsina L ugotovljeno, da se pro-peptid nahaja v aktivnem mestu encima in na ta način preprečuje dostop morebitnim substratom [66, 70]. Ko so katepsini enkrat v lizosomih, je naloga pro-encima izpolnjena in katepsini se lahko aktivirajo. Ta aktivacija lahko poteče avtokatalitično – katepsin se aktivira sam od sebe, zaradi znižanja pH vrednosti v lizosomih, ali pa ga aktivirajo druge že aktivne proteaze, kot na primer katepsin D, pepsin, nevtrofilna elastaza in druge [65, 66, 71].

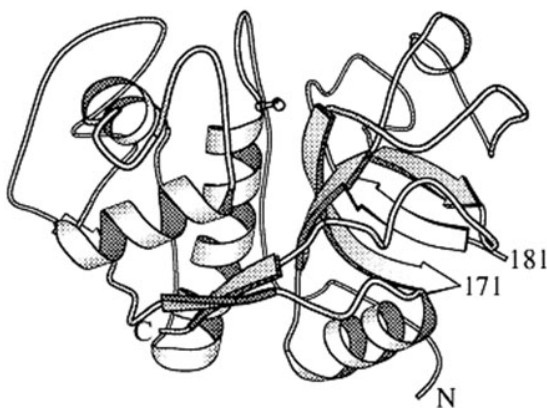
1.2.3.2.1 Struktura in substratna specifičnost katepsina L

Večina cisteinskih katepsinov so molekule z molekulsko maso 20 - 35 kDa. Kristalne strukture so znane za vse katepsine, razen za katepsina O in W. Ker smo pri delu največ uporabljali katepsin L, je tu opisana le njegova struktura (Slika 9).

Katepsin L je po strukturi podoben papainu, saj ga sestavljata dve domeni, imenovani L (leva domena, *left*) in R (desna domena, *right*). L domeno sestavljajo tri α -vijačnice, R domeno pa β -sodček, ki je spodaj prekrit z α -vijačnico. Stik med domenama predstavlja režo aktivnega mesta. Aminokislinska ostanka Cys25 in His159 sta v centru te reže in se nahajata vsak na eni domeni proteina. V aktivnem encimu sta oba aminokislinska ostanka nabita (cistein ima negativen naboj, histidin pa pozitivnega) in tako tvorita ionski par [64, 66, 72, 73].

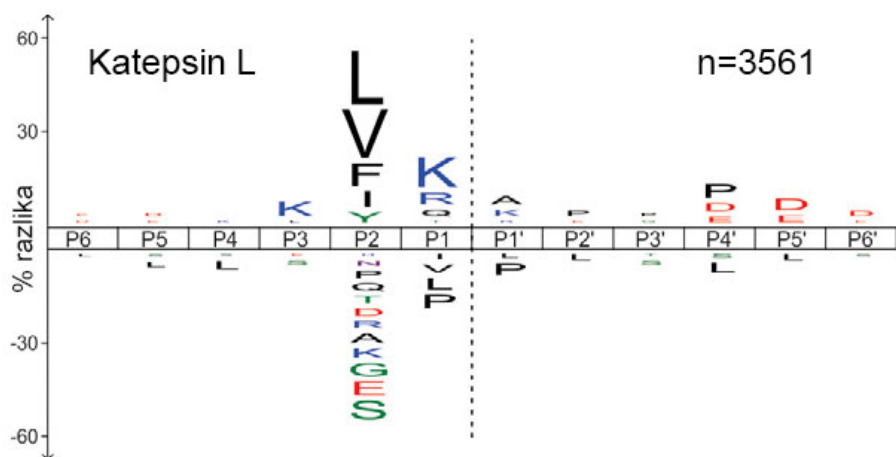
Substrat se v žep aktivnega mesta veže v iztegnjeni konformaciji. Za katepsin L velja, da je aktivno mesto zelo neizrazito in večinoma plitko. Edino mesta S2, S1 in S1' so nekoliko

bolj izrazito oblikovana, da lahko sprejmejo določene aminokislinske ostanke, izmed teh pa le mesto S2 tvori dejanski žep. Ostala vezavna mesta okoli aktivnega mesta pa so bolj kot ne samo površine za vezavo substrata [74]. Zato lahko mesti S2 in S2' označimo za območje vezave substrata, v primeru ostalih mest pa govorimo le o vezavnih površinah, saj so interakcije v tem delu zelo nespecifične.



Slika 9: **Struktura Katepsina L.** Povzeto po [72].

Glede na dokaj nedefinirano vezavno mesto, je tudi substratna specifičnost katepsinov precej široka. To pomeni, da katepsini ne cepijo peptidne vezi za samo enim aminokislinskim ostankom, pač pa je možnosti več (Slika 10). Najnovejše raziskave so pokazale, da katepsin L v S2 lahko sprejme hidrofozne aminokislinske ostanke (npr. levcin, valin in izolevcin), pa tudi aromatske aminokislinske (tirozin, fenilalanin). Mesto S1 pa naj bi prav tako preferiralo vezavo pozitivno nabitih aminokislin, kot na primer glicin in lizin ter arginin, mesto S1' pa majhne hidrofozne aminokislinske (npr. alanin). Če gledamo še dalje, mesto S3 izraža komaj opazno preferenco za bazične aminokislinske, medtem ko je mesto S4 že popolnoma nespecifično [64, 74-78].



Slika 10: **iceLogo predstavitev substratne specifičnosti za katepsin L.** Za katepsin L je najpomembnejše mesto P2, kjer je substratna specifičnost najbolj razvita. Opaziti je, da katepsin L na tem mestu preferira levcin in valin, ter nekatere druge aminokislinske ostanke. Povzeto po [78].

1.2.3.2.2 Fiziološka vloga cisteinskih katepsinov

V osnovi so cisteinski katepsini lizosomske proteaze, ki skrbijo za dokončno in popolno razgradnjo proteinov, ki so se znašli v lizosomih (kar se dogaja tekom avtofagije ali nekroze) ali endosomih. Dandanes pa je znanih tudi ogromno katepsinskih nalog, ki jih opravljajo izven lizosomov. Tako se katepsini lahko nahajajo v jedru, citosolu, na celični membrani, lahko pa so izločeni v zunajcelični matriks. V svojem novem okolju imajo različne, a pomembne vloge, ki so povzete v tabeli spodaj (Tabela 3). Načeloma jim pripisujemo vlogo še pri celjenju ran, aktivaciji hormonov, remodeliranju kosti. Na molekularni ravni pa sodelujejo pri celični smrti, citoplazemski signalizaciji pri vnetju, regulaciji celičnega cikla v jedru in pri razgradnji ter signalizaciji v zunajceličnem prostoru. Vendar pa so številne te vloge katepsinov v okolju, ki niso lizosomi povezane s patološkimi stanji [79, 80].

Tabela 3: Seznam cisteinskih katepsinov, njihove lokacije v organizmu ter njihove fiziološke funkcije. Povzeto po [69, 79, 80].

Katapsin	Lokacija	Funkcija
B	Splošno prisoten	Lizosomska in zunajcelična proteoliza, procesiranje prekursorskega proteina amiloida β (APP), vloga pri invazivnosti tumorjev, metastaz.
C	Splošno prisoten	Lizosomska proteazna aktivnost, aktivacija granulocitnih serinskih proteaz in faktor XIII nevramidaze.
F	Splošno prisoten	Lizosomska proteazna aktivnost, vloga pri tumorski invaziji in metastazah, sodeluje pri predstavitvi antigena.
H	Splošno prisoten	Lizosomska proteazna aktivnost, procesiranje in razgradnja invariantne verige MHC razreda II.
K	Kosti (osteoklasti), epitelijska tkiva, splošno prisoten	Lizosomska proteazna aktivnost, resorpcija kosti preko osteoklastov, razgradnja fibrinogena in proteinov zunajceličnega matriksa.
L	Splošno prisoten	Lizosomska, zunajcelična in jedrna proteazna aktivnost, sodeluje pri predstavitvi antigena, razgradnji invariantne verige Ii in regulaciji celičnega cikla.
O	Splošno prisoten	Lizosomska in znotrajcelična razgradnja.
S	Epitelijske celice, testisi, limfna tekočina, antigen predstavljajoče celice, alveolarni makrofagi, CD4 ⁺ celice T	Lizosomska proteazna aktivnost, cepitev in razgradnja invariantne verige Ii, sodeluje pri predstavitvi antigena, angiogenezi in aterogenezi.
V	Priželjci, testisi, možgani, koža in epitelij veznice	Lizosomska proteazna aktivnost, razgradnja Ii in sodelovanje pri predstavitvi antigena.
W	Limfa, celice NK in celice T-ubijalke	Sodeluje pri imunskem odzivu in regulaciji citotoksičnosti celice T-ubijalk.
X	Pogosto prisoten, v tumorskih celicah	Lizosomska proteazna aktivnost, ne-proteazno sodelujejo pri adheziji.

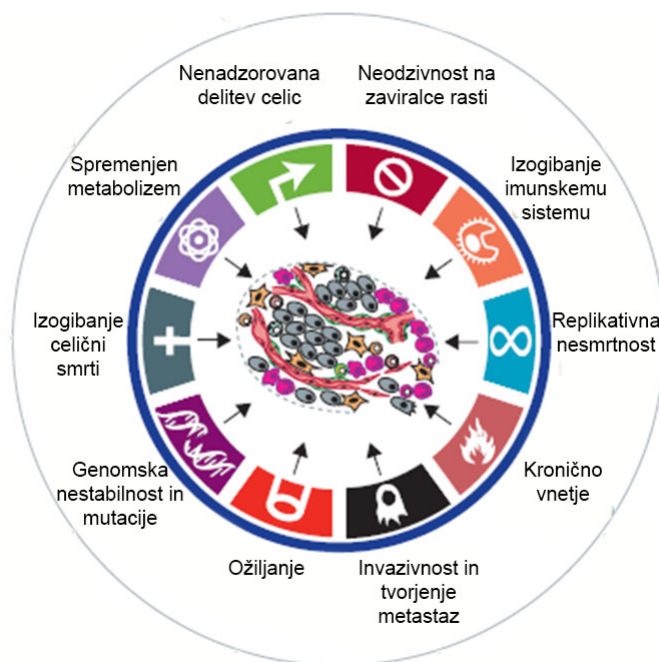
Kadar pa so katepsini prekomerno izraženi, nepravilno regulirani ali se nahajajo na napačnih lokacijah, lahko to privede do razvoja bolezni. V zadnjih desetletjih cisteinske katepsine povezujemo s številnimi boleznimi, kot na primer z rakavimi in infekcijskimi obolenji, avtoimunimi boleznimi (npr. artritis), srčno-žilnimi obolenji ter tudi z boleznimi kosti. V vseh primerih pa jim je načeloma skupno kronično vnetje [79, 80].

1.2.3.2.3 Rak

Rak je zelo kompleksna bolezen, ki je sicer vedno bolj razumljena, vendar pa obstaja še veliko nejasnosti. Tukaj so predstavljene le najbolj osnovne značilnosti raka in tiste, ki so pomembne za razumevanje našega nadaljnjega dela.

Pri raku pride do spremembe naših lastnih celic iz normalnih, funkcionalnih celic v spremenjene, invazivne celice, ki začnejo tvoriti gmoto – tumor, zato jih pogosto imenujemo kar tumorske celice. Razlogov za ta prehod iz enega stanja v drugo je več in še niso popolnoma razloženi. Nekateri izmed razlogov bi bili lahko virusne okužbe, kronično vnetje, izpostavljenost iritantom kot je azbest in cigaretni dim, poškodbe DNA zaradi sevanja idr. Vendar pa tumor niso samo spremenjene celice, pač pa je to zelo kompleksno tkivo, ki ga sestavlja še več drugih vrst celic, med drugim tudi imunske celice, fibroblasti in endotelijske celice. Vse te celice tvorijo tumorsko stromo (ali tumorsko mikrookolje), aktivno sodelujejo pri tumorogenezi in so zanjo bistvenega pomena [81, 82].

Rakavim oz. tumorskim celicam pripisujejo 10 glavnih značilnosti, ki so prikazane na sliki spodaj (Slika 11).



Slika 11: **Glavne značilnosti rakavih celic.** Povzeto po [81].

Glavne značilnosti rakavih celic:

- nenadzorovana delitev celic (proliferacija),
- neodzivnost na zaviralce rasti,
- izogibanje celični smrti,
- replikativna nesmrtnost (število delitev celice ni omejeno),
- ožiljanje (sprožanje angiogeneze),
- invazivnost in tvorjenje metastaz,

- genomska nestabilnost in mutacije,
- kronično vnetje,
- spremenjen metabolizem (aerobna glikoliza) ter
- izogibanje imunskemu sistemu.

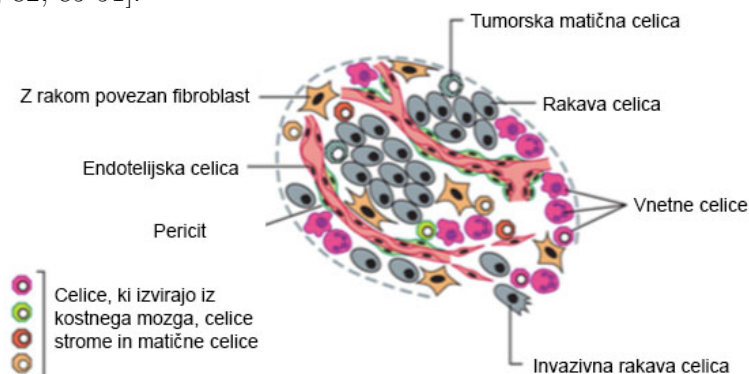
Kombinacija vseh teh značilnosti tumorskih celic jih naredi izredno trdožive tako za našo lastno obrambo (imunski sistem) kot tudi za zdravljenje [81, 83, 84].

Vse te spremembe sprožijo v tkivu kronično vnetje, kar pa tumorskim celicam le pomaga pri preživetju. Ob vnetju se pretok krvi na vnetem delu poveča, to pa s seboj privede več hranil za tumorske celice. Ker so se večinoma sposobne ubraniti napada imunskega sistema, jih dotok imunskih celic ne moti, pač pa jih izrabijo v svojo korist [85]. Zaradi spremenjenega metabolizma, se okolica tumorskih celic zakisa (pH pade), kar sproži še dodatne spremembe tkiva in omogoča napredovanje tumorja [84, 86-88].

1.2.3.2.4 Tumorsko mikrookolje

Dokler so tumorske celice samo skupek celic v enem tkivu, so možnosti za uspeh zdravljenja in preživetje pacienta razmeroma dobre. Ko pa se tumor enkrat ožili, pa se lahko tumorske celice začno gibati tudi po krvnem obtoku in se zasejevati po oddaljenih tkivih, kjer tvorijo nove tumorje. Temu rečemo metastaziranje in to je pokazatelj slabših možnosti za preživetje pacienta. Vendar pa razsevanje celic po telesu tudi še ne pomeni novega nastanka tumorja, saj morajo rakaste celice preživeti pot po krvi, se izogniti napadu imunskih celic v krvi ter najti nov organ, novo mesto, kamor se lahko pritrdijo. Vse to pomeni nove izzive in novo prilagajanje. Dnevno se iz ožiljenega tumorja v kri spusti več deset tisoč tumorskih celic, preživelo pa naj bi jih le okoli 0,01% [85].

Same rakave celice so temelj bolezni, saj začnejo s tvorbo tumorja in so odgovorne za nadaljnji razvoj bolezni – tem celicam rečemo tudi tumorske matične celice (CSC, *cancer stem cells* - rakave matične celice). Vendar pa same ne bi bile sposobne preživeti tako ekstremnih razmer, kot jih ustvari napad imunskega sistema in posledično tudi ne bi bile tako invazivne. Za njihovo delovanje in preživetje je bistveno tudi njihovo okolje – tumorsko mikrookolje ali tumorska stroma, ki ga sestavlja poleg tumorskih celic še več vrst lastnih celic (Slika 12). Te so se tja infiltrirale kot posledica signalizacije tumorja in tam delujejo na prav poseben, tumor-promotorski način. V tumorskem mikrookolju tako najdemo fibroblaste, endotelijske celice, pericite, osteoklaste in številne celice, ki izvirajo iz kostnega mozga (BMDC, *bone-marrow derived cells*), kot so nevtrofilci, mastociti, supresorske celice mieloidnega izvora (MDSC, *myeloid-derived suppressor cell*), limfociti (celice T, celice B, naravne celice ubijalke), monociti, mezenhimske matične celice in makrofagi, imenovani tudi TAM (*tumor-associated macrophages*, s tumorjem povezani makrofagi) [39, 82, 89-91].



Slika 12: Raznolikost celic v tumorskem mikrookolju. Povzeto po [81].

1.2.3.2.5 Vloga imunskega sistema in komplementa pri raku

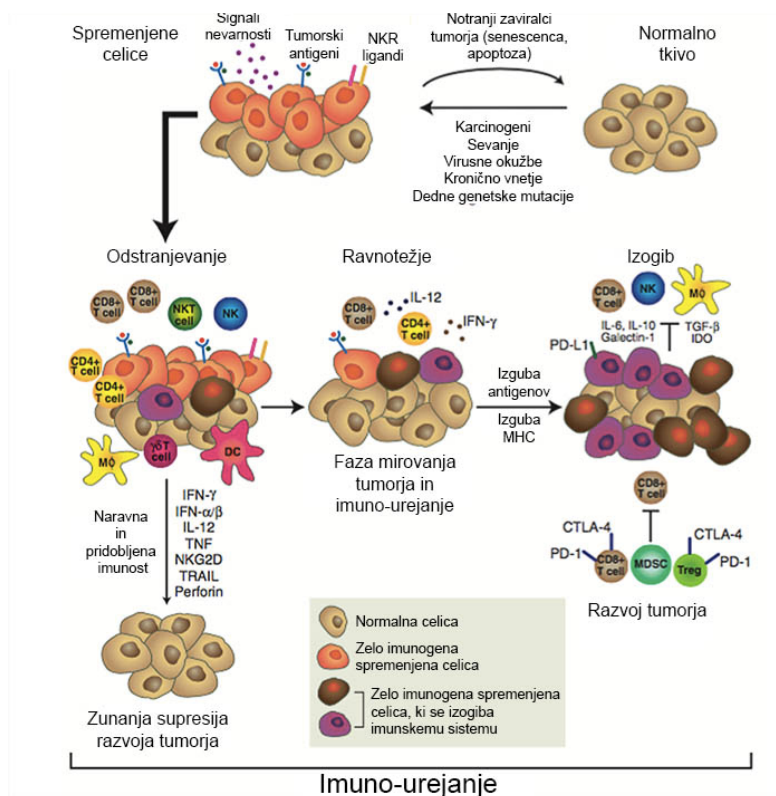
Načeloma velja, da imunski sistem in z njim tudi komplement sodeluje pri odstranjevanju tujkov iz telesa, vključno s tumorskimi celicami. Po drugi strani pa so raziskovalci opazili, da aktivacija komplementa in njene posledice lahko delujejo ravno obratno, da imajo tumor-promotorsko vlogo. Dogodki, ki delovanje komplementa definirajo kot tumor-promotorsko ali tumor-zaviralno, so prikazani na sliki spodaj (Slika 13).



Slika 13: Dvojno delovanje komplementa na tumorje. Povzeto po [92].

Imunski sistem ves čas preverja stanje v telesu in odstrani večino rakavih celic. V kolikor pa imajo rakave celice sposobnost izogiba imunskemu sistemu, pa jih le-ta ne prepozna kot tujek in jih ne poskuša odstraniti. Schreiber in sodelavci [93] so razvili teorijo imuno-urejanja, kjer govorijo o tem, kako imunski sistem po eni strani odstranjuje tumorske celice iz telesa, po drugi strani pa jim pomaga oz. jih »učí«, kako naj se mu izognejo. Proces imuno-urejanja sestavljajo tri faze: odstranjevanje, ravnotežje in izogibanje (Slika 14). Faza odstranjevanja se nanaša na odstranjevanje tumorskih celic iz telesa. V tem koraku imunski sistem tumorske celice prepozna na podlagi različnih signalov nevarnosti (DAMP, *danger-associated molecular patterns*, molekularni signali nevarnosti) in jih poskuša odstraniti. V kolikor je odstranitev uspešna, se tu proces imuno-urejanja zaključi.

Tiste tumorske celice, ki fazo odstranjevanja preživijo, vstopijo v drugo fazo, fazo ravnotežja. Tukaj imunski sistem, natančneje pridobljena imunost, tumorju onemogoča prekomerno rast, vendar pa ga ne odstrani iz telesa. Hkrati pa v tem času poteka tudi proces prilagajanja tumorskih celic na imunski odziv in učenja celic, kako preživeti v ekstremnih pogojih, ki jih ustvarjata vnetje in imunski odgovor. To je najdaljša in najpomembnejša faza imuno-urejanja rakastih celic. V tretji in zadnji fazi, imenovani izogib, pridejo do izraza tiste tumorske celice, ki so preživele prejšnji dve fazi ter se naučile, kako se izogniti napadu imunskega sistema. Tu se te celice uspešno izognejo imunskemu odzivu, kar se odrazi kot hitro rastoči in opazen tumor. Torej, tekom imuno-urejanja rakaste celice postanejo nevidne za imunski sistem oz. razvijejo mehanizme, s katerimi se ubranijo njegovega napada. Načinov, kako se rakave celice izognejo imunskemu sistemu, je veliko, najbolj učinkovito pa je verjetno obsežno izražanje regulatorjev komplementnega sistema [92, 93].



Slika 14: **Shematski prikaz imuno-urejanja.** Začne se z delovanjem imunskega sistema na rakave celice in njihovim odstranjevanjem iz telesa. V naslednji fazi pride do ravnotežja med imunskim sistemom in proti-vnetnim delovanjem tumorja. V tej fazi poteka tudi imuno-urejanje. Zadnja faza je izogib imunskemu sistemu. Takrat so rakave celice že razvile načine, kako se izogone prepoznavi imunskega sistema. Povzeto po [93].

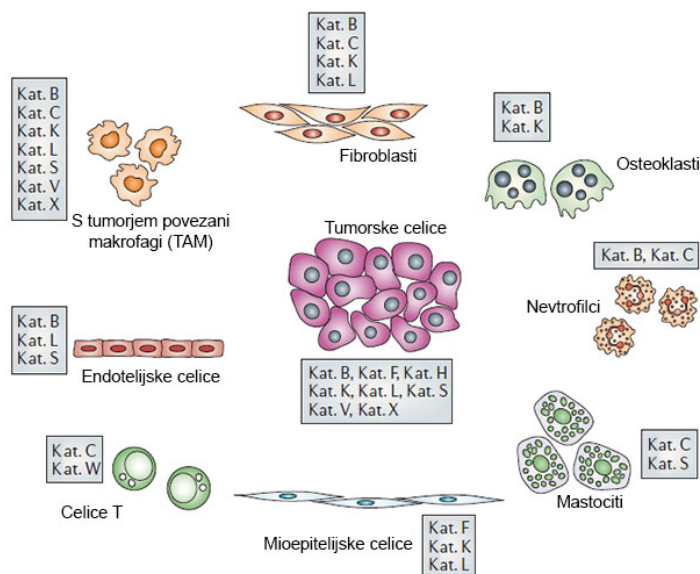
Ob prvem pojavu tumorskih celic, se na njihovi površini najverjetneje aktivira klasična pot komplementa. To vodi do tvorbe močnih imunskih efektorjev, kot sta anafilatoksina C3a in C5a, ki na točko aktivacije komplementa pritegneta številne imunske celice (eozinofilce, monocite, celice T) ter sprožita vnetje. Kot posledica tega, se v okolici tumorskih celic poviša koncentracija določenih citokinov, kemokinov, rastnih faktorjev in proteaz, ki porušijo homeostazo. Na tej točki se mora tumor tudi »postaviti v bran« imunskemu sistemu, saj bi v nasprotnem primeru dotok vseh teh efektorjev imunskega sistema tumor odstranil iz telesa. Najpogosteje je bilo opaženo, da tumorske celice izražajo velike količine inhibitorjev komplementnega sistema, kot npr. membranske regulatorje CD55, CD46, CD35, CD59 ter topne mediatorje komplementa kot so C1 inhibitor, faktor H, faktor I in C4BP. Poleg tega pa lahko tumorske celice dotok vseh teh vnetnih snovi izkoristijo tako, da delujejo kot tumor-promotorski faktorji tumorskega mikrookolja [92-96].

Dalje je bilo tudi opaženo, da komplement sodeluje pri razvoju metastaz. V prvi fazi se predpostavlja, da je C3 povezan z nižjim izražanjem E-kadherina, kar pripomore k rahljanju medceličnih povezav med tumorskimi celicami in poveča možnost njihove migracije. Poleg tega pa je komplement najverjetneje (posredno) povezan tudi s pripravo tkiv na prihod metastazirajočih celic. Taka tkiva imenujemo predmetastatske niše. Aktivacija komplementa sproži vnetje, kar posledično povzroči povečano vaskularno permeabilnost, da bi omogočil dotok levkocitov. Vendar pa to lahko izkoristijo metastazirajoče tumorske celice in se tako iz krvnega obtoka prestavijo v tkiva. Predvideva

se tudi, da je komplement vpleten v razgradnjo zunajceličnega matriksa v teh predmetastatskih nišah, vendar pa morajo biti te hipoteze potrjene z dodatnimi raziskavami [97].

1.2.3.2.6 Cisteinski katepsini v tumorskem mikrookolju

V tumorskem mikrookolju je prisotnih več vrst proteaz, med drugim tudi metaloproteaze MMP, serinske proteaze kot npr. urokinazni plazmin-aktivator (uPA) ter cisteinski katepsini, ki so pogosto glavna tarča raziskav in terapij [98]. V tumorskem mikrookolju imajo te proteaze pomembne vloge v procesih migracije tumorskih celic, njihove invazivnosti, metastaziranja, ožiljanja in poseganja v celično signalizacijo [73, 85, 91, 99, 100]. Cisteinske katepsine v tumorsko mikrookolje izločajo skoraj vse prisotne celice. Že same tumorske celice so znane po tem, da izločajo velike količine katepsina L, izredno pomemben vir cisteinskih katepsinov pa so tudi makrofagi v tumorskem mikrookolju, ki izločajo praktično cel spekter cisteinskih katepsinov. Pomembno količino prispevajo tudi druge imunske celice (nevtrofilci, celice T, mastociti), fibroblasti, mioepitelijske celice, osteoklasti in endotelijske celice [68, 80, 82, 101-110]. Najpogostejše z rakom oz. tumorskim mikrookoljem povezujemo katepsine B, C, K, L, S ter katepsina H in X [111]. Slika 15 prikazuje nekatere celice v tumorskem mikrookolju in katepsine, ki jih le-te izločajo.



Slika 15: Celice tumorskega mikrookolja in katepsini, ki jih te celice izločajo. Povzeto po [39].

Načeloma velja, da so cisteinski katepsini optimalno aktivni v kislem pH, v nevtralnem pa so običajno nestabilni – izjema je katepsin S, ki je stabilen in aktiven tudi v nevtralnem. Vemo, da so katepsini, izločeni v zunajcelično okolje v obliki zimogena, torej v svoji neaktivni obliki. To najverjetneje podaljša čas njihove stabilnosti v sicer neoptimalnem okolju, kjer je pH nevtralen. V naslednjih korakih se katepsini v zunajceličnem okolju aktivirajo. To je ali posledica proteolitske cepitve druge proteaze ali pa kot avtoaktivacija. Slednja je lahko posledica interakcij z negativno nabitimi površinami (kot na primer GAG, glikozaminoglikani ali celična membrana) ali pa lokalne zakisanosti okolja. Znano je namreč, da je tumorsko okolje zaradi hipoksične glikolize značilno zakisano, kar pripomore k stabilnosti katepsinov in njihovi aktivnosti [79, 88, 111].

Cisteinski katepsini imajo v tumorskem mikrookolju zaenkrat tri poznane vloge: razgrajujejo zunajcelični matriks, cepijo adhezijske domene ter regulirajo proteolitične

kaskade. Z razgradnjo zunajceličnega matriksa (ECM) katepsini omogočajo mobilnost tumorskih celic in posledično metastaziranje, poleg tega pa je omogočeno tudi ožiljanje tumorjev. Pri razgradnji zunajceličnega matriksa gre tako za razgradnjo proteinov ECM, kot tudi bazalne membrane. Razgradnja lahko poteka zunajcelično, torej na membrani ali pa v lizosomih, saj so tumorske celice sposobne tudi endocitoze komponent zunajceličnega matriksa. Primeri nekaterih substratov cisteinskih katepsinov so: agrekan (cepijo katepsini B, K, L in S), kolagen tipa I (katepsini B, K, L in S), kolagen tipa II (katepsini B, K, L in S), kolagen tipa IV (katepsina B in S), kolagen tipa XVIII (katepsina L in S) elastin (katepsini K, L, S in V), fibronektin (katepsini B, L in S), laminin (katepsini B, L in S), nidogen-1 (katepsin S), tenascin-C (katepsin B), periostin (katepsin K), osteokalcin (katepsini B, H, L in S) in osteonektin (katepsina B in K) [39, 80, 112, 113]. Kar pa se tiče ožiljanja tumorjev, je znanega in jasnega še manj. Predvideva se, da je katepsin S sposoben tvoriti angiogenetske faktorje, ki spodbujajo ožiljanje in sicer s cepitvijo zunajceličnega proteina laminina 5 [114]. Nasprotno pa trdijo ugotovite, da lahko katepsina L in S cepita kolagen tipa XVIII tako, da nastane anti-angiogenetski faktor endostatin, ki preprečuje proliferacijo, migracijo in adhezijo endotelijskih celic. Je pa možno, da se razgradnja endostatina s katepsinoma nadaljuje in nastanejo krajši peptidi (npr. G10T in K15T), ki pa imajo spet močne pro-angiogenetske sposobnosti [68, 115]. Cisteinski katepsini pa lahko sodelujejo pri razgradnji zunajceličnega matriksa tudi posredno.

Tako kot razgradnja zunajceličnega matriksa tudi cepitev adhezijskih domen tumorskih celic omogoča njihovo mobilnost in spodbuja metastaziranje. Prva znana adhezijska molekula, ki jo lahko cisteinski katepsini cepijo, je bil E-kadherin, ki ga lahko cepijo katepsini B, L in S [116]. Ta cepitev prekine povezavo med epitelijskimi celicami in omogoči metastaziranje [117]. Sledila so poročila o cepitvi adhezijskega proteinov skupine JAM (*junctional adhesion molecule*, adhezijska molekula celičnih stikov), ki so pomembne adhezijske molekule v krvno-možganski pregradi (meji med krvnim obtokom in možgansko zunajcelično tekočino). Katepsin S je najboljše cepil protein JAM-B, sledila pa sta proteina JAM-A in JAM-C. Poleg tega pa so bile opažene tudi cepitve okcludina in kladina (CLDN-3). Preko cepitve teh proteinov katepsin S omogoča prehod tumorskih celic iz krvnega obtoka tudi v možgane [118]. Nenazadnje pa je bilo odkrito tudi, da katepsini L, S in v manjši meri B lahko s površine celic cepijo tudi predstavnike skupine CAM (*cell adhesion molecules*), kot so ALCAM, MUC18, L1CAM, nektinu podoben protein 5 in CD44. Vse te cepitve bistveno pripomorejo k večji mobilnosti tumorskih celic in jim omogočajo vstop v krvni obtok in razsejevanje [119]. Nedavna raziskava je pokazala tudi, da katepsin B lahko odreže CD18 s površine levkocitov. CD18 je molekula, ki pomembno sodeluje pri adheziji levkocitov na endotelijske celice, to je preden se levkociti prestavijo iz žil v vneto tkivo. Opažen šeding CD18 namiguje na vlogo katepsina B pri angiogenezi, hkrati pa nam kaže tudi na do sedaj še ne poznano vlogo katepsina B pri fizioloških pogojih rekrutiranja levkocitov v vnetna tkiva [120].

Poleg omogočanja mobilnosti in metastaziranja tumorskih celic, so cisteinski katepsini prisotni tudi pri regulaciji proteolitskih kaskad, ki se začnejo zunaj celice. Najpomembnejša izmed teh je aktivacija uPA (*urokinase-type plasminogen activator*, urokinazni aktivator plazminogena), ki poteka tako, da se pro-uPA veže na uPAR (uPA receptor). Za katepsina B in L je bilo pokazano, da lahko *in vitro* aktivirata pro-uPA, ta pa potem že po svoji fiziološki vlogi cepi plazminogen v plazmin, ki razgrajuje proteine zunajceličnega matriksa ali pa aktivira metaloproteaze MMP, ki tudi sodelujejo pri razgradnji proteinov zunajceličnega matriksa [80, 91, 113, 121]. Prav tako vemo, da lahko katepsina B in L *in vitro* aktivirata MMP-2 in MMP-3 iz njune neaktivne pro-oblike v aktivno obliko, lahko pa tudi inaktivira endogene inhibitorje MMP, imenovane TIMP (*tissue inhibitor of*

metalloproteases, tkivni inhibitor metaloproteaz). V povratni zanki pa MMP lahko razgradijo katepsinske inhibitorje npr. cistatin E, cistatin C in cistatin M in tako omogočijo proteolitično delovanje katepsinov [68, 80, 122].

1.2.3.2.7 Cisteinski katepsini in komplement

Že dolgo je znano, da lahko katepsini cepijo komponente komplementnega sistema. Posledice te cepitve pa so različne: lahko pride do tvorbe aktivnih fragmentov, ki sprožijo vnetje in aktivacijo komplementa, ali pa do razgradnje in deaktivacije komplementa.

Prva odkritja segajo v leto 1995, ko so Jean in sodelavci odkrili 39 kDa veliko cisteinsko proteazo, imenovano p39 ki je cepila C3. Izolirali so jo iz membranske frakcije mišjih tumorskih celic (melanom), najdena pa je bila tudi v zunajceličnem matriksu. Hitro so tudi ugotovili, da je to najverjetneje kar mišji katepsin L, nato pa izolirali še p41 iz človeških tumorskih celic (melanomske celice), ki je imel sekvenco kot humani katepsin L [123, 124]. Potrjeno je bilo, da oba katepsina L (tako mišji, kot tudi humani) cepita C3 tako, da nastaneta neaktivna fragmenta C3dg in C3d, hkrati pa tudi onemogočita vezavo C3 na površino tumorskih celic. Na ta način preprečita aktivacijo komplementa ter omogočita tumorskim celicam, da se izognejo odzivu imunskega sistema [124-127].

Po drugi strani pa beremo tudi poročila o cisteinskih katepsinih, ki lahko s cepitvijo komponent komplementnega sistema sodelujejo pri aktivaciji komplementa. Tako so npr. objavili, da lahko katepsin L cepi C3 tudi tako, da nastajajo aktivni fragmenti, kot sta C3a in C3b, katepsin H pa cepi C5 in tvori anafilatoksin C5a [128, 129].

Ponovno zanimanje za katepsine v povezavi s komplementom je vzbudilo nedavno odkritje, kjer je bilo pokazano, da lahko katepsin L s površine tumorskih celic cepi CD55, ki je eden glavnih inhibitorjev komplementa in se v visoki koncentraciji nahaja na površini tumorskih celic [119]. To seveda sproži številna nova vprašanja, kot npr. ali katepsini spodbujajo aktivacijo komplementa na površini tumorskih celic in je ne blokirajo, kot so do sedaj predvidevali, oziroma ali je to le stranski produkt katepsina L, ko deluje kot šedaza na površino tumorskih celic.

1.2.3.2.8 Cisteinski katepsini kot šedaze

Do nedavnega ni bilo kaj dosti znanega o šedazni aktivnosti cisteinskih katepsinov. Nasprotno. Verjelo se je, da so šedaze lahko le iz vrst metaloproteaz MMP in ADAM. Nedavna objava Sobotičeve in sodelavcev pa je predstavila nekatere nove šedaze. Namreč,, pokazali so, da so cisteinski katepsini lahko šedaze tako *ex vivo* kot *in vivo*. Katepsina L in S ter v manjši meri tudi katepsin B so s površine tumorskih celic postrigli različne skupine proteinov: membranske proteine, ki sodelujejo pri signalizaciji (EGFR, efrinski receptor tipa A2, transferinski receptor 1 in CD55), adhezijske proteine (ALCAM, MUC18, L1CAM, nektinu podoben protein 5, CD44, pleksin A1 in pleksin B2, nevropilin). Poleg tega so spoznanja potrdili tudi na mišjem modelu raka pankreasa, kjer so pokazali, da cisteinski katepsini sodelujejo pri invazivnosti tumorskih celic. S šedingom adhezijskih domen lahko pospešujejo migracijo celic, ki kot take lažje in hitreje vstopijo v krvni obtok in sprožijo nastanek metastaz. Šeding membranskih receptorjev pa lahko zmoti normalen odziv imunskega sistema in omogoča preživetje tumorskih celic ali pa vpliva na semaforinsko signalizacijo, kar inhibira Ras GTPaze in ERK signalizacijo [119]. Dodatno so to pokazali Gocheva in sodelavci, ki so opisali *in vitro* delovanje katepsinov B, L in S na E-kadherin. E-kadherin je sicer že znana tarča nekaterih šedaz (MMP-3, MMP-7, ADAM-10), z njihovim poskusom pa so pokazali, da so tudi cisteinski katepsini sposobni cepiti zunajcelično domeno rekombinantnega E-kadherina [116].

1.2.3.3 Gingipaini

Gingipaini so cisteinske proteaze, ki jih sintetizirajo patogene bakterije *Porphyromonas gingivalis* (krajše *P.gingivalis* ali *P.g.*), glavne povzročiteljice paradontalne bolezni (poglavje 1.2.3.3.1). Gingipaini se nahajajo na zunanji strani celične stene ali kot membranske proteaze, torej vezane na membrano bakterij oz. na površino membranskih veziklov (OMV; *outer membrane vesicles*) ali pa jih bakterije izločijo v okolico kot topne proteaze [130]. Gingipaini kot proteolitski encimi spadajo v klan CD, družino C25 [60]. V isti klan prištevamo tudi kaspaze in legumain, pri čemer imajo gingipaini tudi nekaj strukturnih podobnosti s temi proteazami [131]. V skupino gingipainov spadajo tri cisteinske endopeptidaze, imenovane Kgp, HRgpA in RgpB. Imena so določena glede na specifičnost encima za aminokislino na P1 mestu, kratica »gp« pa je okrajšava za gingipaine. Torej, Kgp ima specifičnost za lizin, Lys (krajša oznaka te aminokisline je K), R-gingipaina (HRgpA in RgpB) pa sta specifična za arginin, Arg (krajša oznaka R) [132, 133]. Pregled vseh gingipainov je v tabeli spodaj (Tabela 4).

Tabela 4: Seznam gingipainov.

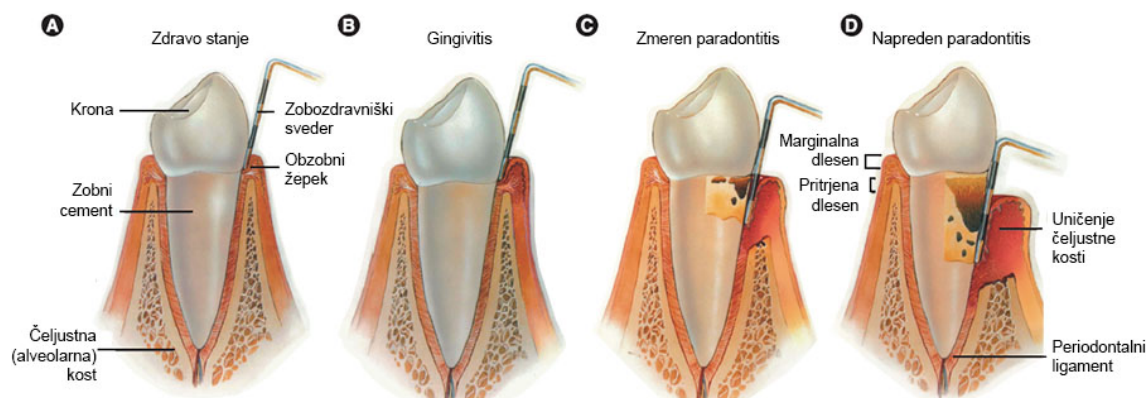
Gingipain	Druga imena	Specifičnost	Adhezijske domene
RgpB	Rgp-2	Arg	Ne
HRgpA	RgpA, Rgp	Arg	Da
Kgp	K-gingipain	Lys	Da

Vsi gingipaini se sintetizirajo v neaktivni pro-obliki in se aktivirajo šele, ko preidejo citoplazemsko membrano. Aktivirajo se lahko avtokatalitično (primer avtoprocesiranja je RgpB) [134] ali pa drug drugega (RgpB lahko aktivira Kgp) [135], poleg tega pa je za njihovo aktivnost pomemben pH, ki mora biti okoli 8, in reducirajoče okolje [136, 137]. Predvideva se, da v periplazmi pride tudi do modifikacije C-končnega dela gingipainov, za katero naj bi bil odgovoren LPS (lipopolisaharid) [138]. Po tem se gingipaini zvijejo v aktivno obliko in se izločijo iz bakterijskih celic [139].

Poleg gingipainov bakterije *P. gingivalis* izločajo še druge proteaze, vendar pa gingipaini predstavljajo kar 85% vse proteolitične aktivnosti teh bakterij, zato jim pripisujemo glavno proteolitsko vlogo in so tudi subjekt mnogih študij paradontalne bolezni [140].

1.2.3.3.1 Paradontalna bolezen

Paradontitis ali paradontalna bolezen je kronično vnetje dlesni, ki ga povzroča skupina Gram-negativnih anaerobnih bakterij: *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* in *Porphyromonas gingivalis*, izmed katerih naj bi bile ravno slednje najbolj problematične in odgovorne za večino težav. Pred-faza paradontitisa je gingivitis, rahlo vnetje dlesni, ki je reverzibilno in ob primerni ustni higieni ozdravljivo. Če pa gingivitisa ne zdravimo, se razvije v paradontitis in se škode ne da več popraviti. Pri paradontalni bolezni gre torej za hudo vnetje dlesni, ki mu sledi razgradnja čeljustne kosti. Ob tem zdravi zobje lahko izgubijo oporo, se začno majati in tudi izpadati. Vse se začne zaradi slabe ustne higiene, ki omogoča patogenim bakterijam, da se naselijo v obzobnih žepih, prostorom med zobom in dlesnijo. Več bakterij, ko je v teh žepih, hujše je vnetje, ki se nadaljuje v razgradnjo dlesničnega tkiva ter čeljustne kosti [141]. Slika 16 predstavlja razvoj paradontitisa od zdravega zoba, preko gingivitisa pa do najhujše oblike paradontalne bolezni.



Slika 16: **Razvoj paradontalne bolezni.** Slika A prikazuje zdrav zob, dlesni in čeljustno kost. Slika B prikazuje gingivitis, kjer je opaziti vnetje dlesni in nekoliko poglobljen obzobni žepek. Slika C kaže napredovanje bolezni v paradontitis, kar je razvidno iz opazno poglobljenega obzobnega žepa, ter razgradnje čeljustne kosti. Na sliki D je prikazana najhujša oblika paradontitisa, ko je čeljustna kost in obzobno tkivo že tako uničeno, da ne nudi več opore zobu. Povzeto po [141].

Bakterije *P. gingivalis* kot glavni povzročitelj paradontalne bolezni so izredno invazivne bakterije. Po klasifikaciji so to Gram-negativne anaerobne in asaharolitične bakterije. Njihovi glavni virulentni faktorji so cisteinske proteaze (med njimi tudi gingipaini), lipopolisaharid (LPS), hemaglutinini in fimbrije. Vsi ti virulentni faktorji bakterijam omogočajo kolonizacijo, pridobivanje hranil, odpornost na imunski odziv in izrabo le-tega v svojo korist ter posledično preživetje v ustni votlini (zbrano v [142]). Za bakterije *P. gingivalis* se je uvedel izraz inflamofilne, takšne, ki imajo rade oz. celo sprožajo vnetje. Gre torej za bakterije, ki dobro uspevajo v tam, kjer je prisotno vnetje. Sprva, ko se okužba oz. kolonizacija bakterij začne, se sproži imunski odziv nanje. Tega bakterije *P. gingivalis* izrabijo v svojo korist. Deloma napad imunskega sistema pobije in odstrani ostale bakterije, ki so v mikrookolju tekmeči za hranila, same pa so načeloma na imunski odziv odporne. Še več, sproženo vnetje pomeni dotok imunskih celic in s tem povezano izločanje proteinov, ki so jih bakterije *P. gingivalis* sposobne razgraditi in uporabiti za svoja hranila [143]. Bistveno je torej, da namen *P. gingivalis* oz. njihovih gingipainov ni blokada imunskega sistema, pač pa ga želijo kontrolirati in ga izrabljati za svoje potrebe [96].

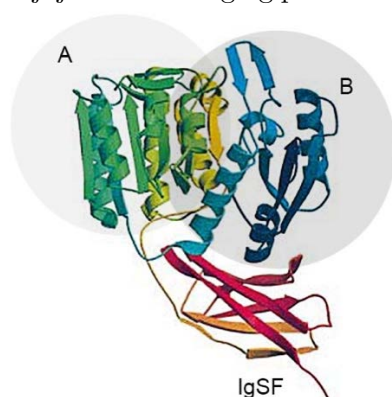
Čeprav so bakterije *P. gingivalis* prvotno paradontalne bakterije, torej bakterije, ki povzročajo okužbo v ustni votlini, pa se je izkazalo, da so povezane s številnimi drugimi (vnetnimi) boleznimi, ki izvirajo iz najrazličnejših tkiv v telesu. Najverjetnejša teorija, kako se bakterije *P. gingivalis* razširijo po telesu je ta, da vstopijo v krvni obtok tekom krvavenja dlesni, potem pa se (podobno kot metastaze) ustavijo v tkivu, ki jim omogoča optimalne pogoje za svoje življenje. Že dolga leta je znano, da so *P. gingivalis* povezane z revmatoidnim artritisom [144], prezgodnjim rojstvom (spontanim splavom) [145] in aterosklerozo [146], v zadnjih letih pa jih povezujejo tudi z razvojem raka v ustni votlini [147, 148] ter Alzheimerjevo boleznijo [149]. Ker bakterije *P. gingivalis* postajajo vse večji, sistemski problem, je njihovo poznavanje še toliko bolj pomembno. Namreč, šele ko bomo poznali njihove mehanizme delovanja in njihove šibke točke, lahko začnemo razvijati zdravilo zanje. Kljub številnim študijam, zdravila za paradontalno bolezen še nimamo. Več farmacevtskih podjetij si že lasti patente za inhibitor Kgp gingipaina, KYT-36, prav tako pa se razvijajo cepiva proti bakterijam *P. gingivalis* [150].

1.2.3.3.2 Gingipain RgpB

Kot prvo zunajcelično protezo bakterij *P. gingivalis* so odkrili gingipain RgpB, encim s substratno specifičnostjo za Arg [151]. Kasneje so ugotovili, da te bakterije izločajo pravzaprav dva gingipaina, ki cepita peptidno vez za argininskim ostankom: gingipaina RgpA in RgpB [133].

Gingipain RgpB se pojavlja tako v topni obliki z molekulsko maso okoli 50 kDa, kot tudi v membranski obliki z velikostjo med 70 – 90 kDa [139], kjer je v membrano pritrjen preko LPS-u podobnih struktur [152]. Topna oblika je sestavljena iz signalnega peptida, ki se odcepi ob prehodu gingipaina preko citoplazemske membrane, pro-peptida, ki se odcepi ob prehodu celične stene, katalitične domene in C-končnega dela [139]. Struktura RgpB po obliki spominja na zob z eno korenino (Slika 17) [131]. Krono zoba predstavlja katalitična domena, korenina zoba pa je podobna domeni imunoglobulinske naddružine (IgSF). Slednjo sestavlja 7 β -ploskev, organiziranih v β -sodček in so organizirane podobno kot v IgG domenah – od tod tudi ime. Katalitična domena pa je sestavljena iz α/β motiva. Nadalje katalitično domeno razdelimo še na A- in B-poddomeno, vsaka pa je sestavljena iz sredinske β -ploskve, ki jo obkrožajo α -vijačnice na obeh straneh [131]. V aktivnem mestu, na vrhu katalitične domene, se nahajata cistein (Cys²⁴⁴), histidin (His²¹¹) in najverjetneje tudi glutamat (glutaminska kislina) (Glu¹⁵²), kar nakazuje na tvorbo imidazolijskega iona tekom cepitve substrata. Ob Cys²⁴⁴ se začne globok žep S1, ki ga pokriva triptofan (Trp²⁸⁴) in deluje kot pokrov aktivnega mesta. Razen omenjenega S1 žepa pa je večina površine aktivnega mesta ravna in načeloma nespecifična, kar potrjuje ozko specifičnost encima RgpB. Optimalni pogoji za aktivnost RgpB so anaerobna atmosfera, pH med 7 in 8 ter reducirajoče okolje [131, 136].

Zanimiva je ugotovitev, da je katalitična domena RgpB po strukturi zelo podobna kaspazi-1 in kaspazi-3, kar potrjuje umestitev gingipainov v klan CD [131].

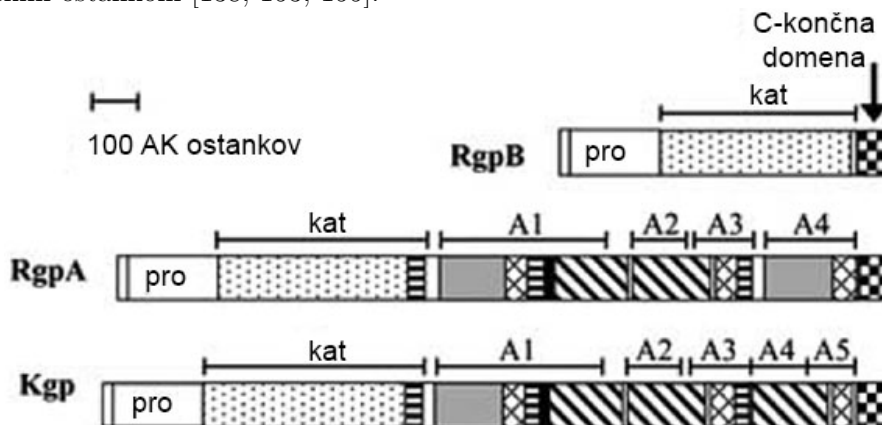


Slika 17: **Kristalna struktura gingipaina RgpB**. Struktura spominja na zob z eno korenino. Aktivno mesto je na vrhu, na kroni »zoba« in na stiku A- in B-poddomene, korenina pa predstavlja IgSF. Povzeto po [131].

1.2.3.3.3 Gingipain HRgpA

Gingipain HRgpA je kompleks gingipaina RgpA in adhezijskih molekul. Celoten kompleks ima povprečno molekulsko maso okoli 95 kDa, medtem ko sama katalitična domena (RgpA_{cat}) v topni obliki meri okoli 50 kDa [133]. V osnovi je RgpA zelo podoben gingipainu RgpB, saj sta produkta sorodnih genov *rgpA* in *rgpB*: oba cepita peptidno vez le in samo za argininskimi aminokislinskimi ostankom in imata zelo podobno strukturo, čeprav je ta znana le za gingipain RgpB, za RgpA pa se domneva, da ji je izredno podobna. Edina večja razlika so adhezijske domene, ki so prisotne samo pri HRgpA [136]. Torej, na

katalitično domeno RgpA so nekovalentno vezane štiri adhezijske/hemaglutininske domene v velikostih 44 kDa, 27 kDa, 17 kDa in 15 kDa [153] in so ključne za razliko v aktivnosti HRgpA v primerjavi z RgpB [136, 154]. Podobne adhezijske domene najdemo tudi pri gingipainu Kgp (Slika 18), zaradi česar pogosto prihaja do tvorbe od 294 do 323 kDa velikega multimernega kompleksa med HRgpA in Kgp. Gingipaina se v kompleks povežeta preko nekovalentnih povezav adhezijskih domen in na tak način tvorita izredno močno proteazo z dvema aktivnima mestoma in različnima substratnima specifičnostima: Kgp cepi peptidno vez za lizinskim aminokislinskim ostankom, medtem ko pa HRgpA cepi za argininskim ostankom [138, 153, 155].



Slika 18: **Prikaz genskega zapisa gingipainov:** signalni peptid, pro-peptid, katalitična domena, adhezijske domene ter C-končna domena. Povzeto po [139].

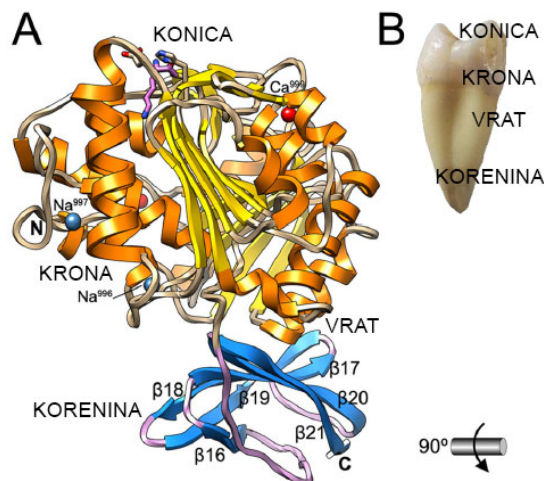
Prisotnost adhezijskih domen ima dvojno vlogo pri aktivnosti HRgpA: po eni strani lahko pripomorejo k večji aktivnosti gingipaina, saj omogočijo močnejšo vezavo encima na substrat (primer: cepljenje fibrinogena), po drugi strani pa lahko adhezijske domene spremenijo dostopnost aktivnega mesta za substrat in s tem otežijo cepitev (primer aktivacija faktorja X v kaskadi strjevanja krvi) [154].

1.2.3.3.4 Gingipain Kgp

Zaenkrat še vedno ni povsem jasno, kateri izmed treh gingipainov najbolj pripomore k razvoju paradontalne bolezni. Dolgo časa je veljalo, da je to Kgp, zadnja leta pa velja ravno obratno, to je da je Kgp najmanj aktiven [156, 157].

Gingipain Kgp je sestavljen iz N-končnega signalnega peptida, pro-peptida, katalitične domene, več zaporednih adhezijskih/hemaglutininskih domen in C-končnega peptida za tip IX izločanja [139]. Katalitična domena je velika približno 51 kDa [158] in po strukturi spominja na zob z eno korenino – tako kot struktura RgpB (Slika 19). Krono zoba predstavlja katalitična domena [159] z desetimi β -ploskvami, obkroženimi z desetimi α -vijačnicami, ki skupaj tvorijo α - β sendvič. Katalitična domena je sestavljena iz N-končnega peptida in C-končnega peptida. Vsak ima dve vezavni mesti za kalcij, C-končni peptid pa ima še dve vezavni mesti za natrij [160]. Na nasprotni strani, torej spodaj pa je na to »krono« vezana domena imunoglobulinske naddružine (IgSF), ki predstavlja korenino zoba in je sestavljena iz šestih anti-paralelnih β -ploskev [161]. Nekovalentno pa je na IgSF vezanih še 3 - 5 adhezijskih/hemaglutininskih domen v velikostih 60 kDa, 44 kDa, 30 kDa, 27 kDa in 17 kDa [162]. Aktivno mesto se nahaja na površini »krone« zoba in je najverjetneje sestavljeno iz katalitične triade: vsebuje cistein (Cys⁴⁷⁷), histidin (His⁴⁴⁴) in aspartat (asparaginska kislina) (Asp³⁸⁸). Cistein in histidin delujeta podobno kot v primeru cisteinskih katapsinov (postopek opisan v poglavju 1.2.3.1): preko tiolat-imidazolijevega

iona histidin in cistein tvorita oksoanioansko luknjo, ki poskrbi za nukleofilni napad na substrat. Za aspartat pa vloga še ni čisto razjasnjena, vendar ima verjetno podobno vlogo kot glutamat pri RgpB, torej pomaga pri protonaciji in orientaciji stranske verige histidina. Opisano je le hipoteza strukturnih biologov, ki pa jo je treba še potrditi [157, 163].



Slika 19: **Struktura katalitične domene Kgp**, kjer se vidi krona [159] in korenina (IgSF) ter aktivno mesto. Slika A prikazuje proteinska zvitja gingipaina Kgp, slika B pa je za primerjavo z realnim zobom. Povzeto po [163].

Za Kgp je značilna ozka substratna specifičnost, saj cepi peptidno vez le za lizinskim aminokislinskim ostankom. Pogoji za optimalno delovanje tega gingipaina so: pH okoli 7 - 8, reducirajoče okolje ter anaerobna atmosfera [137].

1.2.3.3.5 Fiziološka vloga gingipainov

Gingipaini so samo del nabora bakterijskih proteaz, ki jih izločajo *P. gingivalis*. A vendar veljajo za glavne proteolitične encime, saj prispevajo kar 85% k celotni proteolitični aktivnosti teh bakterij. Na ta način sodelujejo pri vseh vitalnih bakterijskih procesih, kot so kolonizacija, koagregacija, hemaglutinacija, izogibanje in obramba pred imunskim sistemom, itd. [138].

Tako so na primer adhezijske domene gingipainov pomembne za vezavo na celice drugih bakterijskih vrst (koagregacijo) ali med seboj (avtoagregacija) in posledično tvorbo biofilma, v katerem se bakterije zavarujejo pred zunanjimi vplivi [164, 165]. Gingipaini so bistveni tudi za kolonizacijo *P. gingivalis*, saj s svojimi adhezijskimi domenami omogočajo vezavo bakterij na gostiteljsko tkivo. Vežejo se na proteine zunajceličnega matriksa, na kolagen, laminin in ostale strukture v tkivu [152, 166, 167]. Ker so *P. gingivalis* asaharolitične bakterije, morajo vsa svoja hranila pridobiti s fermentacijo aminokislin, za kar poskrbijo gingipaini z razgradnjo gostiteljskih proteinov [152, 168]. Za svoje preživetje te bakterije potrebujejo tudi hem, ki ga prav tako pridobivajo s pomočjo gingipainov: z adhezijskimi/ hemaglutininskimi domenami se gingipaini vežejo na površino eritrocitov in jih počasi razgradijo, da iz njih dobijo nujno potreben hem, ki se dobro veže na adhezijske domene Kgp in HRgpA [152, 169], nato pa ga Kgp razgradi na enote, primerne za *P. gingivalis* [170].

Nadalje so gingipaini vpleteni v preprečevanje škode, ki bi jo imunski sistem lahko naredil bakterijskim celicam. To vključuje razgradnjo anti-bakterijskih proteinov [171], spremembe aktivacije komplementnega sistema [172, 173] ter porušeno signalizacijo citokinov. Slednje dosežejo s tem, da nekatere citokine razgradijo oz. jih deaktivirajo.

Primer citokina, ki je lahko substrat za gingipaine je pro-vnetni citokin $\text{TNF}\alpha$. Izločajo ga fibroblasti in epitelijske celice kot odziv na okužbo z bakterijami, receptorje zanj pa imajo polimorfonuklearni nevtrofilci, ki se po vezavi odzovejo z infiltracijo na okužena območja in s fagocitozo bakterij. Gingipaini lahko $\text{TNF}\alpha$ razgradijo in na ta način preprečijo signalizacijo in nadaljnjo obrambo imunskega sistema [174]. Prav tako lahko gingipaini razgradijo oz. inaktivirajo anti-vnetna interleukina IL-4 in IL-5, ki ju izločajo celice T [175]. Nadalje lahko gingipaini razgradijo tudi receptorje na površini imunskih celic in jih tako naredijo nefunkcionalne. Primer je cepitev CD14. CD14 je skupaj s TLR4 koreceptor za prepoznavo bakterijske molekule LPS na površini makrofagov. Z odstranitvijo CD14 postanejo makrofagi nesposobni odziva na prisotnost bakterij [176]. Cepitev receptorjev CD2, CD4 in CD8 s površine celic T pa onemogoči njihovo aktivacijo in pravilno delovanje [177, 178].

Še več, gingipaini dokazano posegajo tudi v aktivacijske kaskade v organizmu, kjer s proteolizo spremenijo njihov potek. Primeri so kaskada strjevanja krvi [179, 180] kalikrein/kininska aktivacijska pot [152] in komplementni sistem (opisano v poglavju 1.2.3.3.6). Mnoge celice na svoji površini izražajo od proteaz odvisne receptorje, PAR (*protease activated receptor*, receptor, ki ga aktivira proteaza). To so receptorji, ki za svoje delovanje potrebujejo proteazo, ki odcepi del receptorja in ga tako aktivira. Znano je, da se tu lahko vmešajo gingipaini in aktivirajo receptorje PAR-1 in PAR-4 na površini dlesničnih epitelijskih celic in krvnih ploščic ter PAR-2 na nevtrofilcih. To vodi do spremenjene signalizacije in nepotrebne aktivacije teh celic [181-183].

Gingipaini lahko tudi razgrajujejo zunajcelični matriks. Primeri substratov gingipainov, ki so sestavni del zunajceličnega matriksa, so fibronektin, laminin in kolageni [158, 184, 185]. Poleg tega pa lahko gingipaini razgradijo tudi adhezijske molekule s površine gostiteljskih celic, kot na primer receptor za fibronektin in integrin [186]. Ravno to dvoje pa lahko vodi do popolne izgube medceličnih stikov in posledično oblike celične smrti, imenovane anoikis (smrti zaradi izolacije, osamitve celice) gostiteljskih celic [152].

Kadar pa se bakterije preselijo v notranjost gostiteljske celice, lahko gingipaini sprožijo ali pa zavirajo apoptozo. Predvideva se, da je v začetnih fazah okužbe apoptoza inhibirana, saj verjetno gingipaini aktivirajo PI3K/AKT signalizacijo, ki sproži prepisovanje preživetvenih faktorjev, kot je NF- κ B [187]. Ko se okužba dovolj razvije, pa gingipaini lahko sprožijo tudi apoptozo, ki je posledica znotrajceličnega delovanja gingipainov – najverjetneje gre za cepitev pro-kaspaze-3 v aktivno kaspazo-3 [188].

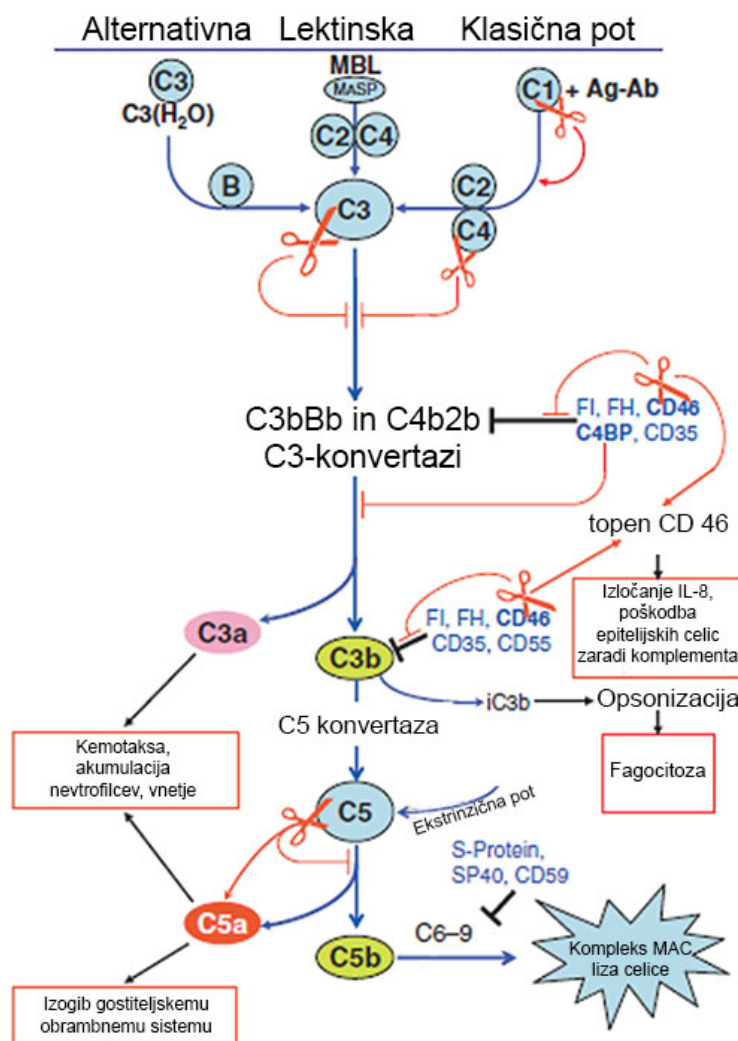
1.2.3.3.6 Gingipaini in komplementni sistem

Že zelo kmalu po odkritju gingipainov so ugotovili, da RgpB lahko cepi C3 in C5. Predvidevali so, da RgpB cepi C3 komponento tako, da nastane C3b, odcepi in najverjetneje tudi razgradi pa se C3a protein. Tudi v primeru cepitve C5, se je odcepil fragment C5a, ki pa je bil v mešanici bolj obstojen, zato so sklepali, da gingipain RgpB lahko aktivira komplement [189]. Poleg komponent komplementnega sistema je bila opažena tudi razgradnja receptorjev anafilatoksinov, npr. receptorja C5aR na površini polimorfonuklearnih nevtrofilcev. Torej so sklepali, da se vnetje, ki normalno sledi aktivaciji komplementa, po zaslugi gingipainov ne začne, saj imunske celice ne reagirajo na vnetne signale (kot v tem primeru C5a) [190].

Do danes je o povezavi med gingipaini in aktivacijo oz. inaktivacijo komplementa znanega že veliko (Slika 20). Bistveno je vedeti, da so gingipaini proteaze, ki skrbijo za dobrobit bakterijskih celic in jih poskušajo obvarovati pred napadom imunskega sistema, hkrati pa jim zagotoviti dovolj hranil za preživetje. Vemo tudi, da se na površini bakterij *P. gingivalis* sprožita obe aktivacijski poti komplementa, klasična in alternativna [191].

Popadiak in sodelavci [173] so postavili izredno zanimivo teorijo, da gingipaini pri nizkih koncentracijah komplement aktivirajo. To dosežejo na dva načina:

- 1.) preko cepitve C3, C4 in C5 in posledično tvorbe aktivnih fragmentov C3a in C5a kot anafilatoksinov ter C3b, C4b in C5b, ki so potrebni za kaskado aktivacije komplementa;
- 2.) preko aktivacije kompleksa C1, ki se nato veže na površino celic, ki sicer niso zaznane kot tujki.



Slika 20: Shema aktivacijskih poti komplementa z označenimi mesti, kjer lahko gingipaini posredujejo in se vmešajo. Povzeto po [152].

Aktivacija komplementa sproži vnetje in posledično dotok hranil, ki so nujno potrebna za preživetje bakterij. Na ta način je komplement za bakterije koristen, hkrati pa jih ne uniči, saj so bakterije *P. gingivalis* odporne na komplementno lizo celic. Prednost tega ni samo preživetje bakterij, pač pa tudi čiščenje konkurence. V obzornih žepkih namreč niso prisotne samo *P. gingivalis*, pač pa še veliko drugih bakterij, ki se vse potegujejo za isti dotok hranil. S tem ko *P. gingivalis* sproži aktivacijo komplementa, ki ga same preživijo, se lahko znebijo okoliških tekmecev za hrano.

Nasprotno pa je pri višjih koncentracijah gingipainov. Takrat gingipaini komplement inaktivirajo tako, da razgradijo aktivne komponente, npr. C3, C4 in C5 in tako preprečijo škodljiv vpliv komplementa na bakterijske celice. Najverjetneje je inaktivacija komplementa prisotna v relativni bližini bakterij *P. gingivalis*, kjer je tudi koncentracija

gingipainov najvišja. Z oddaljenostjo od bakterij tudi koncentracija gingipainov gradientno pada in na določeni razdalji, ko je količina gingipainov dovolj majhna, je aktivacija komplementa spet mogoča [152, 173].

Poleg razgradnje komponent komplementnega sistema pa so gingipaini sposobni tudi bolj prefinjenih taktik izogiba komplementu. Namreč adhezijske domene HRgpA in Kgp na površini bakterijskih celic lahko nase vežejo inhibitor komplementa, C4BP (*C4-binding protein*, C4 vezavni protein) [192]. Ta inhibitor je navadno v topni obliki in kroži po serumu ter preprečuje aktivacijo klasične ali lektinske poti na napačnih površinah, to je na površinah lastnih celic. Deluje na način, da preprečuje tvorbo C3-konvertaze oz. njen čim prejšnji razpad [5]. Z vezavo C4BP na svojo površino se *P. gingivalis* zamaskirajo in preprečijo aktivacijo komplementa.

Šeding inhibitorja komplementa CD46 je verjetno najbolj regulirana oblika obrambe pred komplementnim sistemom. Ta inhibitor se v normalnih pogojih nahaja na površini gostiteljskih epitelijskih celic in preprečuje aktivacijo komplementa na lastnih celicah na način, da poskrbi za hitro disociacijo C3-konvertaze, ki pomotoma nastane na epitelijskih celicah, hkrati pa je tudi kofaktor za faktor I. Skupina Mahtout-a in sodelavcev [193] je pokazala, da je za ta šeding odgovoren Kgp. Topna oblika inhibitorja CD46 ni aktivna in je podvržena nadaljnji razgradnji. Na ta način gingipaini poskrbijo, da lastne epitelijske celice postanejo dovzetne za napad komplementa, čemur sledi celična smrt teh celic ter začetek vnetja. To pa za bakterije pomeni dotok hranil in nadaljnje preživetje [193].

1.2.3.3.7 Gingipaini kot šedaze

V zadnjih desetletjih, odkar se je pojavil pojem šeding, je tudi vedno več odkritij novih šedaz. Med drugim so tudi gingipaini prišli na seznam proteaz s šedazno aktivnostjo [194, 195]. Vsekakor to odpira številna vprašanja. Ali so gingipaini res šedaze? Ali svoje substrate samo odcepijo s površine celice, ali pa mu sledi tudi razgradnja odcepljene domene? Je morda šeding samo prvi korak v razgradnji membranskih proteinov s strani gingipainov? V literaturi so mnenja in opažanja deljena, na kratko pa so predstavljena v nadaljevanju.

CD14 je koreceptor za prepoznavo LPS in se nahaja na površini monocitov in makrofagov. Zanj je bilo ugotovljeno, da pri nizkih koncentracijah gingipainov in kratkem času inkubacije monocitov z gingipaini, šeding dejansko poteka, saj je bila odcepljena zunajcelična domena detektirana v raztopini. Pri daljših časih inkubacije in višji koncentraciji gingipainov pa najverjetneje pride do popolne razgradnje receptorja. Znano je tudi, da sta gingipaina HRgpA in Kgp, ki vsebujeta hemaglutininske domene, hitrejša pri procesiranju receptorja CD14 [196, 197].

V skupino možnih substratov gingipainske šedazne aktivnosti spada tudi že prej omenjeni inhibitor komplementnega sistema CD46, ki se nahaja na površini dlesničnih epitelijskih celic in ga Kgp po šedingu popolnoma razgradi [193], ter receptor C5aR na površini polimorfonuklearnih nevtrofilcev. Skupina Jagels-a in sodelavcev je predstavila hipotezo, da morajo za šeding in razgradnjo tega receptorja sodelovati vsi gingipaini. Kgp je prvi, ki cepi N-končni del C5aR in sproži rahlo konformacijsko spremembo. S tem postane dostopnih nekaj argininskih ostankov, za katerimi lahko RgpB in HRgpA cepita peptidno vez in tako razgradita tudi ta receptor [190]. Torej tudi v tem primeru pride do popolne razgradnje substrata.

Nadalje imajo gingipaini vpliv na površinske receptorje celic T, saj je bilo pokazano, da HRgpA cepi CD8, ter v manjši meri tudi CD4. Enako velja za receptor CD2, ki se prav tako nahaja na površini celic T. Za nobenega od teh receptorjev ni znano, kaj se zgodi po začetnem šedingu; poteče nadaljnja razgradnja ali ostane samo pri šedingu? [177, 178]

Za signalizacijo med (imunskimi) celicami so citokini bistvenega pomena in seveda so bakterije *P. gingivalis* razvile mehanizem, kako lahko posredujejo tudi na tem področju. Tako je veliko citokinskih receptorjev tudi substratov za gingipaine. IL-6R (receptor za IL-6) je najprej odcepljen s površine celice, temu pa sledi takojšnja razgradnja, za katero sta odgovorna oba R-gingipaina. Druga možnost je, da šeding sploh ne poteče, pač pa razgradnja poteče kar direktno na površini [198]. Naslednji citokinski receptor je CD27 na površini celic T, ki veže citokin CD70. HRgpA in Kgp najprej odcepita receptor s površine, vendar temu kmalu sledi razgradnja [199]. Šeding membranskega $\text{TNF}\alpha$ začne gingipain HRgpA, medtem ko RgpB poskrbi za nadaljnjo degradacijo. Oba R-gingipaina sta prav tako odgovorna za razgradnjo TNFR I in TNFR II receptorjev. Vse skupaj pa rezultira v nepravilni komunikaciji med celicami in nepravilnem odzivu organizma na prisotnost bakterij [200].

Edini primer pravega šedinga je protein Syndecan-1, ki je koreceptor za različne rastne faktorje in proteine zunajceličnega matriksa. Pokazano je bilo, da po šedingu z gingipaini odcepljena zunajcelična domena sodeluje pri uravnavanju vnetja [194].

Pod črto gre torej v večini primerov za razgradnjo zunajceličnih membranskih proteinov, šeding pa je le občasen pojav ali pa prvi korak v prej omenjeni razgradnji [201].

Poglavje 2

Namen dela in hipotezi

2.1 Namen dela

Cisteinske proteaze so pomembni akterji v številnih fizioloških procesih, kot na primer v homeostazi, razvoju tkiv, predstavljanju antigenov, delovanju imunskega sistema, pa tudi v bolezenskih stanjih. Nekateri mehanizmi delovanja cisteinskih proteaz v določenih okoliščinah, pa tudi njihova vloga v zunajceličnem prostoru še niso pojasnjeni, a so ključni za razumevanje bolezni in potencialni razvoj zdravil. Tako so bile cisteinske proteaze in njihov vpliv na zunajcelične proteine v primeru dveh bolezni; raka in paradontalne bolezni osrednja točka tega doktorskega dela.

S študijem cisteinskih katepsinov smo želeli določiti njihovo vlogo pri aktivaciji komplementa na površini tumorskih celic. Cilj raziskave je bil ugotoviti, katera izmed aktivacijskih poti komplementa ima pri tem glavno vlogo in katera stopnja v aktivacijski kaskadi je bistvena. Želeli smo tudi določiti tarče katepsinov, ki se nahajajo na zunanji strani membrane tumorskih celic in so povezane z opaženo zmanjšano aktivnostjo komplementa.

V drugem delu smo se posvetili bakterijskim proteazam - gingipainom in poskušali pojasniti njihovo vlogo pri pojavu in napredovanju paradontalne bolezni. Tudi v tem primeru nas je zanimalo, kakšen vpliv imajo gingipaini na aktivacijo komplementa na površini dlesničnih epitelijskih celic, ter ali vplivajo na njih še na kakšen drug način – na katerega in kako?

2.2 Hipotezi

Glede na dve skupini preiskovanih skupin proteaz, sta tudi hipotezi dve:

- 1) Cisteinski katepsini lahko spremenijo površino tumorskih celic do te mere, da jih komplementni sistem ne prepozna kot imunogene.
- 2) Gingipaini lahko spremenijo površino dlesničnih epitelijskih celic in jih naredijo bolj občutljive za napad imunskega sistema.

Poglavje 3

Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

- Ac-Lys-pNA, acetil-Lys-4-nitroanilid HCl (Bachem)
- ACN, acetonitril LC-MS (JT Baker)
- Akrilamid (VWR Chemicals)
- Annexin-V-FITC in vezavni pufer za Annexin (ThermoFischer Scientific)
- APS (amonijev persulfat) (Serva)
- Barbiturna kislina, pirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-trion (Sigma-Aldrich)
- BCA reagent (Thermo Scientific)
- Bradfordov reagent (Biorad)
- Bromfenol modro (Serva)
- BSA, serumski albumin goveda, *bovine serum albumin* (New England Biolabs)
- Biotiniliran C1q (pripravljen v laboratoriju dr. Anne Blom na Univerzi Lund, Malmö, Švedska)
- $\text{CaCl}_2 \times 6(\text{H}_2\text{O})$, kalcijev klorid (POCH, Sigma)
- CH_3COONa , natrijev acetat (Merck)
- Coomassie Brilliant Blue R-250
- Deoksiholna kislina (Sigma Aldrich)
- DMSO, dimetil-sulfoksid (Merck)
- DTT, ditiotreitol (Sigma)
- EDTA, etilendiamintetraocetna kislina (Serva)
- EGTA, etilenglikoltetraocetna kislina [202]
- Etanol (Merck)
- FBS, fetusni serum goveda (Gibco)
- Hi-FBS, toplotno inaktiviran FBS
- Formaldehid (Sigma)
- Svinjski gelatin
- Glicerol (Serva)
- Glicin (Alfa Aesar)
- Glutamin (Lonza)
- HEPES, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina (Serva, BioShop)
- IAA, jodoacetamid (Sigma)
- L-BAPNA, $\text{N}\alpha$ -Benzoil-L-Arg-4-nitroanilid HCl (Bachem)
- L-Cys-HCl- H_2O (BioShop, Sigma Aldrich)
- LeuLeu-O-Me, L-levcin-L-levcin metilni ester (Sigma)

- NaDS (Thermo Scientific)
- Metanojska kislina (Fluka)
- 0,1% metanojska kislina v vodi (JT Baker)
- Metanol (Merck)
- $\text{MgCl}_2 \times 6(\text{H}_2\text{O})$, magnezijev klorid (Sigma Aldrich, BioShop)
- mleko v prahu (Pomurske mlekarne)
- Na-barbital, natrij;5,5-dietil-4,6-dioksa-1H-pirimidin-2-olat (Sigma-Aldrich)
- NaCl, natrijev klorid (AppliChem, POCH)
- NaDS, natrijev dodecil sulfat (Serva)
- NaH_2PO_4 , natrijev dihidrogenfosfat (Merck)
- Na_2HPO_4 , dinatrijev hidrogenfosfat (Merck)
- NaN_3 , natrijev azid (Fisher Chemicals)
- NH_4HCO_3 , amonijev hidrogenkarbonat (Fluka)
- NP-40, Nonident P40 oz. Oktilfenoksipolietoksiletanol (Roche Diagnostics)
- Ocetna kislina (VWR Chemicals)
- Penicilin/streptomycin (Lonza)
- PMA, forbol-12-miristat-13-acetat (Sigma)
- Propidijev jodid (Sigma)
- Proteinska lestvica za SDS-PAGE, PageRuler Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas)
- Raztopina za brezencimsko odlepljanje celic, *Hanks' balanced salt solution* (Millipore)
- Raztopina za odstranjevanje imunskih kompleksov, Re-Blot Plus Strong Solution (Chemicon Int.)
- Staurosporin (Sigma Aldrich)
- TCEP, tris(2-karboksietil)fosfin (Sigma Aldrich)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin) (Merck)
- Tripan modro (Sigma)
- 0,25% Trypsin (Gibco)
- TrypLE Select, tripsin (Gibco)
- Tris, tris(hidroksimetil)aminometan (Serva, BioShop)
- Tween-20 (Serva)
- Urea (Merck)
- Voda LC-MS-CHROMASOLV (Riedel de Haen)
- Z-Phe-Arg-AMC, N-benzoiloksikarbonil-fenilalanil-arginil-7-amino-4-metilkumarin, (Bachem)

3.1.2 Pufri

- DPBS, Dulbeccov fosfatni pufer z NaCl (Lonza)
- DPBS brez Ca^{2+} in Mg^{2+} (Lonza)
- PBS:
 - 145 mM NaCl
 - 2,5 mM NaH_2PO_4
 - 7,5 mM Na_2HPO_4
 - pH 7,4
- PBS+:
 - DPBS (Lonza)
 - 30 mM NaN_3

- PBS++:
 - DPBS (Lonza)
 - 30 mM NaN_3
 - 1% BSA
- PBST:
 - DPBS (**Lonza**)
 - 0,1% Tween-20
- PBS z EGTA in dodanim magnezijem:
 - DPBS (Lonza)
 - 10 mM EGTA
 - 72 mM MgCl_2
 - pH 7,0
- Založna raztopina VBS:
 - 720 mM NaCl
 - 9,0 mM Na-barbital
 - 15,5 mM barbiturna kislina
 - pH 7,35
- GVB++:
 - Raztopina VBS
 - 0,1% svinjski gelatin
 - 1mM MgCl_2
 - 0,15mM CaCl_2
- Pufer TNC:
 - 100 mM Tris, pH 7,5
 - 150 mM NaCl
 - 5 mM CaCl_2
- Pufer TNCT:
 - Pufer TNC
 - 0,05% Tween-20
- Pufer TNCT-a
 - Pufer TNCT
 - 20 mM L-Cys, pH 7
- Pufer za šeding:
 - DPBS (Lonza)
 - 0,5 mM DTT
 - pH 6,0
- Acetatni pufer:
 - 50 mM CH_3COONa
 - 150 mM NaCl
 - 0,5 mM EDTA
 - pH 6
- Pufer RIPA:
 - 50 mM Tris, pH 7,4
 - 100 mM NaCl
 - 0,1% NaDS
 - 1% NP-40
 - 0,5% deoksiholna kislina
 - 1 mM EDTA

- Vezavni pufer za C1q:
 - 72 mM NaCl
 - 2,5 mM HEPES, pH 7,4
 - 1 mM MgCl₂
 - 0,15 mM CaCl₂
- Pufer za spiranje C1q – 1:
 - 300 mM NaCl
 - 3 M urea
 - 0,1% NaDS
 - 1 mM EDTA
 - 100 mM Tris, pH 7,4
- Pufer za spiranje C1q – 2:
 - 300 mM NaCl
 - 3 M urea
 - 0,1% NaDS
 - 1 mM EDTA
 - 10% etanol
 - 100 mM Tris, pH 7,4
- 6x nanašalni pufer za NaDS-PAGE:
 - 300 mM Tris
 - 100 mM NaDS
 - 40 mM EDTA
 - 1,2 M DTT
 - 60% glicerol
 - 0,3% bromfenol modro
- Pufer za NaDS-PAGE elektroforezo:
 - 25 mM Tris
 - 192 mM L-glicin
 - 0,1% NaDS
- Pufer za prenos po Westernu
 - 25 mM Tris
 - 190 mM L-glicin
 - 20% metanol
- Coomassie raztopina za barvanje gela:
 - 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250
 - 50% metanol
 - 10% očetna kislina
- Raztopina za razbarvanje barvila Coomassie – 1:
 - 50% metanol
 - 10% očetna kislina
- Raztopina za razbarvanje barvila Coomassie – 2:
 - 25 mM NH₄HCO₃
 - 50% ACN
- Raztopina za redukcijo:
 - 25 mM NH₄HCO₃
 - 10 mM DTT
- Raztopina za alkilacijo:
 - 25 mM NH₄HCO₃
 - 55 mM IAA

- Pufer za tripsin (Promega)
- Raztopina za ekstrakcijo peptidov iz gela
 - 50% ACN
 - 5% metanojska kislina
- Raztopina za elucijo peptidov s kolone C18
 - 60% ACN
 - 0,1% metanojska kislina
- Topilo A:
 - 80% ACN
 - 3% očetna kislina
- Topilo B:
 - 0,1% metanojska kislina

3.1.3 Proteaze

- Humani katepsin L, izražen v *P.pastoris* (Institut »Jožef Stefan«)
- Humani katepsin S, izražen v *P.pastoris* (Institut »Jožef Stefan«)
- Modificiran tripsin iz prašičje trebušne slinavke (Promega)
- Gingipain RgpB, izoliran iz *P. gingivalis* (Univerza v Louisville)
- Gingipain HRgpA, izoliran iz *P. gingivalis* (Univerza v Louisville)
- Gingipain Kgp, izoliran iz *P. gingivalis* (Univerza v Louisville)

3.1.4 Inhibitorji

- E-64, (2S,3S)-trans-epoksisukcinil-L-levcilamido (4-gvanidino) butan (Peptide Institute)
- Batimastat, (4-N-Hydroxyamino)-2*R*-isobutyl-3*S*-(thienylthiomethyl)succinyl)-L-phenylalanine-N-methylamide (Merck)
- Mešanica proteaznih inhibitorjev (Sigma)
- KYT-1, (3S)- N-[(1S)-5-amino-1-(N,N-dimetilkarbamoil)pentil]-3-[(2S)-6-amino-2-(benziloksikarbonil)aminoheksanoilamino]-6-guanidino-2-oksoheksanamide (Peptide Institute)
- KYT-36, (2S)-N-[(1S)-1-(4-Aminobutil)-2-okso-2-(N-benzilkarbamoil)etil]-N'-(N-metilfenilamino)-2-[(benziloksikarbonil)amino]pentan-1,5-diamid (Peptide Institute)

3.1.5 Protitelesa

- Zajčja protitelesa proti humanemu C3c, konjugirana s FITC (#F0201, DAKO)
- Zajčja protitelesa proti humanemu C4c, konjugirana s FITC (#Q0369, DAKO)
- Zajčja protitelesa proti humanemu C1q, konjugirana s FITC (#A0136, DAKO)
- Mišja protitelesa proti humanemu C5-9 (#M0777, DAKO)
- Mišja protitelesa proti humanemu katepsinu L (#ab62710, Abcam)
- Kozja protitelesa proti humanemu katepsinu S (#AF1183, R&D Systems)
- Mišja protitelesa proti humanemu katepsinu B (Institut Jožef Stefan)
- Kozja sekundarna antimišja protitelesa, konjugirana z Alexa Fluor 488 (#A-11001, Thermo Fisher)
- Zajčja sekundarna antikozja protitelesa, konjugirana z Alexa Fluor 488 (#A-11078, Thermo Fisher)
- Kozja protitelesa proti humanemu TFRC (#af2474, R&D)

3.1.6 Serum

- NHS, naravni humani serum, izoliran iz krvi darovalcev
- dNHS, toplotno inaktivirani naravni humani serum, izoliran iz krvi darovalcev
- humani serum brez C1q (Quidel)
- humani serum brez faktorja B (Quidel)

3.1.7 Celične linije

- MDA-MB-231 (ATTC, HTM-26), epitelijske celice, adenokarcinom mlečne žleze
- U-937 (ATTC, CRL-1593.2), monociti, levkemijski monocitni limfom
- HeLa (ATTC, CCL-2), epitelijske celice, adenokarcinom materničnega vratu
- Caco-2 (ATTC, HTB-37), epitelijske celice, kolorektalni adenokarcinom
- TIGK (pripravil prof. Richard J. Lamont, Univerza v Louisvillu, Dentalni oddelek), epitelijske celice, imortalizirani dlesnični keratinociti

3.1.8 Gojišča za celice

- DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom (Lonza, Gibco, Sigma), obogaten z 10% FBS, 1% glutaminom in 1% penicilinom/streptomycinom
- RPMI 1640 z L-glutaminom (Sigma), obogaten z 10% Hi-FBS, 1% glutaminom in 1% streptomycinom/penicilinom
- KGM-Gold BulletKit (Lonza)
- Zamrzovalni medij
 - 90% FBS ali Hi-FBS (za U-937)
 - 10% DMSO

3.1.9 Bakterije

- W83, divji tip *P.gingivalis* (American Type Culture Collection, Rockville, Md., ZDA)
- $\Delta kArAB$, sev W83 z izbitimi geni za RgpB, HRgpA in neaktivnim Kgp
- $\Delta rgpAB$, sev W83 z izbitima genoma za RgpA in RgpB
- Δkgp , sev W83 z neaktivnim Kgp

3.1.10 Gojišča za bakterije

- Anaerobno tekoče gojišče:
 - 28,3 g/L Bulion Schaedler (BTL Społka)
- Anaerobni krvni agar:
 - 28,3 g/L Bulion Schaedler (BTL Społka)
 - 15 g/L agar (BTL Społka)
 - 1 mL/L vitamin K (Sigma Aldrich)
 - 50 mL/L ovčja kri z odstranjenim fibrinom (Proanimal Wrocław)

3.1.11 Predpripravljeni reagenti

- Streptavidinske magnetne kroglice (Invitrogen)
- 12% Tris-Glicin gel za NaDS PAGE elektroforezo (Lonza)
- ECL reagent za kemiluminiscenco (Amersham Pharmacia Biotech)

- Raztopini za temnico: razvijalec Mediphot E90 in fiksir Mediphot F90 (Colenta Labortehnik)

3.1.12 Laboratorijska oprema

- Avtomatska temnica SRX-101A (Konica Minolta)
- Avtomatske pipete in pipetorji (Eppendorf)
- Empore™ C18 membrana (Sigma Aldrich)
- Centrifuge Eppendorf
- Centrifugirke (15 ml in 50 ml) (Falcon)
- Centrifugirke (500 µL, 1,5mL in 2 mL) (Eppendorf)
- Epruvete za pretočni citometer (Corning Bioscience)
- Filmi Biomax Light film (Kodak, Carestream)
- Fluorimeter za mikrotitrne plošče Infinite M1000 Pro (Tecan) in Flexstation III (Molecular Devices)
- Hemocitometer (Brand)
- Inkubator za celične linije s kontrolirano atmosfero (Binder, Thermo Scientific)
- Kasete za razvijanje filmov X-omatic regular screens (Kodak)
- Komora za anaerobno delo z bakterijami, Whitley A85 anaerobic workstation, (Don Whitley Scientific)
- Komplet za elektroforezo NaDS-PAGE (Biorad)
- Komplet za prenos po Westernu P8DS Penguin (Owl Separation Systems, Biorad)
- Koncentratorji s filtrskimi vstavki MWCO 3.000 (Milipore)
- Laminar (Iskra PIO, Bioair Instruments)
- Masni spektrometer Orbitrap LTQ Velos (Thermo Scientific), povezan z EASY-nanoLCII HPLC enoto Proxeon (Thermo Scientific)
- Nitrocelulozna membrana NC45 (Sigma)
- pH-meter (Metrel)
- Petrijevke in polistirenske steklenice za gojenje celičnih linij in bakterij (TPP, Corning, Greiner)
- Posoda za anaerobno gojenje bakterij (Biomérieux)
- Posoda za zamrzovanje celic s počasnim ohlajanjem, Mr. Frosty (Nalgene)
- Pretočni citometer FACSCalibur (Becton Dickinson) z vzbujevalno svetlobo 488nm ter emisijsko svetlobo s filtri FL1: 515 – 545 nm, FL2: 564 – 606 nm, FL3: > 670 nm
- Sonifikator (Branson)
- Svetlobni mikroskop s CO₂ komoro (Olympus IX 81) in črno-bela kamera (Hamamatsu Orca R²)
- Vakuumska črpalka Speed Vac (ABM)
- Vibracijski mešalnik z možnostjo gretja Thermomixer compact (Eppendorf)
- Vrečke za vezavo kisika, AeroGen 2,5L (Thermo Scientific)
- Zamrzovalne vialne (TPP)

3.2 Metode

3.2.1 Gojenje celičnih linij

Celične linije smo gojili v inkubatorju v celičnem laboratoriju. Za optimalno rast celice potrebujejo konstantno temperaturo 37°C ter nadzorovano atmosfero s 5% CO_2 ter zrak nasičen z vodno paro. Celične linije MDA-MB-231, HeLa in Caco-2 so adhezijske, kar pomeni, da se celice pritrdijo na podlago. Zato smo jih gojili v plastičnih petrijevkah s premerom 10 cm ali 15 cm. Gojišče za te celice je bilo DMEM, obogateno z 10% FBS, 1% glutaminom in 1% mešanico antibiotikov penicilin/streptomycin. Celice TIGK smo prav tako gojili v petrijevkah, gojišče pa je bilo KGM-Gold. Nasprotno pa so celice U-937 suspenzijske celice, torej rastejo in se delijo v tekočini, zato smo jih gojili v ploščatih posodah z zračnim ventilom v velikosti 25 cm^2 ali 75 cm^2 . Gojišče smo vsem celicam menjali na 2 - 3 dni.

3.2.2 Odtajanje celic

Zamrznjene celice smo iz tekočega dušika ali zamrzovalnika (-80°C) na ledu prinesli v celični laboratorij, kjer smo jih v vodni kopeli na 37°C segrevali 1 minuto.

V primeru adhezijskih celic (MDA-MB-231, HeLa, Caco-2 ter TIGK) smo celice nato resuspendirali v 10 mL predhodno ogretega gojišča (37°C) na petrijevki, suspenzijo smo rahlo premešali in pustili počivati v inkubatorju 24 h. Naslednji dan smo celicam zamenjali gojišče.

V primeru suspenzijskih celic (U-937) pa smo celice resuspendirali v 10 mL toplega gojišča, jih 5 minut centrifugirali pri 300x g, odsesali supernatant, celice v peletu pa ponovno resuspendirali v toplu gojišču ter prestavili v ploščato steklenico.

3.2.3 Precepljanje celic in štetje živih celic

Ko so bile celice konfluentne in so dosegle maksimalno 98% pokritost dna petrijevke, jih je bilo potrebno precepiti.

Adhezijskim celicam MDA-MB-231, HeLa in Caco-2 smo v ta namen najprej odstranili staro gojišče, jih sprali z DPBS in nato dodali TrypLE Select raztopino. Take celice smo približno 5 minut inkubirali pri 37°C . Ko so se celice odlepili od površine, smo jih nežno sprali s curkom DPBS ali gojišča ter jih precepili na nove plošče in dodali sveže gojišče.

TIGK celice so se na površino petrijevke pritrdile posebno močno, zato smo jih po odstranitvi starega medija sprali z DPBS brez Ca^{2+} in Mg^{2+} , jih prekrili s TrypLE Select raztopino ali tripsinom (Trypsin, Gibco) ter inkubirali pri 37°C do 20 minut. Vmes smo petrijevko občasno pretresli, da se je disociacija pospešila. Ko so se celice odlepili, smo jih z nežnim curkom starega gojišča prenesli v centrifugirko ter jih pri 300x g centrifugirali 5 minut. Supernatant smo zavrgli, celice v peletu smo resuspendirali v svežem mediju in ga nato prenesli na novo petrijevko.

Suspenzijske celice U-937 smo precepili tako, da smo želen delež volumna suspenzije centrifugirali 5 minut pri 300x g, supernatant zavrgli, celice v peletu pa resuspendirali v svežem gojišču ter ga nato prenesli v nove ploščate steklenice.

Delež živih celic smo določali s pomočjo hemocitometra in barvila Tripan modro. Slednje ne prehaja preko intaktne celične membrane in ne obarva živih celic. Kadar so celice mrtve oz. poškodovane, pa membrana barvilo prepusti v notranjost. Tako pod mikroskopom lepo razločimo žive celice, ki so svetle barve od mrtvih celic, ki so se obarvale modro.

Za štetje celic smo uporabili hemocitometer oz. Neubauerjevo komoro za določanje koncentracije celic. Le-ta se deli na 9 večjih kvadratov. V 4 kvadratih smo prešteli celice, nato pa po spodnji enačbi izračunali koncentracijo živih celic [celic/mL]:

$$c(\text{celic}) = \frac{N(\text{prešteti}h\text{ celic})}{4} \times 10^4 \quad (3.1)$$

Da smo to štetje lahko izvedli, smo vzeli 10 μL iz suspenzije odlepljenih in centrifugiranih celic, jih prenesli v svežo centrifugirko ter dodali 10 μL barvila Tripan modro. Od te mešanice smo vzeli 10 μL in jo prenesli v hemocitometer. Pod svetlobnim mikroskopom smo prešteli žive, torej svetle celice, izračunali koncentracijo po zgornji enačbi (3.1) ter rezultat pomnožili za faktor redčitve, torej 2.

3.2.4 Zamrzovanje celic

Ko je bilo potrebno celice zamrzniti, smo jih najprej odlepili s površine petrijevke (v primeru adhezijskih celic; opisano v poglavju 3.2.3), suspenzijo nato centrifugirali 5 minut pri 300x g, odstranili gojišče, pelet celic pa resuspendirali v DPBS. Sledilo je še eno centrifugiranje: 5 minut pri 300x g. Spet smo odstranili supernatant, celice pa resuspendirali v zamrzovalnem mediju (90% FBS ali Hi-FBS in 10% DMSO). Tako pripravljene celice smo po 1 mL razdelili v vial in jih vstavili v posodo za zamrzovanje, ki omogoča počasno ohlajanje vsebine, in postavili v zmrzovalnik na -80°C . Po 24 h smo celice prestavili iz posode za zamrzovanje v škatlo za shranjevanje vial v zamrzovalniku.

3.2.5 Določanje deleža živih oz. apoptotskih celic

Za določitev deleža živih oz. apoptotskih celic v vzorcu smo uporabili označevanje in barvanje celic z Annexin-V-FITC in s propidijevim jodidom (PI).

Kmalu po začetku apoptoze se na površini celic izpostavi protein fosfatidil serin (PS), na katerega se z močno afiniteto veže protein Annexin-V. Ker je le-ta konjugiran s fluorescenčnim barvilom FITC, fluorescein izotiocianat, lahko zgodnje apoptotske celice štejemo na pretočnem citometru. V pozni fazi apoptoze ali pri nekrozi pa so celične membrane prepustne in propidijev jodid lahko vstopi v celico in se kot interkelator veže na DNA ter celice obarva. S kombinirano uporabo barvil Annexin-V in propidijev jodid lahko določimo delež zgodnje in pozno apoptotskih celic.

Za izvedbo te metode smo potrebovali celice v suspenziji. Adhezijske celice smo torej naprej odlepili s površine s pomočjo tripsina (postopek opisan v poglavju 3.2.3), nato pa dobljeno suspenzijo adhezijskih celic centrifugirali 5 minut pri 300x g. V primeru suspenzijskih celic smo prvi korak preskočili in šli direktno na centrifugiranje. Centrifugiranim celicam smo odstranili supernatant, pelet pa resuspendirali v DPBS ter celice prešteli s pomočjo Neubauerjeve komore. Volumen suspenzije, kjer je bilo 10^6 celic/mL, smo ponovno centrifugirali 5 minut pri 300x g, nato pa resuspendirali v 1 mL vezavnega pufra za Annexin-V. V epruveto za pretočno citometrijo smo prenesli 100 μL te suspenzije in dodali 2 μL Annexin-V-FITC. Sledilo je 15-minutno inkubiranje v temi, nakar smo dodali še 300 μL vezavnega pufra ter 2 μL PI. Delež živih, apoptotskih oz. nekrotskih celic smo določili na pretočnem citometru FACSCalibur in s programom CellQuest.

Kot negativno kontrolo (mrtve, apoptotske celice) smo uporabili celice, ki smo jih 27 h prej tretirali z 1 μM LeuLeu-O-Me ali staurosporinom.

3.2.6 Gojenje anaerobnih bakterij

Anaerobne bakterije *Porphyromonas gingivalis* so obligatorni anaerobi. To pomeni, da za svoje življenje ne potrebujejo kisika, saj jim le-ta škodi. Pri delu smo uporabljali sev W83, ki je divji tip ter njegove mutante. Za te bakterije je primerno gojišče krvni agar, ki smo ga pripravili tako, da smo v erlenmajerico zatehtali Bulion Schaedler in agar, dodali vodo in suspenzijo avtoklavirali. Ko se je raztopina ohladila na približno 50° C, smo aseptično dodali vitamin K in ovčjo kri. Tako pripravljeno gojišče smo vlili v petrijevke s premerom 10 cm. Ko se je agar strdil, smo na gojišče razmazali bakterije, petrijevko pokrili in zložili v posodo za anaerobne bakterije. Petrijevke so morale biti obrnjene z gojiščem navzgor, da se prepreči nabiranje kondenza. V posodo smo dodali vrečko AeroGen, ki veže kisik. Posodo smo neprodušno zaprli in bakterije za 5 - 10 dni shranili v inkubatorju ali »topli« sobi pri temperaturi 37° C.

Dan preden smo nameravali bakterije uporabiti za poskus, smo jih nacepili v »pred-kulturo«, to je v tekoč medij, sestavljen le iz vode in Bulion Schaedler. Bakterije v pred-kulturi smo za 24 h shranili v anaerobno komoro s kontrolirano atmosfero (85% N₂, 10% CO₂ in 5% H₂, ter 37° C).

3.2.7 Odtajanje anaerobnih bakterij

Vialo z zamrznjenimi bakterijami smo vzeli iz tekočega dušika ali zamrzovalnika (-80° C) in jo na ledu prinesli v laboratorij za delo z bakterijami. 1 minuto smo vialo segrevali v vodni kopeli na 37° C, nato pa vsebino s pipeto prenesli na ploščo s krvnim agarjem in bakterijsko kulturo z ezo enakomerno razmazali.

3.2.8 Precepljanje anaerobnih bakterij

Ko so bakterije dosegle želeno gostoto na krvnem agarju, smo jih precepili ali na novo ploščo ali pa v pred-kulturo.

Za precepljanje na ploščo smo uporabili cepilno zanko, s katero smo pobrali malo bakterijske kulture z osnovne plošče ter jo razmazali po novi plošči, ki smo jo spet shranili v anaerobni posodi v topli sobi.

Za nacepljanje v pred-kulturo pa smo uporabili vatenko (vateno palčko), z njo pobrali nekaj kulture z osnovne plošče, nato pa jo resuspendirali v 3 mL tekočega gojišča ter shranili v anaerobni komori. Centrifugirko s pred-kulturo smo vedno zaprli samo napol in s tem omogočili dostop anaerobnih plinov do kulture.

3.2.9 Izolacija seruma

Izolacijo seruma smo pripravili po ustaljenem postopku [203]. Kri darovalcev je bila odvzeta v vialo brez antikoagulantov. Vzorce krvi smo najprej 30 minut inkubirali pri sobni temperaturi, da so se eritrociti posedli. Sledila je 1-urna inkubacija na ledu, kjer je bilo pomembno, da so bile vialo v enakem položaju kot med prejšnjo inkubacijo. Nato smo kri centrifugirali 7 minut pri 700x g in 4° C, prenesli supernatant (serum) v nove centrifugirke, pelet pa zavrgli. Ponovili smo 7-minutno centrifugiranje pri 700x g in 4° C. Supernatant (serum) smo zbrali v eni veliki centrifugirki. Tako zmešan serum darovalcev smo še nežno pretresli nato pa alikvotirali in shranili na -80° C.

3.2.10 Določanje celotne proteinske koncentracije

Za določanje celokupne koncentracije proteinov v vzorcu smo uporabili dve kolorimetrični metodi.

Bradfordova metoda temelji na vezavi barvila Coomassie Brilliant Blue v kislem mediju na proteine. Pri tem nastane kompleks med barvilom in pozitivno nabitimi aminokislinami, ki absorbira barvo pri 595 nm. Za pravilno določitev koncentracije, je potrebno pripraviti umeritveno krivuljo, šele nato smemo meriti koncentracijo proteinov v vzorcu. Za pripravo umeritvene krivulje smo na ploščo s 96 jamicami odpipetirali po 160 μL BSA (*bovine serum albumin*; goveji serumski albumin) v koncentracijskem območju 0 – 25 $\mu\text{g/mL}$, ter dodali 40 μL Bradfordovega reagenta. Vzorec smo redčili od 1:10 do 1:1000, odvisno od vsebnosti proteinov. 160 μL vzorca smo odpipetirali v jamico na plošči ter mu dodali 40 μL Bradfordovega reagenta. Absorbanco smo pomerili na čitalcu za mikrotitrne plošče Tecan Infinite M1000 Pro pri valovni dolžini 595 nm, koncentracijo proteinov v vzorcu pa izračunali iz umeritvene krivulje. Vzorec smo vedno pomerili v treh ponovitvah.

Birenska metoda temelji na redoks reakciji reagenta BCA, kjer iz Cu^{2+} nastaja Cu^+ . Slednji se veže v koordinacijsko spojino z aminokislinami v bazičnem in tvori vijoličen kompleks, katerega absorbanco merimo pri 562 nm. Za umeritveno krivuljo smo pripravili BSA v koncentracijskem območju 0 – 50 $\mu\text{g/mL}$ in odpipetirali po 10 μL BSA standarda v jamico na mikrotitrski plošči, nato pa v vsako jamico smo dodali še po 190 μL BCA reagenta. Vzorec smo redčili v razmerju 1:20 oz. odvisno od vsebnosti proteinov v vzorcu. V jamico na plošči smo dali 10 μL vzorca in 190 μL BCA reagenta, nato pa celotno ploščo 30 minut inkubirali pri 37° C, da se je razvila vijolična barva kompleksa. Absorbanco smo pomerili pri valovni dolžini 562 nm na aparaturi FlexStation III, koncentracijo proteinov v vzorcu pa preračunali iz umeritvene krivulje. Vzorec smo vedno pomerili v treh ponovitvah.

3.2.11 Meritev aktivnosti in aktivne koncentracije proteaz

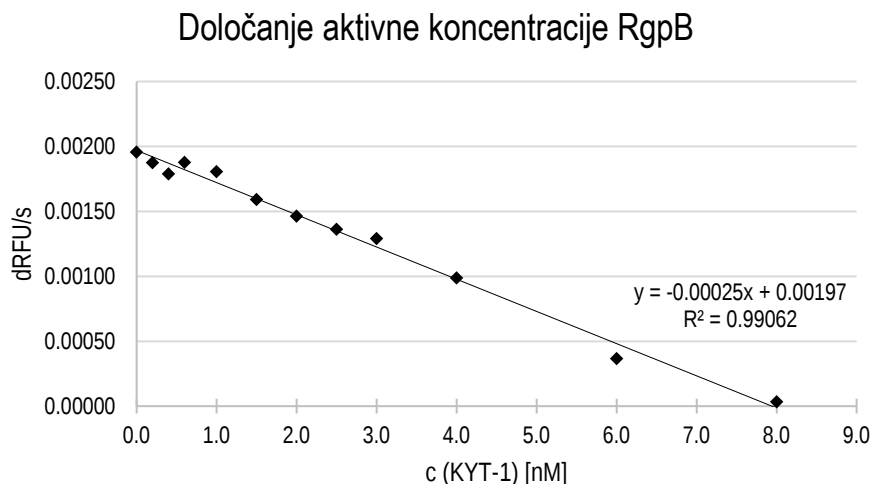
Aktivno koncentracijo proteaz smo določali v sekretomu makrofagov ter v raztopinah izoliranih gingipainov. Samo aktivnost encimov pa smo preverjali v šedomu TIGK celic, tretiranih z gingipaini oz. bakterijami *P. gingivalis*.

V primeru določanja aktivne koncentracije encimov je šlo za titracijo aktivnega mesta encima z inhibitorjem, kjer smo z naraščajočimi koncentracijami inhibitorja postopoma blokirali proteazno aktivnost v vzorcu. Preostalo aktivnost smo merili s pomočjo fluorogenega ali kromogenega substrata. Po meritvi smo narisali graf odvisnosti absorbance oz. fluorescence od časa. Naklon te premice je sorazmeren s hitrostjo reakcije cepitve substrata, zato smo narisali drugi graf: graf odvisnosti hitrosti reakcije od koncentracije inhibitorja ter izračunali koncentracijo aktivnega encima, ki je določena kot presečišče premice tega grafa z abscisno osjo (Slika 21).

V sekretomu makrofagov nas je zanimala aktivna koncentracija cisteinskih katapsinov, zato smo uporabili substrat Z-Phe-Arg-AMC, ki je specifičen za to skupino proteaz, ter inhibitor E-64. V črno mikrotitrsko ploščo smo dali 186 μL vzorca (kar je približno 1 μg proteinov), 2 μL DTT (končna koncentracija v jamici je bila 10 mM) ter 2 μL E-64, pripravljenega v acetatnem pufru. Ploščo smo pokrili in 15 minut inkubirali pri 37°C. Tik pred meritvijo smo v vsako jamico dodali po 10 μL substrata Z-Phe-Arg-AMC, tako da je bila končna koncentracija v jamici 10 μM . Nastajajočo fluorescenco smo merili na Tecan Infinite M1000 Pro z vzbujevalno svetlobo s 370 nm ter emisijsko svetlobo s 460 nm pri temperaturi 37°C, trajanju kinetičnega intervala 10s in dolžino eksperimenta 30 minut.

Aktivno koncentracijo izoliranih gingipainov smo merili po enakem načelu, le da smo v tem primeru uporabili substrat L-BAPNA za HRgpA in RgpB ter substrat Ac-Lys-pNA za Kgp. Inhibitorja pa sta bila KYT-1 za HRgpA in RgpB ter KYT-36 za Kgp. V prozorno

mikrotitrsko ploščo smo odpipetirali po 50 μL 40 nM gingipaina (celotna koncentracija proteina) ter 50 μL inhibitorja (končna koncentracija je bila v razponu od 0 nM do 8 nM), pripravljenega v TNCTa pufru in nato 15 minut inkubirali pri 37° C. Tik pred meritvijo smo v vsako jamico dodali še po 100 μL 1 mM substrata. Meritev smo izvedli na čitalcu mikrotitrskih plošč Tecan Infinite M1000 Pro in Flexstation III.



Slika 21: **Graf odvisnosti hitrosti od koncentracije inhibitorja** – določitev aktivne koncentracije gingipaina RgpB, ki je v tem primeru 7,88 nM.

Šedom TIGK celic je po tretiranju z gingipaini ali bakterijami *P.gingivalis* vseboval še aktivne gingipaine. Za določitev aktivnosti teh proteaz, smo prav tako uporabili metodo titracije aktivnega mesta. Za R-gingipaina je bil uporabljen substrat L-BAPNA in inhibitor KYT-1, za K-gingipain pa substrat Ac-Lys-pNA ter inhibitor KYT-36. V prozorno mikrotitrsko ploščo s 96 jamicami smo odpipetirali po 20 μL vzorca ter ga razredčili z 80 μL pufru TNCTa. Ploščo smo pokrili in 15 minut inkubirali pri 37° C. Tik pred meritvijo smo dodali po 100 μL pripadajočega substrata nato pa absorbanco merili na čitalcu mikrotitrskih plošč Flexstation III s svetlobo z valovno dolžino 405 nm pri temperaturi 37° C, trajanju kinetičnega cikla 20 s in dolžino celotnega eksperimenta 60 minut. Kot pozitivno kontrolo smo vzeli izolirane gingipaine, negativne kontrole pa so bile pufer TNCTa, inhibirani gingipaini in šedom z dodatkom inhibitorjev.

Tabela 5 povzema zgoraj napisane vzorce, substrate, inhibitorje in način meritve njihove koncentracije.

Tabela 5: **Vzorci, substrati in način meritve aktivne koncentracije encimov.**

Vzorec	Pufer	Substrat	Inhibitor	Valovna dolžina
Sekretom makrofagov	Acetatni pufer	Z-Phe-Arg-AMC	E-64	360 nm in 470 nm
Izolirani gingipaini: HRgpA, RgpB	TNCTa	L-BAPNA	KYT-1	405 nm
Izolirani gingipaini: Kgp		Ac-Lys-pNA	KYT-36	
Šedom TIGK	TNCTa	L-BAPNA in Ac-Lys-pNA	KYT-1 in KYT-36	405 nm

3.2.12 Elektroforeza NaDS-PAGE

Elektroforeza je metoda za ločevanje proteinov v vzorcu in temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. PAGE ali poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS pod redukcijskimi pogoji nam omogoča ločevanje proteinov glede na velikost. NaDS je amfipatična molekula, ki se močno veže na protein in ga denaturira. Morebitne disulfidne mostičke med podenotami proteinov prekinemo z dodatkom reducenta.

Gel je sestavljen iz koncentracijskega in ločevalnega dela. Prvi je namenjen koncentriranju vzorca v ozek pas, drugi pa potem ločevanju proteinov v vzorcu. Za pripravo vzorca za masno spektrometrijo smo uporabili predpripravljene gele (12% Tris-Gly gel), za imunodetekcijo pa smo gele pripravili sami (10% ali 12,5% gel). Receptura je v tabeli spodaj (Tabela 6).

Tabela 6: Sestava poliakrilamidnih gelov.

Sestavina	10% ločevalni gel	12,5% ločevalni gel	5% koncentracijski gel
40% akrilamid	2,5 mL	3,13 mL	625 µL
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	/
0,5 M Tris, pH 6,8	/	/	1,25 mL
dH ₂ O	4,9 mL	4,27 mL	3,075 mL
10% NaDS	100 µL	100 µL	50 µL
TEMED	20 µL	20 µL	10 µL
APS	40 µL	40 µL	20 µL

Za pripravo ločevalnega gela smo v čaši zmešali akrilamid, Tris, vodo in NaDS, nato pa v digestoriju dodali še TEMED in APS. Mešanico smo hitro vlili med stekelca v stojalu za pripravo gela. Da se je gel na vrhu poravnal, smo čez dolili približno 0,5 mL butanola. Gel se normalno strjuje 45 minut. Po tem času smo organsko plast (butanol) odlili oz. popivnali s filter papirjem. Pripravili smo mešanico za koncentracijski gel, pri čemer smo sestavine zmešali v enakem zaporedju kot prej in zmes spet hitro vlili na ločevalni gel. Še preden se gel je gel strdil, smo dodali »glavniček«, ki je v koncentracijskem gelu naredil žepke za nanašanje vzorca. Gel se je strdil v 45 minutah in je bil nato pripravljen za uporabo.

Vzorec smo pred nanosom na gel zmešali z nanašalnim pufrom, ki vsebuje DTT (reducent) in ga 5 minut inkubirali pri 99° C. Tako pripravljen vzorec smo nanесли v jamice v gelu, za primerjavo velikosti proteinov pa smo uporabili proteinske standarde PageRuler. Elektroforeza je potekala v pufru za NaDS-PAGE elektroforezo pri konstantni napetosti 120 V. Za barvanje proteinov v gelu smo uporabili 50% Coomassie raztopino za barvanje gela, za imunodetekcijo pa smo gel uporabili za prenos po Westernu (3.2.13).

3.2.13 Prenos po Westernu in imunodetekcija

Prenos po Westernu temelji na prenosu proteinov iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno membrano pod vplivom električnega toka. Ta prenos je potekal v posodi za prenos po Westernu pri 250 mA v prisotnosti pufru za prenos po Westernu približno 3 h.

Nato smo gel zavrgli in za nadaljnjo imunodetekcijo uporabili nitrocelulozno membrano, na kateri so bili sedaj proteini. Nevezana mesta na membrani je bilo potrebno blokirati, kar smo dosegli z eno-urno inkubacijo v 5% mleku z rahlim stresanjem pri sobni temperaturi. Nato je sledila inkubacija s primarnimi protitelesi, specifičnimi za želen protein, ki je potekala ali 1h na sobni temperaturi ali pa čez noč pri 4° C z rahlim

stresanjem. Nevezana protitelesa smo odstranili s spiranjem v PBST pufru štirikrat po 15 minut. Sledila je eno-urna inkubacija s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo pri sobni temperaturi in nežnim stresanjem.

Po ponovnem 4x 15-minutnem spiranju smo membrano prelili z ECL reagentom, ki vsebuje substrat za hrenovo peroksidazo. Cepitev tega substrata oddaja kemiluminiscenco, ki smo jo detektirali s pomočjo filma. Le-tega smo po izpostavitvi membrani razvili v avtomatski temnici.

3.2.14 Tretiranje celic s katepsini in serumom

Celice MDA-MB-231, HeLa in Caco-2 smo tretirali s katepsini. Vse te celice so adhezijske celice, zato smo jih najprej odlepili s površine petrijevke z brezcimsko raztopino za odlepljanje (*Hank's solution*), nato smo prešteli žive celice v suspenziji in približno milijon (10^6) celic resuspendirali v pufru za šeding (DPBS, 0,5 μ M DTT, pH 6), ki smo mu dodali rekombinanten katepsin L ali S s končno koncentracijo proteaze 0,2 μ M. Tako pripravljene celice smo inkubirali 45 minut pri 37° C z rahlim stresanjem. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice, inkubirane samo s pufrom oz. z inhibiranim katepsinom. Inhibicija je potekala predhodno 1 uro z 20 μ M inhibitorjem cisteinskih katepsinov E-64.

Na enak način smo celice tretirali s sekretomom makrofagov (postopek opisan pod 3.2.21). V tem primeru smo namesto s pufrom za šeding in katepsini celice tretirali s sekretomom makrofagov. Po predhodno izmerjeni aktivni koncentraciji katepsinov v sekretomu smo določili potreben volumen sekretoma, da je bila končna koncentracija katepsinov enaka kot v primeru tretiranja s katepsini. V drugem primeru pa smo celice tretirali tako, da smo dodali enak volumen sekretoma, kot je bil prej volumen raztopine katepsinov, koncentracija pa se je razlikovala. Kot negativno kontrolo smo vzeli celice, tretirane z inhibiranim sekretomom makrofagov. To smo dosegli s predhodno 1-urno inkubacijo sekretoma z E-64 (inhibitorjem cisteinskih katepsinov) in batimastatom (inhibitorjem metaloproteaz), oba s končno koncentracijo 20 μ M.

Po tretiranju celic s katepsini oz. sekretomom makrofagov, smo celice sprali z DPBS in jih resuspendirali v različnih koncentracijah seruma, NHS (2%, 5%, 7%, 10% in 20%) in inkubirali 45 minut pri temperaturi 37° C. Serum smo pripravili ali v DPBS, PBS z EGTA in dodanim Mg^{2+} ali pa v GVB++. Tretiranje celic s slednjim pufrom se je pokazalo za primernejše, zato so bili vsi eksperimenti predhodno narejeni z DPBS, naknadno ponovljeni še s pufrom GVB++. Kot negativno kontrolo smo pripravili celice, tretirane s toplotno inaktiviranim serumom, dNHS, za kar smo naravni humani serum predhodno 45 minut segrevali na temperaturi 56° C. Poskus smo nadaljevali z imuno-označevanjem celic (protokol 3.2.15).

3.2.15 Imuno-označevanje celic

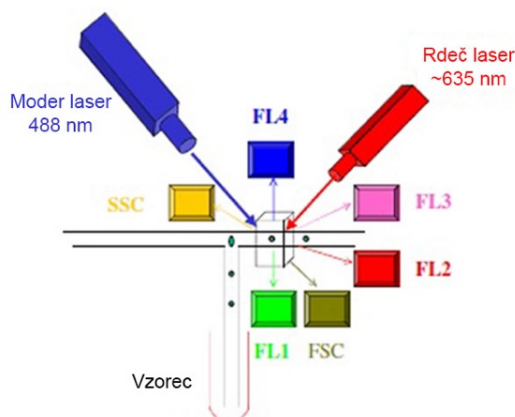
Celice iz prejšnjega poglavja (3.2.14) smo sprali s PBS++ in tako odstranili morebitne ostanke seruma. Protitelesa za imuno-označevanje celic smo redčili v razmerju 1:100 (zajčja protitelesa proti humanemu C3c, zajčja protitelesa proti humanemu C4c in zajčja protitelesa proti humanemu C1q), oz. 1:50 (mišja protitelesa proti humanemu C5-9). Celice smo nato resuspendirali v pripravljeni raztopini protiteles in 20 minut inkubirali na ledu z rahlim stresanjem.

Protitelesa proti C5-9 niso bila konjugirana s fluorescenčnim barvilom, zato smo morali te celice označiti še s sekundarnimi protitelesi. V ta namen smo celice ponovno sprali s PBS++ in nato resuspendirali v raztopini 1:50 redčenih sekundarnih kozjih antičloveških protiteles. Sledila je 20-minutna inkubacija na ledu z nežnim stresanjem.

3.2.16 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je metoda za detekcijo površinskih lastnosti celic. V citometer celice vstopajo posamezno, tam pa so izpostavljene laserju, viru svetlobe določene valovne dolžine. Na površini celice se svetloba sipa in intenziteto te svetlobe merimo pri kotu 0° (*forward scatter*, prednje sipanje svetlobe) in 90° (*side scatter*, stransko sipanje svetlobe). Prva nam pove velikost celic, druga pa njihovo granuliranost.

Poleg tega pa lahko na pretočnem citometru merimo tudi oddano svetlobo fluorokromov, ki so vezani na površino celic. Naš pretočni citometer (FACSCalibur, BD) je imel 3 kanale, oz. 3 filtre, skozi katere je lovil emitirano svetlobo različnih valovnih dolžin. FL1 je bil primeren za spremljanje svetlobe z valovno dolžino 515 - 545 nm., FL2 za 564 - 606 nm, FL3 pa za več od 670 nm. Slika 22 predstavlja shemo pretočnega citometra [204].



Slika 22: **Shema pretočnega citometra.** Uporabljeni citometer je imel samo modri laser (488 nm) in detektorje za SSC, FCS, FL1, FL2 in FL3. Povzeto po [204].

Za potrebe naših poskusov smo molekule, ki so nas zanimale na površini celic (C1q, C3c, C4c) označili s protitelesi, ta pa so bila konjugirana s fluorescentnim barvilom FITC, ki ga vzbuja argonski laser pri valovni dolžini 488 nm, svetlobo pa emitira pri 518 nm. Tudi označevanje celic z barvilom Annexin-V (protokol 3.2.5) je potekalo pri enakem viru in detektorju svetlobe. V primeru detekcije proteinskega kompleksa C5-9 na površini celic pa smo uporabili neoznačena primarna protitelesa ter nato sekundarna protitelesa, ki so bila konjugirana z barvilom Alexa-Fluor-488. Tudi tega vzbuja argonski laser z valovno dolžino svetlobe 488nm, ekscitacijska svetloba pa ima valovno dolžino 525 nm. Torej, vse na FL1. V primeru barvanja celic s propidijevim jodidom, ki oddaja svetlobo z valovno dolžino 617 nm, pa smo uporabili kanal FL2.

Po meritvi na pretočnem citometru smo intenziteto fluorescenčne svetlobe za posamezni vzorec izračunali tako, da smo izmerjeni geometrijski sredini intenzitete vzorca odšteli geometrijsko sredino vzorca s toplotno inaktiviranim serumom, ki je služil kot negativna kontrola. Tako izračunano geometrijsko sredino intenzitete vzorcev smo nato primerjali med seboj in določili delež aktivacije komplementa kot razmerje med vzorcem in pozitivno kontrolo (celice tretirane samo s serumom in ne s proteazo ali pa celice tretirane z inhibirano proteazo). Sledila je statistična analiza v programu GraphPadPrism, kjer smo primerjali po tri ponovitve poskusa in jim določili statistično signifikantnost s testom enosmerne analize variance - ANOVA in nato s Tukeyevim HSD testom. Zvezdice na grafih predstavljajo P vrednost, kot je predstavljeno v tabeli (Tabela 7) spodaj:

Tabela 7: Statistična vrednost P in pripadajoča oznaka na grafu.

Oznaka	P vrednost
ns	$P > 0,05$
*	$P < 0,05$
**	$P < 0,01$
***	$P < 0,001$
****	$P < 0,0001$

3.2.17 Afinitetna kromatografija

S tem eksperimentom smo želeli s površine celic izolirati proteine, na katere se veže prva komponenta komplementnega sistema, C1q. V ta namen smo uporabili po dve konfluentni, 15-centimetrski plošči celic MDA-MB-231. Celice smo odlepili s površine z raztopino za brezcimsko disociacijo, sprali z DPBS in resuspendirali v vezavnem pufru za C1q ter dodali toliko biotiniliranega C1q, da je bila končna koncentracija približno 30 $\mu\text{g/mL}$. Tako pripravljene celice smo inkubirali eno uro pri 37° C z nežnim stresanjem. Nato smo z vezavnim pufrom sprali nevezan C1q, dodali različne koncentracije formaldehida (0,1%, 0,25% in 0,5%) in inkubirali 10 minut na sobni temperaturi, da se je biotiniliran C1q zamrežil s proteini, na katere se je vezal. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 125 mM glicina in z rahlim stresanjem. Sledila je priprava celičnih lizatov (3.2.18).

Kasneje smo poskus spremenili tako, da smo najprej pripravili šedom: intaktne celice MDA-MB-231 smo sprali z DPBS in jih odlepili s površine petrijevke z raztopino za brezcimsko disociacijo. Celice smo še enkrat sprali in jim dodali 0,2 μM katepsin L v pufru za šeding. 45 minut smo jih inkubirali pri 37° C z nežnim stresanjem. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 20 mM inhibitorja E-64. Po spiranju celic smo dodali raztopino biotiniliranega C1q s končno koncentracijo 30 $\mu\text{g/mL}$. Vezava je potekala v vezavnem pufru za C1q 30 minut pri 37° C in z nežnim stresanjem. Sledilo je spiranje vzorca in zamreženje s formaldehidom kot je opisano zgoraj. Poskus smo nadaljevali z vezavo C1q na streptavidinske magnetne kroglice (3.2.19)

3.2.18 Priprava celičnega lizata

Suspenzijo celic smo dodobra sprali z vezavnim pufrom za C1q nato pa dodali lizirni pufer RIPA in inkubirali na ledu 10 minut. Po končani lizi smo nastajajoči lizat centrifugirali 10 minut pri 3000x g in 4° C. Pobrli smo tako pripravljeni supernatant in ga shranili na ledu.

3.2.19 Vezava biotiniliranega proteina C1q na streptavidinske magnetne kroglice

Streptavidinske magnetne kroglice smo pripravili po navodilih proizvajalca, nato pa jih resuspendirali v pufru RIPA ter jim dodali celični lizat iz prejšnjega odstavka (3.2.18). Čez noč smo lizat in magnetne kroglice inkubirali pri temperaturi 4° C z nežnim stresanjem. V tem času se je biotin, vezan na C1q, povezal s streptavidinom na magnetnih kroglicah.

Sledilo je spiranje nevezanega materiala s pufrom za spiranje C1q – 1 in pufrom za spiranje C1q – 2 ter elucijo vzorcev s TCEP, ki prekine povezavo med biotinom in proteinom C1q. To je potekalo po sledečem postopku: vzorcu z magnetnimi kroglicami smo dodali nevtraliziran TCEP v končni koncentraciji 50 mM in pustili 30 minut na sobni temperaturi. S pomočjo magneta smo ločili prvo fazo oz. dobili prvi eluat, ki smo mu dodali nanašalni pufer in ga toplotno obdelali za nadaljnjo NaDS-PAGE elektroforezo. Preostale magnetne kroglice smo resuspendirali v 100 mM Tris-u, dodali TCEP v končni

koncentraciji 50 mM, nanašalni pufer in vse skupaj termično obdelali z inkubacijo na 99° C (5 minut). S pomočjo magneta smo pobrali drugi eluat in ga nanesli na gel, preostale magnetne kroglice pa smo še enkrat resuspendirali s Tris, TCEP in nanašalnim pufrom, jih termično obdelali in pobrali še tretji eluat. Vse eluate smo nanesli na gel za NaDS-PAGE elektroforezo, nato pa nadaljevali s pripravo vzorca za masno spektrometrijo (3.2.25).

3.2.20 Diferenciacija celične linije U-937 v makrofage

Konfluentne celice U-937 smo prešteli in jim določili koncentracijo. Nato smo želeno količino celic 5 minut centrifugirali pri 300x g in jih resuspendirali v svežem gojišču RPMI. Volumen, v katerem je bilo 3×10^6 celic, sem prenesli na petrijevko s premerom 10 cm in dodali toliko gojišča, da je bil končni volumen 6 mL. Suspenzijo celic smo nežno premešali, da so se celice enakomerno razporedile po površini petrijevke, nato pa dodali 18 µL PMA (končna koncentracija je bila 30 nM) in še enkrat nežno premešali. Diferenciacija monocitov v makrofage je trajala 48 ur – v tem času so se makrofagi pritrdili na površino petrijevke, medtem ko so nediferencirane celice ostale v suspenziji. Po končani diferenciaciji smo makrofagom zamenjali gojišče in jih približno 7 dni pustili, da se regenerirajo ob redni menjavi gojišča.

3.2.21 Priprava sekretoma makrofagov

Makrofage, diferencirane iz U-937 monocitov, smo sprali s PBS in nato 2 uri inkubirali pri 37° C s pufrom za šeding (DPBS, 0,5 µM DTT, pH 6). Nato smo sekretom pobrali v centrifugirke in 5 minut centrifugirali pri 300x g in 4° C. Supernatant smo prenesli v sveže centrifugirke in 10 minut centrifugirali pri 3000x g in 4° C. Spet smo pobrali supernatant in ga uporabili za nadaljnje poskuse: določitev skupne proteinske koncentracije (protokol 3.2.10) in aktivne koncentracije proteaz (protokol 3.2.11), tretiranje celic (protokol 3.2.14), masno spektrometrijo (3.2.25) in elektroforezo (3.2.12), ki ji je sledil prenos po Westernu in detekcija s protitelesi (3.2.13).

3.2.22 Tretiranje celic z gingipaini

TIGK celice, pritrjene na dno petrijevke, smo sprali z DPBS in nato prekrili z raztopino gingipainov: Kgp, RgpB, ali HRgpA, pripravljenih v TNC-a pufru. Za eno paralelko smo uporabili približno 40×10^6 celic, koncentracije gingipainov pa so bile 4 nM, 40 nM, 75 nM ali 100 nM. Celice smo inkubirali 45 minut v inkubatorju, nato pa pobrali pufer v centrifugirke in centrifugirali 5 minut pri 300x g in 4° C. Supernatant smo prenesli v sveže centrifugirke, dodali inhibitorje gingipainov s končno koncentracijo 1 µM (KYT-1 za RgpB in HRgpA oz. KYT-36 za Kgp) in še enkrat centrifugirali 5 minut pri 3000x g in 4° C. Supernatant smo prenesli v koncentradorje z membrano, prepustno za proteine manjše od 3000 Da (MWCO 3000, Millipore). S centrifugiranjem pri 4000x g in 4° C smo vzorce skoncentrirali iz 8 mL na 200 µL. Postopek smo nadaljevali s pripravo vzorcev za masno spektrometrijo (3.2.25). Kot negativno kontrolo smo uporabili celice, tretirane z inhibiranimi gingipaini. Torej, primeren inhibitor KYT s končno koncentracijo 200 µM smo dodali aktiviranemu gingipainu, inkubirali 15 minut pri 37° C, nato pa to raztopino uporabili za tretiranje celic, kot je opisano zgoraj.

3.2.23 Tretiranje celic z bakterijami

Za tretiranje celic TIGK z bakterijami smo najprej potrebovali bakterije *P. gingivalis* v pred-kulturi (opisano v 3.2.8). Tako pripravljeno bakterijsko suspenzijo smo 5 minut centrifugirali pri 5000x g in 4° C, nato odstranili supernatant in bakterijski pelet sprali s

sterilnim PBS ter korak še enkrat ponovili. Po zadnjem centrifugiranju smo pelet resuspendirali v TNCa pufru ter pomerili koncentracijo bakterij kot absorbanco pri 600 nm po enačbi (3.2):

$$\text{Absorbanca} = 1 \dots\dots\dots 10^9 \text{ bakterij } P.g./mL \quad (3.2)$$

Preračunali smo potreben volumen bakterijske suspenzije za želeno število bakterijskih celic na TIGK celicah, t.i. MOI.

TIGK celice, pritrjene na dno petrijevke smo sprali z DPBS in nato prekrili z raztopino bakterij *P. gingivalis* pripravljenih v TNC-a pufru. Uporabili smo seve: W83, $\Delta k\Delta rAB$, Δkgp ali $\Delta rgpAB$. Za eno paralelko smo uporabili približno 40×10^6 celic TIGK.

Celice smo inkubirali 45 minut v inkubatorju, nato pa šedom pobrali v centrifugirke in centrifugirali 5 minut pri 300x g in 4° C. Supernatant smo prenesli v sveže centrifugirke, dodali inhibitorje gingipainov (KYT-1 za RgpB in HRgpA oz. KYT-36 za Kgp) in še enkrat centrifugirali 5 minut pri 3000x in 4° C. Supernatant smo prenesli v koncentradorje z membrano, prepustno za proteine manjše od 3000 Da. S centrifugiranjem pri 4000g in 4° C smo vzorce skoncentrirali iz 8 mL na 200 μ L. Postopek smo nadaljevali s pripravo vzorcev za masno spektrometrijo (3.2.25).

3.2.24 Svetlobna mikroskopija s CO₂ komoro

Celice TIGK smo gojili na ploščah s 6 jamicami. Ko so bile konfluentne, smo jih prenesli iz celičnega laboratorija k mikroskopu s termostatirano (37° C) CO₂ komoro, ki je zagotavljala pogoje, kot so v inkubatorju. Uporabili smo mikroskop Olympus IX s črno-belo kamero Hamamatsu Orca R², s faznim kontrastom in 10x povečavo. V eno jamico smo celicam dodali raztopino gingipaina določene koncentracije, nato pa na 5 minut delali posnetke stanja pod mikroskopom. Poskus je potekal, dokler se celice niso odlepile od površine petrijevke oz. 45 minut. Na ta način smo spremljali dogajanje med tretiranjem celic z gingipaini in ugotovili, po kolikšnem času in pri kakšni koncentraciji gingipainov se celice odlepijo s površine.

3.2.25 Masna spektrometrija

Masna spektrometrija je analitska metoda, ki je primerna za identifikacijo velikega števila proteinov v vzorcu. Osnovni princip masne spektrometrije temelji na analizi peptidnih ionov v plinski fazi, ki jih pripravimo iz kompleksnega proteinskega vzorca v tipičnem »bottom up« proteomskem eksperimentu. Masni spektrometer ionom natančno določi masno-nabojni količnik, tj. razmerje mase in naboja (m/z), s pomočjo HCD fragmentacije pa detektiramo tudi fragmentne ione. Tako dobimo nabor masnih spektrov vzorca, ki jih s pomočjo ustreznih računalniških programov in baze podatkov povežemo z najverjetnejšimi proteini v preiskovanem vzorcu. Rezultat take analize je seznam potencialnih (najbolj verjetnih) proteinov, ki se nahajajo v vzorcu. S pomočjo algoritmov za kvantifikacijo brez uporabe označevanja (t.i. »label free«) pa lahko ocenimo tudi njihovo relativno količino.

3.2.25.1 Priprava vzorca za masno spektrometrijo

Šedom, torej supernatant po tretiranju celic TIGK z gingipaini (3.2.22) oz. bakterijami *P. gingivalis* (3.2.23) ter eluat po afinitetni kromatografiji (3.2.17) smo pripravili za analizo na masnem spektrometru po dveh že ustaljenih postopkih: priprava vzorca v gelu (*in-gel*) oz. v raztopini (*in-solution*) [75].

Za pripravo vzorca v gelu smo šedome najprej zmešali z nanašalnim pufrom in 5 minut inkubirali pri 99° C. Nato smo ohlajene vzorce nanесли na predpripravljen gel za NaDS-PAGE elektroforezo (12% Tris-Gly gel) in izvedli elektroforezo, kot je opisano v poglavju 3.2.12. Po končani elektroforezi smo gel pobarvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue (1h nežnega stresanja), nato pa gel razbarvali v raztopini za razbarvanje Coomassie – 1 (nežno stresanje in redno menjavanje raztopine na približno 15 minut). Na koncu so se na gelu videle le še obarvane proteinske lise. Ta gel smo razrezali na stolpce (en stolpec je predstavljal en vzorec), tako nastali stolpec smo po tem razdelili na 6 delov in vsakega razrezali na rezine velikosti 1 mm³ ter razbarvali z raztopino za razbarvanje Coomassie – 2. Koščke gela smo spirali z acetonitrilom in posušili v vakuumskem koncentradorju. Gele smo nato rehidrirali v raztopini za redukcijo (10 mM DTT, 25 mM NH₄HCO₃) in inkubirali 45 minut pri 56° C z nežnim stresanjem, sprali in nato inkubirali v raztopini za alkilacijo (55 mM jodoacetoamid, 25 mM NH₄HCO₃) in inkubirali 30 minut v temi na sobni temperaturi. Vzorce (koščke gela) smo ponovno spirali z acetonitrilom in posušili v vakuumskem koncentradorju. Sledila je 20-minutna inkubacija v raztopini s tripsinom (pufer za tripsin in 1 µg modificiranega tripsina iz prašičje trebušne slinavke), nato smo dodali 25 mM NH₄HCO₃ ter preko noči inkubirali na 37° C. Naslednji dan smo tripsinski pufer prenesli v sveže centrifugirke, iz koščkov gela pa ekstrahirali proteine z inkubacijo v raztopini za ekstrakcijo (50% ACN in 5% metanojska kislina), ki je potekala 30 minut s stresanjem. Raztopino s proteini smo združili s pufrom za tripsin in vse skupaj v vakuumskem koncentradorju skoncentrirali na 50 µL. Tako pripravljene vzorce smo prenesli na C18 kolone, pripravljene po ustaljenem postopku [205] in centrifugirali, dokler ni ves vzorec prešel preko kolone. Sledila je elucija peptidov, vezanih na kolono, za kar smo uporabili elucijsko raztopino (60% ACN, 0,1% metanojska kislina v vodi). Končni vzorec smo na vakuumskem koncentradorju skoncentrirali do volumna 15 µL.

V primeru šedoma celic TIGK, tretiranih z bakterijami *P. gingivalis* se je bolj obnesla metoda priprave vzorca v raztopini. V ta namen smo v 1,5 mL centrifugirki zmešali 100 µL vzorca, 6 M ureo, 25 mM NH₄HCO₃ in 10 mM DTT ter eno uro inkubirali z rahlim stresanjem. Nato smo dodali 40 mM IAA in inkubirali v temi 1h. Ponovno smo dodali 40 mM DTT in inkubirali 1h z rahlim stresanjem. Nato smo vzorec razredčili tako, da je bila končna koncentracija uree manjša od 0,6 M. Tripsin smo redčili v pufru za tripsin in ga v vsak vzorec dodali toliko, da je bilo masno razmerje tripsina in proteinov okoli 1:20. Tako pripravljene vzorce smo čez noč inkubirali pri temperaturi 37° C. Naslednji dan smo vzorce nakisali s približno 50 µL metanojske kisline, nato pa jih nanесли na C18 kolone in centrifugirali dokler ni ves vzorec prešel preko kolone. Sledila je elucija peptidov, vezanih na kolono, za kar smo uporabili elucijsko raztopino (60% ACN, 0,1% metanojska kislina v vodi). Končni vzorec smo na vakuumskem koncentradorju skoncentrirali do volumna 15 µL.

Vsi ti eksperimenti so bili narejeni v triplikatih.

3.2.25.2 Analiza vzorcev na masnem spektrometru

Vzorci so bili analizirani na masnem spektrometru Orbitrap LTQ Velos, ki je sklopljen s tekočinsko kromatografijo (EASY-nanoLC II HPLC (Thermo Fischer Scientific)), pri čemer je šlo za LC-MS/MS analizo. Peptidni vzorec smo ločevali na 10 cm dolgi analitski koloni C18 PicoFritTM AQUASIL (New Objective). Temu je sledila elucija peptidov z 90-minutnim linearnim gradientom 5 - 40% topila B (0,1% metanojska kislina v acetonitrilu), s pretokom mobilne faze 300 nL/min. Sledila je analiza na masnem spektrometru Orbitrap, kjer je bila ionizacija proteinov dosežena z ESI (*electron-spray ionization*, ionizacija z razprševanjem elektronov), čemur je sledila HCD fragmentacija najbolj intenzivnih prekursorjskih ionov. Z dinamičnim izključevanjem smo vsak spekter peptida, ki je bil posnet dvakrat

zaporedoma, za 120 s izločili iz postopka snemanja. Masni razpon analizatorja je 300-2000 m/z, njegova ločljivost pa 30000. Z masnim spektrometrom sta upravljala dr. Matej Vizovišek in dr. Robert Vidmar, ki sta tudi opravila opisano analizo vzorcev.

3.2.25.3 Analiza rezultatov z masne spektrometrije

Za iskanje po bazi podatkov in kvantifikacijo s spektralnim štetjem smo uporabili proteomski programski paket MaxQuant (verzija 1.5.6.0) z iskalnikom Andromeda [206, 207]. Iskanje zadetkov je potekalo v človeški UniProt-KB proteinski bazi podatkov (20316 vnosov). Specifičnost cepitev je bila nastavljena za tripsin z največ dvema zgrešenima mestoma cepitve. Kot fiksno modifikacijo smo nastavili karbamidometilacijo cisteinov (57,0215 Da), medtem ko sta bili metioninska oksidacija (15,9949 Da) in N-terminalna acetilacija (42,0106 Da) variabilni modifikaciji. Toleranca za napako določitve mase prekursorskih ionov in produktov fragmentacije je bila 0,5 Da oziroma 4,5 ppm. Vrednost FDR (angl. *false discovery rate*, stopnja napačne prepoznavne) pa smo postavili na 1% za identifikacije peptidov in proteinov. MaxQuant peptide dodeli proteinskim skupinam in ne posameznim proteinom. Za pozitivno identifikacijo smo tako šteli vsako proteinsko skupino, ki sta ji bila dodeljena vsaj dva peptida. Nadaljnja analiza je potekala v programu Perseus [208].

Za relativno kvantifikacijo proteinov v vzorcih smo uporabili metodo spektralnega štetja [209]. Razmerje med številom spektrov (angl. *spectral count ratio* – SCR) smo izračunali kot število posnetih MS/MS spektrov proteina v vzorcu, tretiranih s katepsinom, gingipainom oz. bakterijami *P. gingivalis*, deljeno s številom posnetih MS/MS spektrov proteina v negativni kontroli. Število MS/MS spektrov vseh proteinov smo med primerjavo podatkov povečali za 1, da smo se izognili deljenju s številom 0. Kot proteine s spremenjeno prisotnostjo v tretiranem vzorcu smo obravnavali le tiste, ki se jim je SCR spremenil za vsaj 3-krat glede na negativno kontrolo [119]. Dodaten pogoj je bila ponovljiva identifikacija tarče v vzorcih v vseh treh bioloških ponovitvah poskusa. Vse podatke, pridobljene z masno spektrometrijo, smo naložili na ProteomeXchange Consortium preko PRIDE [210]. Identifikacijska številka naših rezultatov je PXD015679.

Poglavje 4

Rezultati

4.1 Vloga cisteinskih katepsinov pri aktivaciji komplementa na površini tumorskih celic

V prvem delu naše raziskave smo se ukvarjali z razumevanjem vpliva oz. vloge cisteinskih katepsinov na aktivacijo komplementa na površini tumorskih celic. Delo na tem področju je začela sodelavka dr. Barbara Sobotič, ki je opazila, da cisteinski katepsini lahko odcepijo inhibitor komplementa CD55 s površine tumorskih celic [119]. Glede na to, da je CD55 inhibitor komplementa, smo pričakovali, da bo aktivacija komplementa po tretiranju s cisteinskimi katepsini obsežnejša, vendar pa so eksperimenti pokazali ravno nasprotno. Katepsin L na tumorske celice deluje tako, da je aktivacija komplementa nižja v primerjavi s kontrolo.

S tem odkritjem se je začelo naše delo, ki je bilo usmerjeno v razumevanje mehanizma delovanja katepsina L na površino tumorskih celic in kako to vpliva na aktivacijo komplementa na njihovi površini.

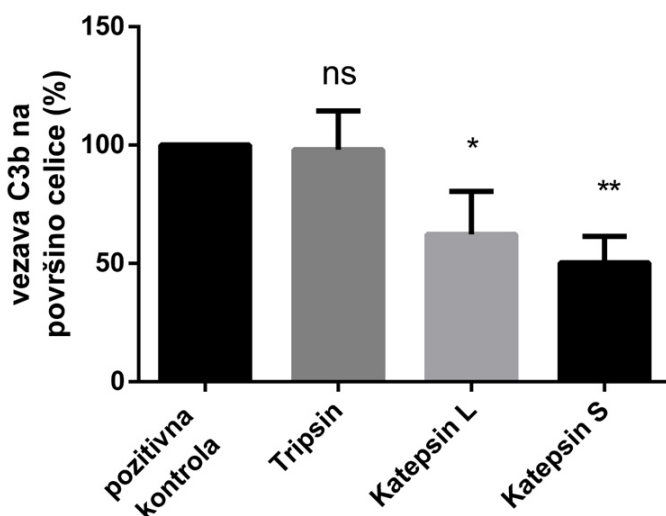
4.1.1 Vpliv posameznih cisteinskih katepsinov na aktivacijo komplementa

Najprej nas je zanimalo, če je opazen vpliv posledica splošne proteazne aktivnosti na površini tumorskih celic, ali pa je morda specifičen za cisteinske proteaze.

Postopek dela je opisan v poglavjih 3.2.14, 3.2.15 in 3.2.16, bistveno pa je, da smo intaktne tumorske celice MDA-MB-231 inkubirali z različnimi proteazami pri konstantni koncentraciji - 0,2 μM , nato v 20% naravnem humanem serumu, nakar smo celice označili s protitelesi proti C3b komponenti komplementnega sistema in jih prešteli na pretočnem citometru. Komponento C3b smo izbrali zato, ker je v sredini aktivacijskih kaskad komplementa in najbolj pogosto prisotna ter nam tako da vedeti, kolikšna je bila aktivacija komplementa. Tripsin je serinska proteaza in je služil kot kontrola in predstavlja nespecifične cepitve zunajceličnih proteinov, medtem ko sta katepsina L in S cisteinski proteazi, znani po svoji vključenosti v tumorskem mikrookolju: prvega izločajo tumorske celice same, drugega pa v tumorsko okolje dostavljajo imunske celice, kot na primer makrofagi [101].

Izkazalo se je, da je aktivacija komplementa, ki smo jo merili kot delež C3b na površini celic MDA-MB-231, praktično nespremenjena po tretiranju celic s tripsinom, vezava C3b komponente pa je opazno znižana po tretiranju celic s katepsinom L ali S (Slika 23). To kaže na dejstvo, da je zmanjšana aktivacija komplementa na površini tumorskih celic značilna posledica tretiranja s cisteinskimi proteazami in ni splošna lastnost proteoliznih

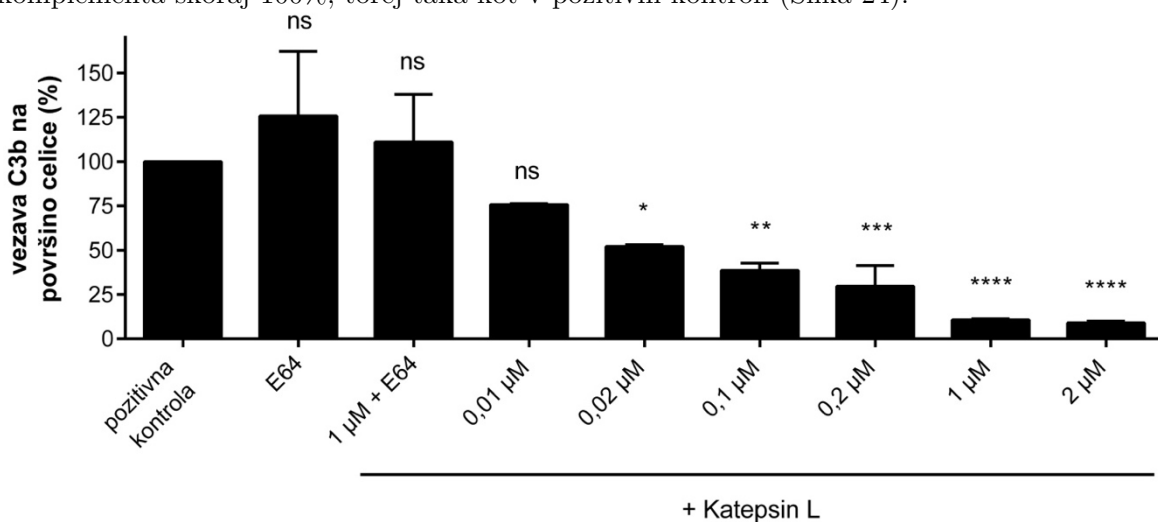
encimov. Ker katepsin L izločajo tumorske celice same in je znan po tem, da prispeva k rasti in širitvi tumorjev [113, 116], smo za nadaljnje eksperimente uporabljali to cisteinsko proteazo.



Slika 23: Delež vezanega C3b na površino tumorskih celic po tretiranju z različnimi proteazami.

4.1.2 Vpliv koncentracije katepsina L na aktivacijo komplementa

Da bi potrdili, da je zmanjšana aktivacija komplementa res odvisna od katepsina L, smo celice tretirali tudi z inhibiranim katepsinom L. Predhodno smo katepsin L inhibirali z E-64, šele nato pa tretirali tumorske celice. Opazili smo, da je v tem primeru aktivacija komplementa skoraj 100%, torej taka kot v pozitivni kontroli (Slika 24).

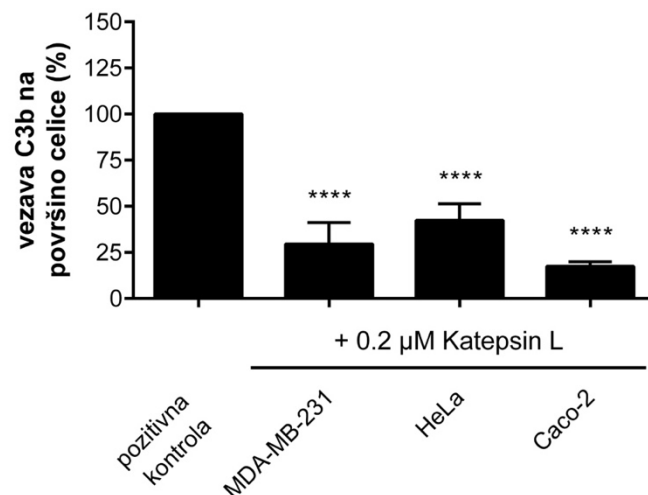


Slika 24: Vpliv koncentracije katepsina L na vezavo C3b na površino tumorskih celic.

Opazili smo tudi, da je vpliv odvisen od koncentracije katepsina L, saj z naraščajočo koncentracijo aktivacija komplementa pada. Najnižja statistično še signifikantna koncentracija katepsina L je bila 0,02 µM oz. 20 nM. Pri svojem delu pa smo uporabili tudi 0,2 µM koncentracijo encima, ki je še vedno fiziološko relevantna [211], hkrati pa kaže statistično signifikanten premik intenzitete fluorescence na pretočnem citometru.

4.1.3 Vpliv Katepsina L na aktivacijo komplementa je neodvisen od vrste tumorskih celic

Nadalje smo preverili, če je zmanjšana aktivacija komplementa splošen pojav pri vseh tumorskih celicah ali je značilna samo za celice MDA-MB-231. Ta celična linija je pripravljena iz adenokarcinoma mlečne žleze, zato smo za poskus uporabili še celično linijo HeLa iz celic adenokarcinoma materničnega vratu ter celično linijo Caco-2, ki je pripravljena iz kolorektalnega adenokarcinoma. V vseh primerih gre torej za epiteljske celice različnih adenokarcinomov.



Slika 25: Delež vezanega C3b po tretiranju različnih celičnih linij z 0,2 μ M Katepsinom L.

Slika 25 nam pokaže, da je aktivacija komplementa, merjena kot delež vezanega C3b na površino tumorskih celic, zmanjšana v vseh treh primerih, torej gre za splošen vpliv Katepsina L na površino tumorske celice, ne glede na njen izvor. Za nadaljnje poskuse smo uporabili celično linijo MDA-MB-231, saj je najenostavnejša za uporabo.

4.1.4 Katepsin L najbolj vpliva na aktivacijo klasične poti aktivacije komplementa

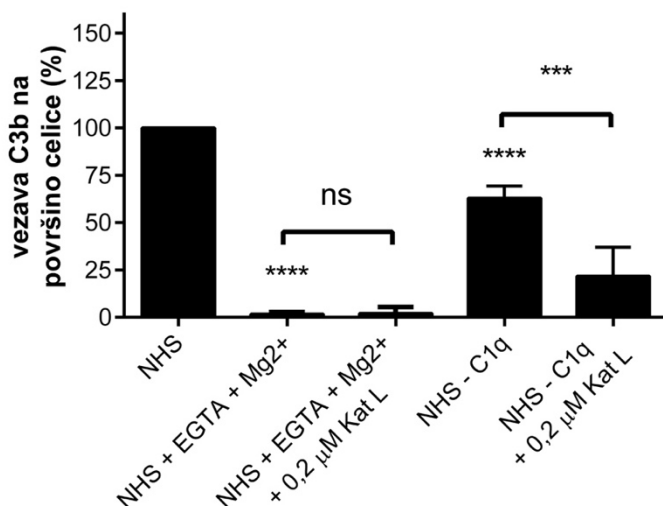
Ključno vprašanje našega dela je bilo, kako Katepsin L vpliva na aktivacijo komplementa. Zato smo v naslednjem koraku poskušali določiti, katera izmed treh poti aktivacije komplementa je bistvena pri tem procesu.

Komplement se lahko aktivira po treh različnih aktivacijskih poteh. Klasična pot, kjer je C1q tista molekula, ki prepozna antigen na površini celice ter lektinska pot, kjer je taka molekula MBL, sta si dokaj podobni, saj obe tvorita enako C3-konvertazo, imenovano tudi C4bC2a, ki nastane zaradi cepljenja C2 in C4 komponent. Alternativna pot pa se začne spontano s cepitvijo C3 komponente in nastankom C3-konvertaze, C3bBb. C1q molekula in MBL molekula potrebujeta kalcijeve ione (Ca^{2+}) za svojo aktivnost, medtem, ko ti niso potrebni za začetek alternativne poti aktivacije.

Da bi blokirali klasično in lektinsko pot aktivacije komplementa smo pufru za redčenje seruma dodali EGTA, ki je kelator za Ca^{2+} ione. Vendar pa EGTA veže tudi magnezijeve ione (Mg^{2+}), ki pa so vseeno potrebni za normalno aktivacijo komplementa. Zato smo te dodali še v presežku v obliki MgCl_2 . V tako pripravljenem pufru smo redčili serum in potem z njim tretirali tumorske celice.

Z odstranitvijo Ca^{2+} ionov iz sistema smo blokirali tako klasično, kot tudi lektinsko pot aktivacije. Da pa bi ločili še med tema dvema, smo uporabili serum (NHS), kjer je bil C1q popolnoma odstranjen.

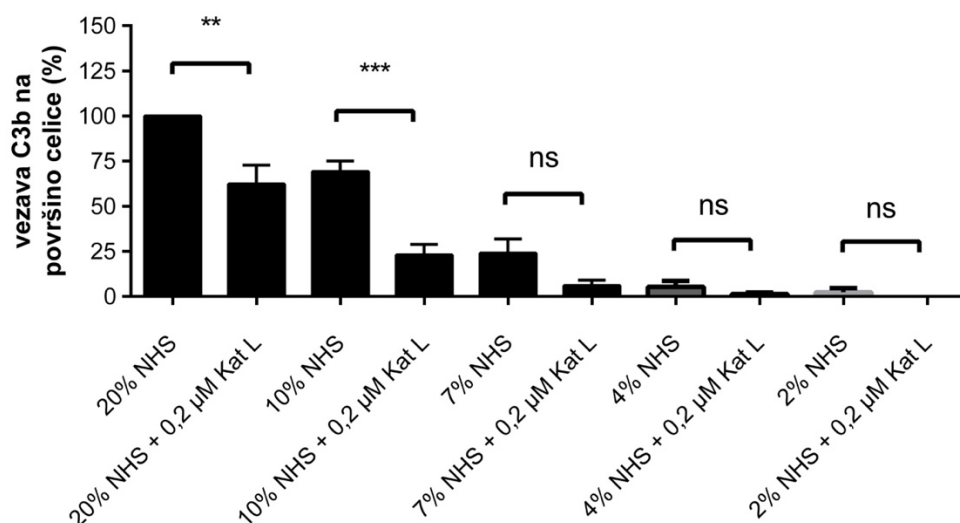
Slika 26 prikazuje delež aktivacije komplementa, merjenega v obliki vezave C3 na površino celic MDA-MB-231, po tretiranju z različno pripravljenimi serumi. Opazili smo, da po dodatku EGTA aktivacija komplementa pade praktično na ničlo. Iz tega lahko sklepamo, da sta klasična in/ali lektinska pot aktivacije bistvenega pomena za aktivacijo komplementa na tumorskih celicah MDA-MB-231. Da bi izločili lektinsko pot, smo naredili poskus še s serumom, ki mu je bil C1q, torej prva molekula v aktivacijski kaskadi klasične poti, odstranjen. Rezultat kaže, da je aktivacija komplementa še vedno prisotna, le v nekoliko zmanjšani meri (približno 75%), dodatek katapsina L, pa aktivacijo komplementa še dodatno zniža. To bi sicer lahko pomenilo, da ima lektinska pot ključno vlogo pri aktivaciji komplementa na tumorskih celicah, vendar je to malo verjetno, saj je ta prisotna večinoma pri bakterijah in ne na človeških celicah. Omeniti je treba, da je bil serum z odstranjenim C1q komercialno pripravljen, serum, ki smo ga uporabili kot kontrolo pa smo izolirali iz krvi darovalcev. Razlike med donorji so lahko zelo opazne in to se je tudi tukaj očitno pokazalo. Zato zadnji rezultat ni neizpodbiten in ga je potrebno jemati z zadržkom.



Slika 26: Delež vezanega C3b na površino tumorskih celic po blokadi lektinske in/ali klasične poti aktivacije komplementa. NHS je 20% naravni humani serum, NHS + EGTA + Mg²⁺ je 20% naravni humani serum, redčen v pufru z dodatkom EGTA in magnezijevih ionov, NHS - C1q pa je 20% naravni humani serum, ki mu je bil C1q predhodno odstranjen.

Poskusili smo tudi z blokado alternativne poti aktivacije komplementa. Ker se le-ta sproža spontano v serumu, smo se odločili za nižanje koncentracije seruma od osnovnih 20% do 2%. Na ta način smo preprečili aktivacijo alternativne poti, klasična in lektinska pa ostaneta nedotaknjena.

Na naslednji sliki (Slika 27) se vidi, da nižanje koncentracije seruma postopno niža tudi aktivacijo komplementa na površini tumorskih celic. Razlike med celicami, tretiranimi samo s serumom ali pa s katapsinom L in serumom so pri nižjih koncentracijah že tako majhne, da statistično niti niso signifikantne. Ker gre za postopno nižanje aktivacije, predvidevamo, da je to na račun nižje koncentracije prepoznavnih molekul komplementa, ne pa za blokado alternativne poti. Vse to kaže, da alternativna pot nima bistvenega vpliva na aktivacijo komplementa na površini tumorskih celic.

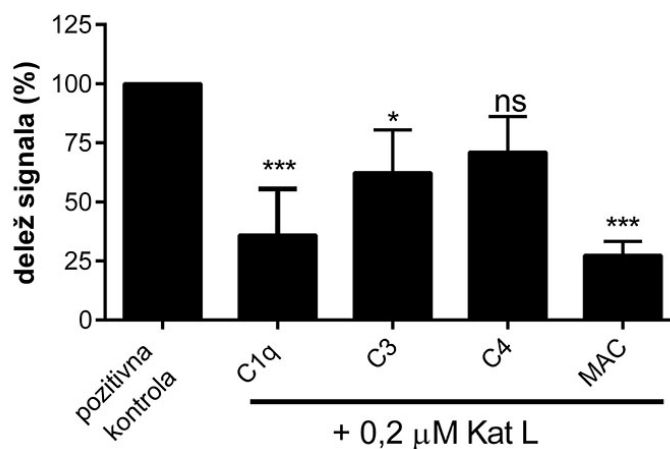


Slika 27: Delež vezanega C3b na površino celic pri nižjih koncentracijah seruma. NHS je naravni humani serum. Pozitivna kontrola je 20% NHS.

To je potrdil tudi poskus s serumom, ki mu je bil odstranjen faktor B, ena izmed bistvenih molekul v prvi fazi aktivacije alternativne poti. Celice, tretirane s tem serumom, niso imele nič kaj bistveno zmanjšane aktivacije komplemента na svoji površini (neobjavljeni rezultati dr. Barbare Sobotič).

4.1.5 Katepsin L vpliva že na vezavo C1q na celice

Nadalje nas je zanimalo, kateri korak aktivacije komplemента po klasični poti je najbolj občutljiv na delovanje katepsina L. Celice MDA-MB-231 smo tretirali s katepsinom L, serumom in jih nato imuno-označili s protitelesi proti različnim komponentam komplementnega sistema: proti prvi, prepoznavni molekuli C1q, proti drugi molekuli, ki tvori pomembno C3-konvertazo, C4, proti centralni molekuli, ki združuje vse tri poti aktivacije, C3b ter proti končnemu kompleksu MAC, ki tvori pore v membrani tumorskih celic in tako povzroči za celično smrt.



Slika 28: Razlike med količino vezave različnih komponent komplementnega sistema na površino tumorskih celic. Pozitivna kontrola je 20% NHS.

Opazili smo, da tretiranje celic s katepsinom L najbolj prizadene tvorbo kompleksa MAC ter vezavo C1q molekule (Slika 28). Kompleks MAC je pravzaprav le posledica aktivacije komplementa, ne pa del aktivacijske kaskade, zato smo pozornost usmerili v C1q, ki je bila druga v vrsti glede na delež zmanjšanja vezave na površini tumorskih celic. Glede na to, da smo že prej predvidevali, da je klasična pot aktivacije komplementa glavna tarča delovanja katepsina L, je bil ta rezultat le še potrditev tega. Če se zmanjša vezava C1q na površino celic, so tudi vsi nadaljnji koraki v kaskadi oslavljeni. Na grafu je opaziti, da se delež vezanega C3b na površino celice ne zmanjša toliko, kot se je delež vezanega C1q. To lahko razložimo z dejstvom, da je vezava C3b tudi del alternativne poti, ki ni odvisna od C1q, očitno pa se komplement v manjši meri aktivira tudi preko te poti. Vezava C4b je tudi zmanjšana, vendar nismo opazili statistično signifikantne razlike.

4.1.6 Identifikacija vezavnih partnerjev C1q

Rezultati kažejo, da katepsin L vpliva že na prvo stopnjo aktivacije komplementa, to je na vezavo prepoznavne molekule C1q. Ta molekula prepozna antigen, tujek na površini celice, se nanj veže in s tem se začne aktivacija komplementa. Kadar je v sistemu prisoten katepsin L, pa lahko to vezavo deloma prepreči. Vse kaže, da katepsin L s površine celic postrizže antigene oz. molekule, ki so značilne za tumorske celice, ne pa za »normalne«, lastne celice.

Z afinitetno kromatografijo smo želeli biotiniliran C1q vezati na intaktne MDA-MB-231 celice, nato pa izolirati kompleks med C1q in vezavnimi partnerji in ga identificirati na masnem spektrometru. V zadnjem koraku tega poskusa, ki je opisan v podpoglavjih 3.2.17, 3.2.18 in 3.2.19, smo zbrali 3 zaporedne eluate in vse nanесли na pred-pripravljen gel za NaDS elektroforezo. Barvanje gela je pokazalo, da se je večina proteinskega materiala eluirala v drugi stopnji, zato smo ta del gela uporabili za nadaljnjo analizo na masnem spektrometru.

Rezultati z masne spektrometrije so pokazali, da je najbolj efektivno zamreženje potekalo pri najnižji koncentraciji formaldehida, to je 0,1%, saj je bilo pri teh pogojih identificiranih proteinov največ. Izmed vseh rezultatov z masne spektrometrije smo glede na spektralno štetje, število identificiranih proteinov in lokalizacijo posameznega proteina dobili kratek seznam možnih vezavnih partnerjev za C1q (Tabela 8).

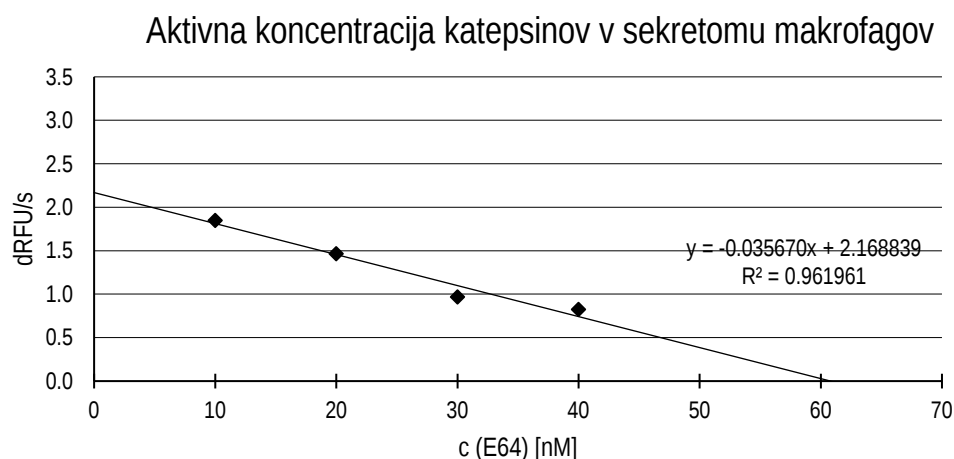
Tabela 8: Seznam potencialnih vezavnih partnerjev za C1q, identificiranih z masno spektrometrijo.

Ime proteina	Št. peptidov	SCR
5-nukleotidaza	2	3
60S ribosomski protein L30	2	3
α -aktin-1/4	2	4
Aneksin A1	2	3
Aneksin A2	15	19
C1q podenota B	6	18
C1q podenota C	4	9
CD44	2	3
Koflin-1	2	3
Histon H2A	2	4

Med rezultati z masne spektrometrije (Tabela 8) vidimo C1q podenote, kar potrjuje pravilno izvedbo poskusa, saj je bil C1q tista molekula, s katero smo vezali in izolirali proteine. Izmed ostalih potencialnih vezavnih partnerjev C1q pa velja omeniti CD44, ki je bil predhodno že opažen kot tarča katepsinov L in S na površini celic MDA-MB-231 [119].

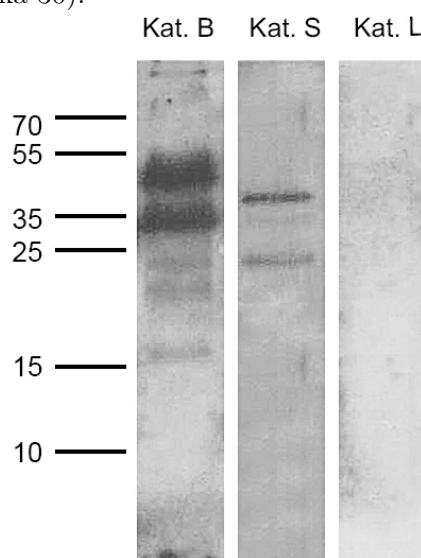
4.1.7 Sekretom makrofagov tudi znižajo aktivacijo kompleksa

Da bi se približali realnim fiziološkim pogojem, smo se odločili preveriti še delovanje sekretoma makrofagov na površino tumorskih celic in posledično na aktivacijo kompleksa. Namreč, katepsin L je v tumorskem mikrookolju prisoten kot produkt, izloček samih tumorskih celic. Poleg njega pa so v tumorskem mikrookolju prisotne tudi imunske celice, ki prav tako izločajo katepsine. Makrofagi so primer takih celic, ki izločajo katepsina S in B [212, 213]. Najprej smo v sekretomu makrofagov določili aktivno koncentracijo katepsinov (postopek: poglavje 3.2.11). Eksperiment je bil narejen v triplicatu in v povprečju smo dobili, da je koncentracija katepsinov okoli 60 nM (Slika 29).



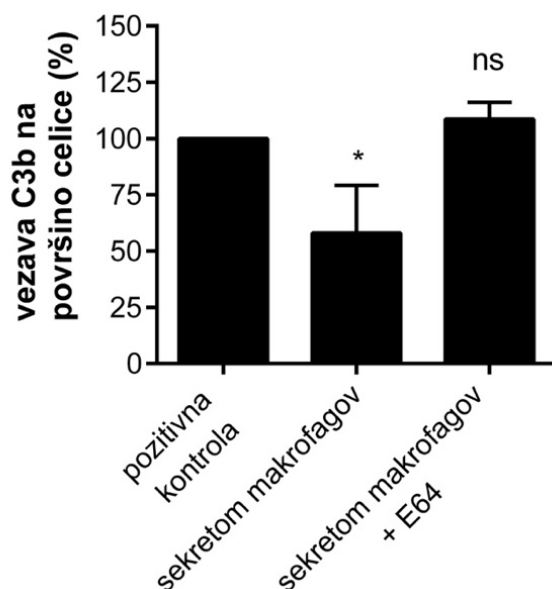
Slika 29: **Graf odvisnosti hitrosti proteolitske reakcije od koncentracije inhibitorja** – določitev aktivne koncentracije katepsinov v sekretomu makrofagov, ki je v tem primeru 60 nM.

Prenos po Westernu in imunodetekcija s protitelesi je pokazala prisotnost katepsinov B in S v sekretomu makrofagov, diferenciranih iz celične linije U937, medtem ko katepsina L nismo uspeli detektirati (Slika 30).



Slika 30: **Western blot sekretoma makrofagov**. Videti je prisotnost katepsinov S in B, ne pa tudi katepsina L.

Že prej smo pokazali, da ima izoliran katepsin S vpliv na raven aktivacije komplementa na površini MDA-MB-231 celic (Slika 23), katepsin B pa smo že predhodno testirali in ugotovili, da tega vpliva ne kaže [119]. Zanimalo nas je, če lahko sekretom makrofagov tudi zniža raven aktivacije komplementa na površini tumorskih celic. Celice MDA-MB-231 smo tretirali s sekretom makrofagov, kjer je bila koncentracija cisteinskih proteaz približno 60 nM, nato pa nadaljevali poskus kot predhodno in izvedli tretiranje celic s serumom, ki mu je sledilo imuno-označevanje.



Slika 31: Delež vezanega C3b na površino tumorskih celic po tretiranju s sekretom makrofagov.

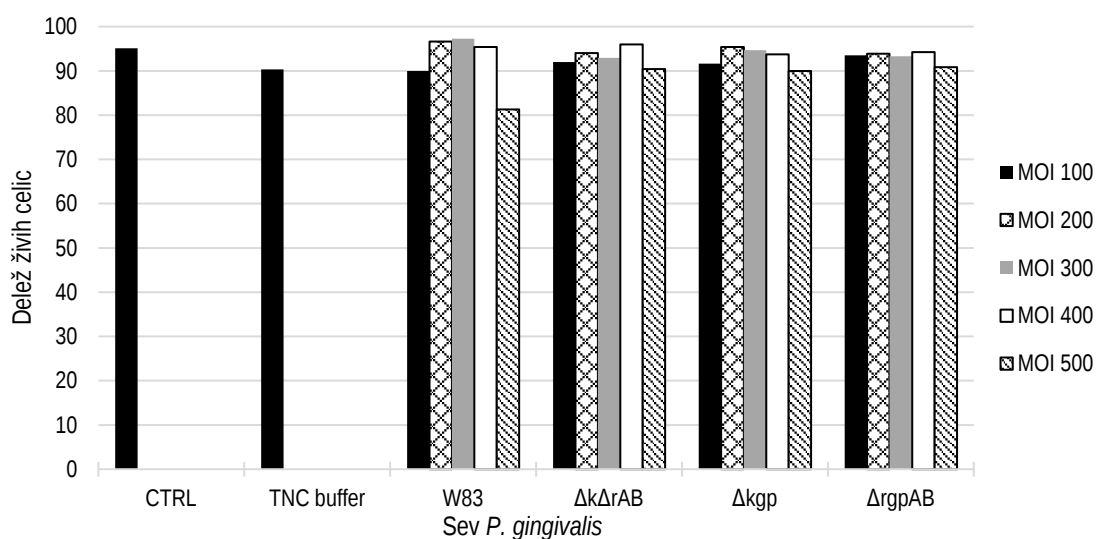
Z zgornjega grafa (Slika 31) je razvidno, da tretiranje celic s sekretom makrofagov tudi zniža aktivacijo komplementa na površini celic MDA-MB-231, dodatek splošnega inhibitorja za cisteinske proteaze E-64 pa ta efekt izniči. Sklepamo lahko, da so za ta efekt ključni cisteinski katepsini, najverjetneje katepsin S in da je znižanje aktivacije komplementa na tumorskih celicah tudi posledica odziva imunskega sistema na prisotnost rakavih celic.

4.2 Vpliv bakterijskih proteaz gingipainov na površino epitelijskih celic

Poleg človeških proteaz so pri aktivaciji komplementa lahko pomembne tudi proteaze, ki jih izločajo bakterije in ki tako lahko pomembno vplivajo na imunski odziv. Zato smo se odločili rezultate in dognanja prejšnje raziskave (Vpliv cisteinskih katapsinov na aktivacijo komplementa na površini tumorskih celic) prenesti še na druga področja. Izbrali smo paradontalno bolezen, kjer je bistveni problem kronično vnetje tkiva v dlesnih in vodi v izgubo mehkih tkiv ter v hujših oblikah bolezni tudi do izpadanja zob. Glavni krivci za to dogajanje so gingipaini, proteaze iz bakterij *P. gingivalis*, ki so tudi potencialni kandidati za šedaze. Zanimalo nas je torej, kako gingipaini vplivajo na dlesnične epitelijske celice, katere substrate lahko cepijo na njihovi površini in kako je to povezano z napredkom paradontalne bolezni.

4.2.1 Vpliv *P. gingivalis* na viabilnost celic TIGK

Za delo smo izbrali celično linijo TIGK – to so imortalizirane dlesnične epitelijske celice (keratinociti). Celice TIGK smo inkubirali z bakterijami *Porphyromonas gingivalis* in sicer s štirimi različnimi sevi: divji tip – W83, sev z izbitimi geni za vse tri gingipaine – $\Delta k\Delta r\Delta B$, sev z izbitima genoma za R-gingipaina – $\Delta rgpAB$ ter sev z izbitim genom za Kgp – Δkgp . Tretiranje je trajalo 45 minut in je bilo izvedeno v inkubatorju s temperaturo 37° C ter atmosfero s 5% CO₂. Po končanem poskusu smo preverili viabilnost celic. Poleg različnih sevov smo testirali tudi različne koncentracije bakterijskih celic: od MOI 100 do MOI 500, pri čemer je MOI razmerje med številom bakterij in številom TIGK celic. MOI 100 tako pomeni 100 bakterij na 1 TIGK celico.

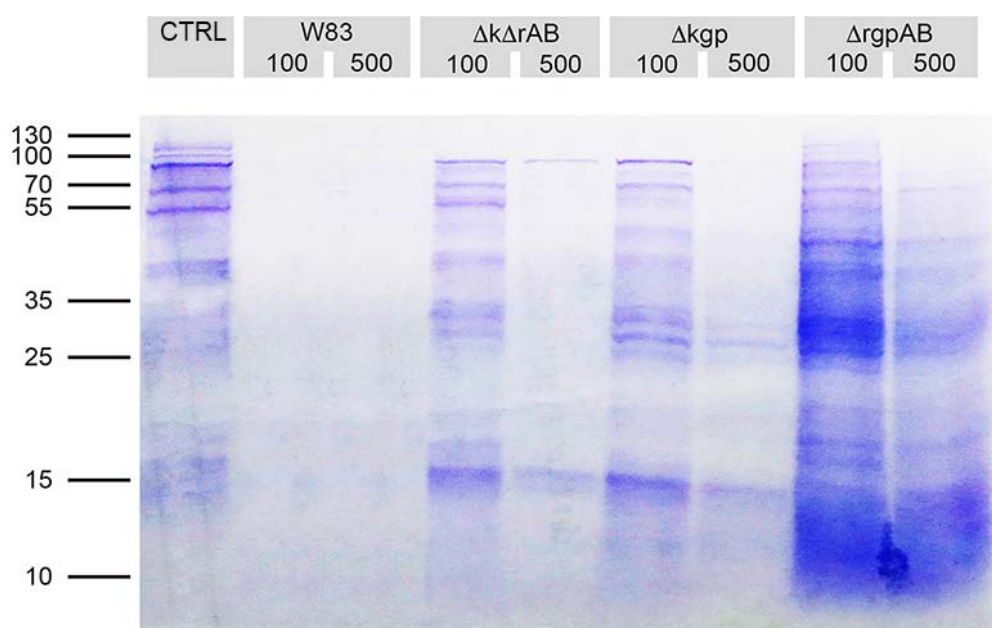


Slika 32: Delež živih celic TIGK po tretiranju z različnimi sevi in različnimi koncentracijami *P. gingivalis*. Ctrl je kontrola: žive in netretirane celice.

Na sliki zgoraj (Slika 32) je prikazana viabilnost celic po inkubaciji in na podlagi tega grafa smo lahko zaključili, da noben izmed sevov nima velikega vpliva na samo viabilnost celic TIGK, prav tako pa tudi najvišja koncentracija bakterijskih celic še ne povzroča opaznega povišanja celične smrti.

4.2.2 Višje koncentracije bakterij povzročijo prekomerno razgradnjo proteinov

Ko smo potrdili, da celice preživijo tretiranje, smo intaktne celice TIGK 45 minut inkubirali z omenjenimi sevi bakterij *P. gingivalis*. Za nadaljnjo analizo smo uporabili supernatant (šedom) in ga skoncentrirali z uporabo Amiconovih filtrov z membrano, ki prepušča proteine manjše od 3000 Da. Sledila je ločba proteinov v šedomu s pomočjo NaDS elektroforeze. Na gel smo nanесли po 20 μ L šedoma v vsako jamico. Kljub temu, da celice tretiranje z bakterijami preživijo, pa se je izkazalo, da je MOI 500 odločno previsoka koncentracija, saj je bilo proteinskih pasov na gelu izredno malo v primerjavi z vzorci, ki so bili tretirani z MOI 100. To nakazuje na dejstvo, da pri MOI 500 gingipaini ne samo odcepijo membranske proteine, ampak jih tudi razgradijo. Za nadaljnje analize smo zato uporabili le vzorce z MOI 100.



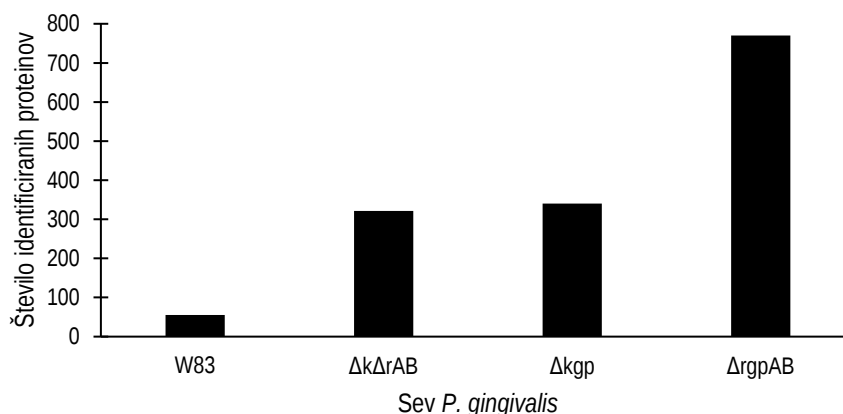
Slika 33: Gel po NaDS elektroforezi, pobarvan z barvilom Coomassie modro kaže količino proteinov v posameznem šedomu. CTRL je TNC pufer.

Ob medsebojni primerjavi vzorcev (Slika 33) smo opazili razlike v intenziteti barvila, torej v količini proteinov. Pri vzorcu W83 je bilo proteinov relativno malo, medtem ko vzorci $\Delta k\Delta rAB$, $\Delta k\Delta gp$ in $\Delta rgpAB$ kažejo precej višjo koncentracijo proteinov. Najbolj opazna je izredno visoka koncentracija v vzorcu $\Delta rgpAB$. Iz tega lahko sklepamo, da so bakterije *P. gingivalis* oz. njihove proteaze – gingipaini odgovorni za obsežno razgradnjo membranskih proteinov. Namreč, v vzorcu W83 (divji tip), kjer so prisotni vsi gingipaini, je očitno prišlo do obsežne razgradnje proteinov, medtem ko je v vzorcih z izbitimi geni za gingipaine, proteinov na gelu več – razgradnja je torej manj obsežna.

To je v skladu z dejstvom, da gingipaini predstavljajo približno 85% proteolitske aktivnosti bakterij *P. gingivalis*, vsekakor pa niso edine proteaze. Torej opaženega cepjenja in razgradnje proteinov ne smemo pripisati zgolj gingipainom, saj obstaja možnost, da so za to odgovorne tudi ostale bakterijske proteaze.

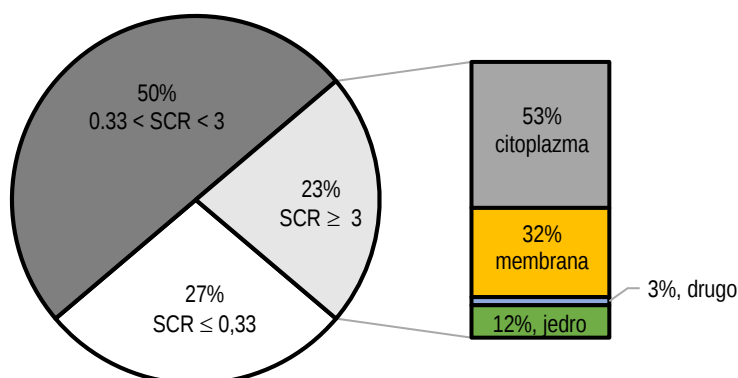
4.2.3 Masnospektrometrična analiza šedomov TIGK, tretiranih z bakterijami *P. gingivalis*

Šedome, ki smo jih pridobili z inkubiranjem celic TIGK s prej opisanimi štirimi sevi bakterij *P. gingivalis*, smo pripravili za analizo na masnem spektrometru (postopek opisan v poglavju 3.2.25). Glede na rezultat NaDS elektroforeze (Slika 33), smo za nadaljnjo analizo na masnem spektrometru uporabili le vzorce, ki so bili pripravljene z MOI 100. Analiza rezultatov je pokazala, da tudi pri tej koncentraciji bakterij že prihaja do razgradnje, saj je bilo z masno spektrometrijo identificiranih proteinov zelo malo (Slika 34).



Slika 34: Število identificiranih proteinov na masnem spektrometru v posameznem vzorcu, pripravljenem po postopku »in-gel«. Proteini, ki so bili identificirani z vsaj 2 peptidoma, so se šteli kot statistično zanesljivi rezultati masne spektrometrije.

Iz zgornje slike vidimo, da je bilo v vzorcu, inkubiranim z divjim tipom bakterij (W83) identificiranih izredno malo proteinov, kar nakazuje na velik delež razgradnje odcepljenih membranskih proteinov. Zato smo zamenjali način priprave vzorca s prvotnega »in-gel« postopka na »in-solution« postopek (opisan v poglavju 3.2.25.1), ki je omogočil, da smo lahko detektirali večje število proteinov v šedomih. V nadaljevanju smo naredili analizo za vzorec W83 z MOI 100.



Slika 35: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali z W83, MOI 100. Priprava po postopku »in-solution«. Kolobarji na grafu predstavljajo razporeditev identificiranih proteinov v tri skupine: proteine z v vzorcu povišano koncentracijo ($SCR \geq 3$), proteine z nespremenjeno količino proteinov ($0,33 < SCR < 3$) ter proteine z v vzorcu znižano koncentracijo ($SCR \leq 0,33$). Prva skupina je nato razdeljena še glede na lokalizacijo identificiranih proteinov znotraj celice.

Tabela 9: Število identificiranih proteinov v vzorcu sekretoma celic TIGK po tretiranju zW83 in pripravljenem po »in-solution« metodi glede na razmerje spektralnega štetja.

SCR	Število identificiranih proteinov
≥ 3	34
$0,33 < \text{SCR} < 3$	76
$\leq 0,33$	42

Število identificiranih proteinov je bilo kljub drugačnemu načinu priprave vzorcev še vedno nizko, je pa vsekakor višje kot pri pripravi vzorca po metodi »in-gel«. Predvsem smo opazili, da je veliko proteinov v tem vzorcu prisotnih v manjši količini v primerjavi s kontrolo ($\text{SCR} \leq 0,33$), kar spet nakazuje na nadaljnjo razgradnjo odcepljenih proteinov (Tabela 9).

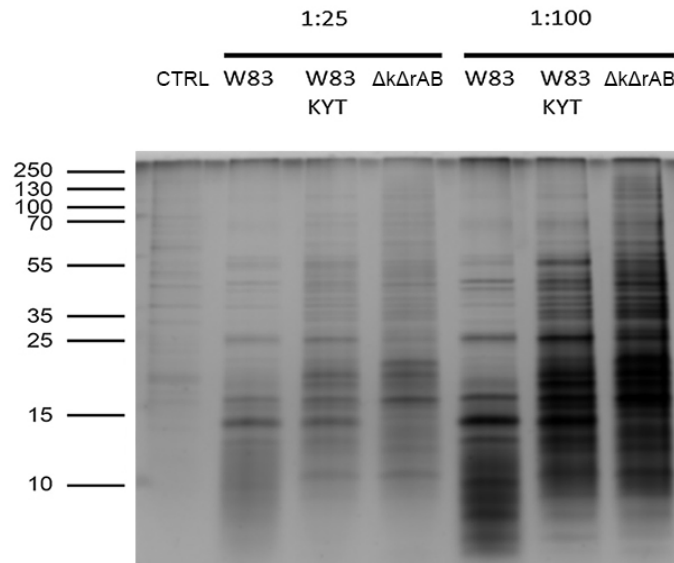
Tabela 10: Razporeditev identificiranih proteinov ($\text{SCR} \geq 3$) glede na njihovo celično lokalizacijo.

Lokalizacija	Število identificiranih proteinov
Citoplazma	18
Membrana	11
Drugo	1
Jedro	4

Tabela 11: Seznam potencialnih tarč gingipainov v sekretomu/šedomu celic TIGK inkubiranih z W83, MOI 100.

Ime protein	Ime gena	Št. identificiranih peptidov		SCR	
Aneksin A1	ANXA1	5	4	7	2,5
Aneksin A2	ANXA2	8	6	7,5	3
Antigen CD44	CD44	4	4	1,2	9
Protein CYR61	CYR61	3	3	5	5
Endoplazmin	HSP90B1	8	8	8	2,3
Zaradi hipoksije izražen protein 1	HYOU1	3	3	5	6
Lamininska podenota alfa-3	LAMA3	6	6	9	0,8
Lamininska podenota gama-2	LAMC2	3	3	4	4
Receptorski tip tirozin-proteinske fosfataze F	PTPRF	10	5	18	11
Sindekan-4	SDC4	5	4	3,7	10
S tumorjem povezan prenašalec Ca-signalov 2	TACSTD2	3	3	4	5

Iz zgornjih tabel (Tabela 9, Tabela 10 in Tabela 11) in grafa (Slika 35) vidimo, da je število identificiranih proteinov relativno nizko, zato smo se odločili preveriti še nižje koncentracije bakterij ter vpliv gingipainskih inhibitorjev na razgradnjo proteinov v šedomu.



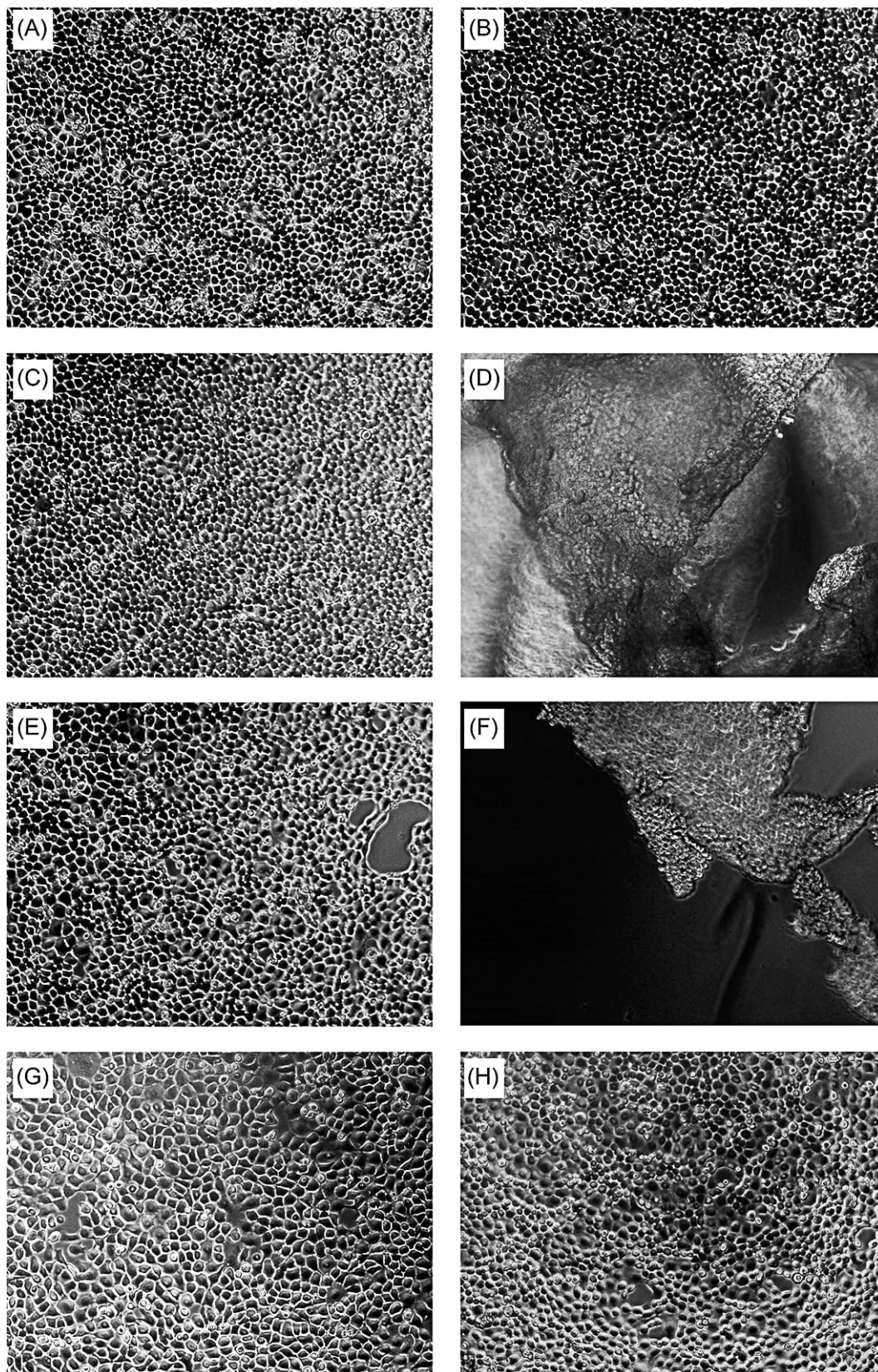
Slika 36: Gel sekretomov celic TIGK po inkubaciji z bakterijami *P. gingivalis* v razmerju MOI 25 in 100, pobarvan s srebrom. Gel je pripravila dr. Alicia Wong.

Slika 36 prikazuje količino proteinov v šedomu celic TIGK. Tokrat smo primerjali vzorca s koncentracijo bakterij MOI 25 in MOI 100 in opazili, da je bila v primeru nižje koncentracije količina proteinov manjša. Najbolj je bila opazna razlika med vzorcema W83 z MOI 100 in MOI 25. Pri koncentraciji MOI 100 je bilo na gelu opaziti veliko količino majhnih proteinov (pri nižjih molekulskih masah), kar kaže na razgradnjo v šedomu, med tem ko je bilo majhnih proteinov v vzorcu MOI 25 bistveno manj. Ko smo pri višji bakterijski koncentraciji vzorcu dodali mešanico inhibitorjev gingipainov (KYT), smo opazili dodaten premik proteinskih pasov na gelu k višjim molekulskim masam. Slednji je bil še bolj opazen pri vzorcu bakterij brez gingipainov ($\Delta k\Delta rAB$). Manjši delež proteinov z nižjimi molekulskimi masami kaže na manjši obseg razgradnje. Iz opazanja, da sev $\Delta k\Delta rAB$, ki nima prisotnih aktivnih gingipainov ne povzroča obsežne razgradnje, lahko sklepamo tudi, da gingipaini bistveno prispevajo k razgradnji proteinov v šedomu, medtem ko druge bakterijske proteaze tukaj očitno nimajo tako pomembne vloge, čeprav je ne moremo popolnoma izključiti. Pri tem je namreč potrebno upoštevati, da že sama prisotnost bakterij sproži izločanje ali razgradnjo proteinov iz celic TIGK.

4.2.4 Vpliv izoliranih gingipainov na viabilnost in adhezivnost celic TIGK

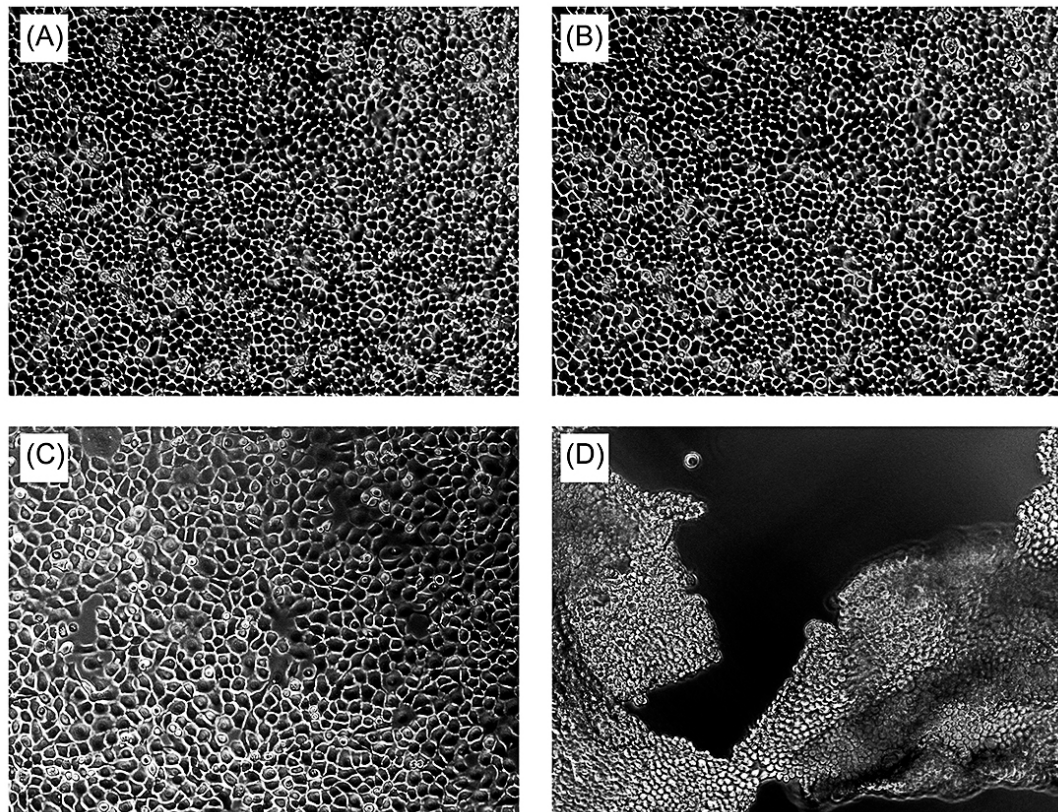
Pri poskusih z bakterijami *P. gingivalis* smo videli, da so gingipaini bistvenega pomena za proteolitsko aktivnost, saj razgradijo velik del celičnih proteinov. Da bi njihovo vlogo in mehanizem delovanja poglobljeje spoznali, smo pripravili eksperiment, kjer smo celice TIGK tretirali s posameznimi izoliranimi gingipaini.

Za začetek je bilo potrebno izdelati metodo in določiti optimalne pogoje za izvedbo eksperimentov. S testno inkubacijo TIGK celic z izoliranimi gingipaini smo določili optimalni čas za izvedbo eksperimenta ter primerno koncentracijo gingipainov. Najprej smo preverili stanje celic TIGK tekom eksperimenta in opazili, da gingipaini povzročajo odlepljanje sicer adhezijskih celic s površine petrijevke.



Slika 37: Spremljanje delovanja gingipainov na konfluentne celice TIGK pod svetlobnim mikroskopom. Na sliki (A) vidimo morfologijo celic ob času 0 min, nato pa sledijo slike celic po 45-minutnem tretiranju z: (B) TNC pufrom, (C) 4 nM RgpB, (D) 40 nM RgpB, (E) 4 nM HRgpA, (F) 40 nM HRgpA, (G) 4 nM Kgp in (H) 40 nM Kgp.

Na sliki (Slika 37) vidimo, da so pri nižji koncentraciji gingipainov (4 nM) celice ostale bolj ali manj nespremenjene. Pri višji koncentraciji pa so se v primeru tretiranja z gingipainoma RgpB in HRgpA po 45 minutah celice popolnoma odlepile. Podobno je bilo pokazano tudi za fibroblaste, tretirane z gingipaini [186]. Kgp gingipain se tu nekoliko razlikuje od preostalih dveh gingipainov, saj tudi pri koncentraciji 40 nM in 45-minutni inkubaciji celic ne odlepi s podlage. Pri še višji koncentraciji (100 nM) in 30-minutnem tretiranju pa dosežemo podoben učinek kot pri ostalih gingipainih (Slika 38). To je v skladu z literaturo, ki Kgp opisuje kot proteazo z nižjo proteolitično aktivnostjo in počasnejšim proteolitskim delovanjem [214].



Slika 38: Spremljanje delovanja gingipaina Kgp na konfluentne celice TIGK pod svetlobnim mikroskopom. (A) predstavlja kontrolo: celice TIGK v pufru TNC pri 0 minutah, (B) so celice, tretirane s pufrom TNC po 30 minutah, (C) so celice tretiranje s Kgp pri koncentraciji 4 nM ter (D) pri koncentraciji 100 nM.

Nadalje nas je zanimalo, ali so odlepljene celice žive. Zato smo ponovno izvedli poskus, kjer smo merili viabilnost celic TIGK po tretiranju z različnimi koncentracijami gingipainov. Izkazalo se je, da so v vseh primerih (pri vseh gingipainih) po 45 minutah celice večinoma še žive (več kot 90% živih celic) [215].

Tako smo določili pogoje za izvedbo nadaljnjih poskusov: inkubacija 45 minut, koncentracije gingipainov pa 4 nM in 75 nM. S tem smo poskušali ponazoriti dve stopnji napredovanja paradontalne bolezni: pri nižji koncentraciji (4 nM) gingipainov smo opazovali dogajanje na začetku bakterijske infekcije, pri višji koncentraciji (75 nM) pa smo v nadaljevanju opazovali, kakšna bi lahko bila vloga gingipainov pri napredovanju bolezni v ustni votlini. Obe koncentraciji sta znotraj fizioloških vrednosti, hkrati pa višja koncentracija tudi omogoča gingipainu Kgp, da njegova proteolitska aktivnost pride do izraza.

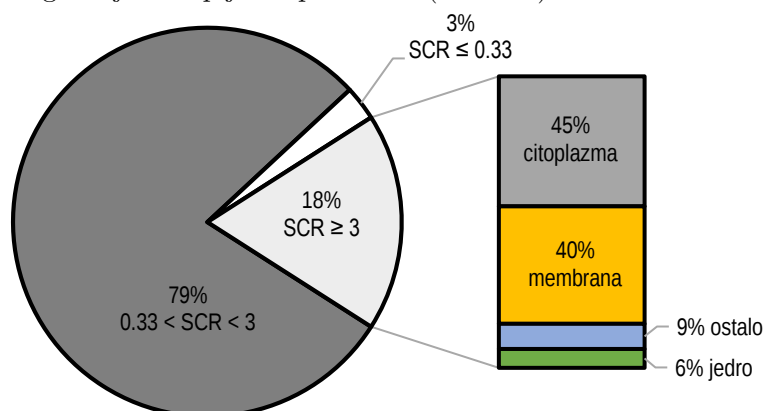
4.2.5 Določitev zunajceličnih membranskih substratov gingipainov

Po tretiranju celic TIGK z gingipaini smo vzorce pripravili za proteomsko analizo z masnim spektrometrom. S to metodo in z uporabo spektralnega štetja smo določili potencialne tarče gingipainov. Spektralno štetje je postopek, ki temelji na predpostavki, da je število posnetih spektrov peptidov iz analiziranega vzorca odvisno od količine (relativne koncentracije) odcepljenih domen proteina, ki se po delovanju gingipainov sprostijo s celične membrane v supernatant. V skladu s postopkom, ki je bil uporabljen že v preteklih raziskavah na našem odseku [119], smo izračunali relativno razliko med številom spektrov v vzorcu in v kontroli, to je SCR (*spectral count ratio*) oz. MS/MS razmerje. Da smo določen protein upoštevali kot potencialno tarčo gingipainov na površini celice, je moral zadostiti naslednjim pogojem:

- 1.) za identifikacijo proteina sta potrebna vsaj 2 peptida,
- 2.) spektralno razmerje je večje od 3 (kar pomeni, da je prisotnost določenega proteina v vzorcu občutno povečana v primerjavi s kontrolo) in
- 3.) protein mora biti membranskega izvora.

4.2.5.1 Tretiranje TIGK celic s 4 nM in 75 nM RgpB

Ob delovanju gingipaina RgpB na celice, smo ugotovili, da ima slednji zelo visok proteolitični potencial. Tako smo pri višji koncentraciji gingipaina RgpB (75 nM) opazili poleg šedinga tudi razgradnjo odcepljenih proteinov (Slika 39).



Slika 39: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 75 nM RgpB.

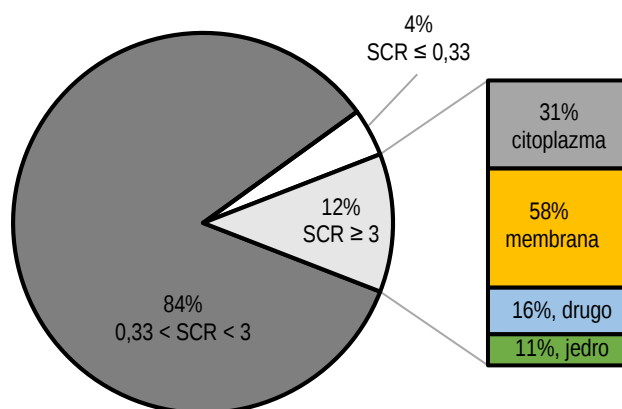
Tabela 12: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 75 nM RgpB.

SCR	Št. identificiranih proteinov
≥ 3	139
$0,33 < \text{SCR} < 3$	607
$\leq 0,33$	22

Tabela 13: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 75 nM RgpB) v večjem številu.

Lokalizacija proteina	Št. identificiranih proteinov
Citoplazma	62
Membrana	56
Ostalo	12
Jedro	9

Kljub obetavni razporeditvi identificiranih proteinov glede na njihovo koncentracijo v vzorcu v primerjavi s kontrolo (SCR) smo v tem primeru opazili, da imamo v vzorcu precej povečano število citoplazemskih proteinov, kar je navadno znak, da je prišlo do določene stopnje lize celic (Tabela 12, Tabela 13). Posledično smo se odločili, da za nadaljnje poskuse in vrednotenje rezultatov izberemo nižjo koncentracijo gingipaina RgpB, torej 4 nM.



Slika 40: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 4 nM RgpB.

Tabela 14: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 4 nM RgpB.

SCR	Št. identificiranih proteinov
≥ 3	55
$0,33 < SCR < 3$	393
$\leq 0,33$	19

Iz grafa (Slika 40) in tabele (Tabela 14) vidimo, da je večina proteinov v nespremenjenih količinah glede na kontrolo (to je SCR med 0,33 in 3). Le 4% vseh proteinov je v vzorcu v nižji koncentraciji (SCR je manjši 0,33), 12% pa jih je bolj pogostih (SCR ≥ 3). Torej pri tretiranju s 4 nM RgpB do opazne razgradnje proteinov ni prihajalo. Le-to bi sicer opazili po visokem deležu proteinov s SCR $\leq 0,33$. Nas so zanimali predvsem proteini, ki jih gingipaini odcepljajo s površine membrane, zato smo proteine s SCR večjim od 3 analizirali kot potencialne tarče gingipainskega šedinga.

Tabela 15: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 4 nM RgpB) v večjem številu.

Lokalizacija proteina	Št. identificiranih proteinov
Citoplazma	17
Membrana	23
Ostalo	9
Jedro	6

Izmed vseh identificiranih potencialnih tarč gingipainov smo izbrali tiste, ki so bili v vzorcih v večjem številu glede na kontrolo in preverili njihovo celično lokalizacijo. Največ je membranskih proteinov, sledijo citoplazemski proteini, ki so pogosto tudi sestavni del sektretoma celic. Prav tako smo identificirali nekatere proteine, ki jih celice že same konstitutivno izločajo in jih umestili v skupino »Ostalo« (Tabela 15).

Tabela 16: Seznam potencialnih tarč 4 nM gingipaina RgpB na površini celic TIGK.

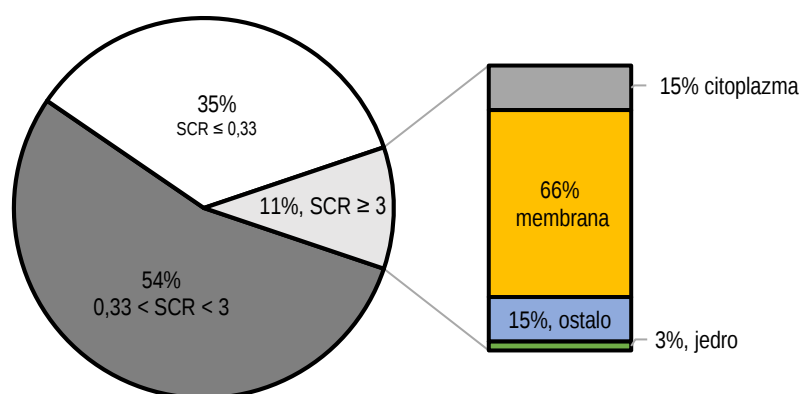
Ime proteina	Ime gena	Št. identificiranih peptidov			SCR		
Aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (antigen CD166)	ALCAM	8	11	12	22	20	23
Antigen predstavljaajoči kompleks 2, podenota alfa 1	AP2A1	3	5	7	6	6	9
Antigen CD109	CD109	25	27	54	28,5	18	5,2
Antigen CD44	CD44	4	4	5	12,5	9,5	2,7
Kolagen alfa 1, veriga XVII	COL17A1	7	5	0	8,5	4,5	1
Kolagen alfa 1, veriga XVIII	COL18A1	6	6	6	6	9	6
Distroglikan	DAG1	6	5	10	12	8	7,3
Diskoidin	DCBLD2	3	2	4	4	3	7
Desmokolin-1	DSC1	2	5	0	3	7	1
Desmoplakin	DSP	10	23	6	4	10,3	1
Receptor epidermalnega rastnega faktorja	EGFR	7	7	8	39	31	6,8
Ektonukleotidna fosfataza/fosfodiesteraza 1	ENPP1	6	5	7	11	11	6,5
Z levcinskimi ponovitvami bogat transmembranski protein FLRT3	FLRT3	12	7	13	26	14	8,8
Pleksin-A1	PLXNA1	2	2	6	4	2	9
Plexin-B2	PLXNB2	5	9	8	11	15	6
Neaktivna tirozin-proteinska kinaza 7	PTK7	7	8	6	9,5	8	5
Receptorski tip tirozin-proteinske fosfataze F	PTPRF	23	18	22	7,7	4,6	4,5
Receptorski tip tirozin-proteinske fosfataze kapa	PTPRK	3	6	5	6	9	5

Receptor tip tirozin-proteinske fosfataze S	PTPRS	2	1	4	3	2	5
Protein tumorske supresije 14	ST14	10	8	8	18	18	5,7
Teneurin-3	TENM3	3	4	2	4	5	3
Transferinski receptor 1	TFRC	4	1	7	5	2	6,5
Netrinski receptor UNC5B	UNC5B	3	6	2	8	11	3

V zgornji tabeli (Tabela 16) so prikazane potencialne tarče 4 nM RgpB. Upoštevali smo vse kriterije: SCR večji od tri, identificirana vsaj dva peptida ter lokalizacija na membrani oz. v medceličnini. Med temi rezultati smo opazili velik delež adhezijskih proteinov, ki so očitno glavna tarča gingipainov. S tem seznamom smo potrdili opažanja iz poskusa opazovanja vpliva gingipainov na celice (Slika 37), kjer smo prvič opazili, da gingipaini povzročajo odlepljanje celic s površine. Nismo pa opazili nobenih proteinov, povezanih s komplementom, kar je bila sicer naša hipoteza.

4.2.5.2 Tretiranje TIGK celic s 4 nM in 75 nM HRgpA

Gingipain HRgpA se pogosto nahaja v kompleksu s Kgp, zato je bilo potrebno pri eksperimentih s tem gingipainom dodajati inhibitor za Kgp – na ta način smo lahko spremljali le delovanje HRgpA. Tako kot RgpB je tudi HRgpA izredno močna proteaza in pri višji koncentraciji (75 nM) lahko opazimo tudi razgradnjo odcepljenih domen (Slika 41).



Slika 41: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 75 nM HRgpA.

Tabela 17: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 75 nM HRgpA.

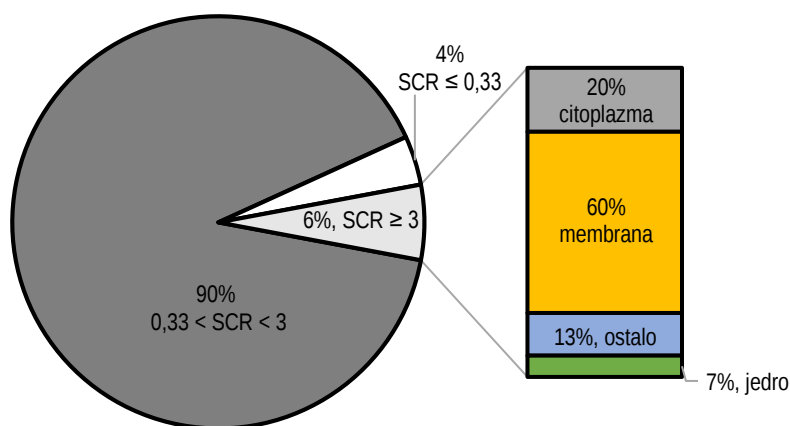
SCR	Št. Identificiranih proteinov
≥ 3	32
$0,33 < \text{SCR} < 3$	168
$\leq 0,33$	109

Tabela 18: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 75 nM HRgpA) v večjem številu.

Lokalizacija proteina	Št. identificiranih proteinov
Citoplazma	5
Membrana	21
Ostalo	5
Jedro	1

Pri tretiranju s 75 nM HRgpA je bil delež proteinov z nižjo koncentracijo v primerjavi s kontrolo znaten, kar nakazuje na razgradnjo membranskih proteinov (Tabela 18). Po drugi strani pa imamo pri tem tretiranju tudi precejšen delež membranskih proteinov. Največjega izmed vseh vzorcev. To pa nam lahko pove, da je HRgpA zelo specifičen za cepitve membranskih proteinov (Slika 42, Tabela 18).

Zaradi precej dvoumnih rezultatov tretiranja celic z višjo koncentracijo HRgpA, smo tudi v tem primeru za nadaljnjo obravnavo upoštevali rezultate tretiranja celic TIGK s 4 nM HRgpA.



Slika 42: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 4 nM HRgpA.

Tabela 19: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 4 nM HRgpA.

SCR	Št. Identificiranih proteinov
≥ 3	30
$0,33 < SCR < 3$	444
$\leq 0,33$	19

Tudi v primeru tretiranja celic TIGK s 4nM HRgpA smo opazili, da je velika večina proteinov v nespremenjeni koncentraciji (Tabela 19). Zelo majhen delež proteinov je v vzorcu prisoten v nižji koncentraciji kot pa v kontroli in to nam spet potrdi, da ne gre za obsežno razgradnjo odcepljenih proteinov. Tudi relativno majhen delež proteinov (30 proteinov, kar je 6%) se v vzorcu pojavlja bolj pogosto kot v kontroli, kar nakazuje na

dejstvo, da so cepitve verjetno zelo specifične. Za teh 30 proteinov smo preverili lokalizacijo v celici in pripravili naslednjo tabelo:

Tabela 20: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 4 nM HRgpA) v večjem številu.

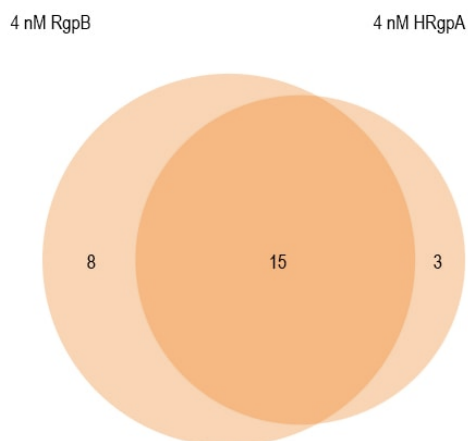
Lokalizacija proteina	Št. identificiranih proteinov
Citoplazma	6
Membrana	18
Ostalo	4
Jedro	2

Iz tabele zgoraj (Tabela 20) vidimo, da je bila velika večina identificiranih proteinov (18 proteinov od 30) membranskega izvora. Malo jedrnih proteinov kaže na to, da so bile celice tekom eksperimenta v normalnem stanju in da praktično ni prihajalo do lize celic. V spodnji tabeli so predstavljene vse potencialne membranske tarče, ki smo jih detektirali v supernatantih celic TIGK, tretiranih s 4 nM HRgpA.

Tabela 21: Seznam potencialnih membranskih tarč 4 nM HRgpA.

Ime proteina	Ime gena	Št. identificiranih peptidov			SCR		
Aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (antigen CD166)	ALCAM	9	4	2	5	9	3
Antigen CD109	CD109	41	37	36	4,7	3,6	3,3
Antigen CD44	CD44	3	5	5	3,6	3,3	3,8
Kadherin-3	CDH3	3	3	2	4	5	3
Distroglikan	DAG1	2	7	5	2	4	3,5
Diskoidin	DCBLD2	4	1	2	5	2	3
Desmoglein-1	DSG1	4	3	3	5	3	2
Efrin-B1	EFNB1	4	2	2	6	5	3
Receptor epidermalnega rastnega faktorja	EGFR	6	8	6	15	4,4	3,1
Ektonukleotidna alkalna fosfodiesteraza 1	ENPP1	4	8	8	9	5,3	4
Z levcinskimi ponovitvami bogat transmembranski protein FLRT3	FLRT3	13	9	8	26	9	9
Pleksin-A1	PLXNA1	10	3	4	13	4	5
Pleksin-B2	PLXNB2	3	8	5	7	12	8
Neaktivna tirozin-proteinska kinaza 7	PTK7	9	6	3	6,5	3,3	2,3
Receptorski tip tirozin-proteinske fosfataze F	PTPRF	16	20	16	4	4,2	2,8
Receptorski tip tirozin-proteinske fosfataze K	PTPRK	4	4	4	7	2,7	3
Protein tumorske supresije 14	ST14	9	9	8	20	5,7	5
Transferinski receptor 1	TFRC	2	2	1	3	3	1

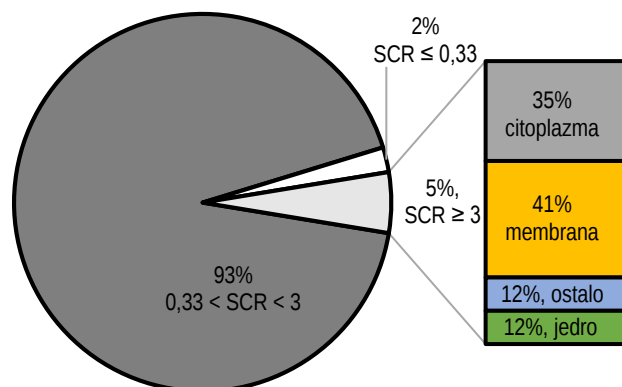
Opazimo lahko, da so tarče zelo podobne kot v šedemu, pridobljenem s 4 nM RgpB, kar je logično, saj imata gingipaina enako specifičnost – oba cepita proteine za Arg-ostankom v peptidni verigi. Za boljšo predstavbo, koliko in katere tarče so skupne obema gingipainoma, smo pripravili spodnji graf (Slika 43) in tabelo.



Slika 43: **Presečni diagram skupnih substratov gingipainov RgpB in HRgpA.** Graf je pripravljen s pomočjo spletne platforme Venny [216].

Tabela 22: **Seznam skupnih tarč gingipainov HRgpA in RgpB.**

Ime proteina	Ime gena	Št. identificiranih peptidov (povpr.)		SCR (povpr.)	
		RgpB	HRgpA	RgpB	HRgpA
Aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (antigen CD166)	ALCAM	11	5	21,7	5,7
Antigen CD109	CD109	35	38	17,2	3,9
Antigen CD44	CD44	4	4	8,2	3,6
Distroglikan	DAG1	7	5	9,1	3,2
Diskoidin	DCBLD2	3	3	4,7	3,3
Receptor epidermalnega rastnega faktorja	EGFR	7	7	25,6	7,5
Ektonukleotidna alkalna fosfodiesteraza 1	ENPP1	6	7	9,5	6,1
Z levcinskimi ponovitvami bogat transmembranski protein FLRT3	FLRT3	11	10	16,3	14,7
Pleksin-A1	PLXNA1	3	5	5	7,3
Pleksin-B2	PLXNB2	7	5	10,7	9
Neaktivna tirozin-proteinska kinaza 7	PTK7	7	6	7,5	4



Slika 45: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 4 nM Kgp.

Tabela 23: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 4 nM Kgp.

SCR	Št. identificiranih proteinov
≥ 3	17
$0,33 < SCR < 3$	304
$\leq 0,33$	7

Na grafu Slika 45 (in v tabeli - Tabela 23) vidimo, da za razliko od tretiranja z RgpB in HRgpA v primeru Kgp do razgradnje odcepljenih proteinov ne prihaja, saj je delež proteinov z nižjo koncentracijo v primerjavi s koncentracijo v kontroli izredno majhen (samo 7 proteinov oz. 2%, ima $SCR \leq 0,33$).

Tabela 24: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 4 nM Kgp) v večjem številu.

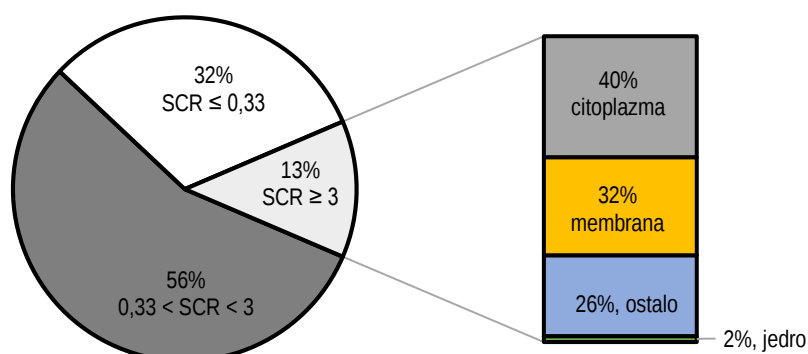
Lokalizacija proteina	Št. identificiranih proteinov
Citoplazma	6
Membrana	7
Ostalo	2
Jedro	2

Iz tabele zgoraj (Tabela 24) vidimo, da je tudi v primeru šibkejše proteazne aktivnosti gingipaina Kgp, citoplazemskih proteinov v šedemu opazen odstotek. Kot smo že omenili, je to normalen pojav pri pripravi sekretoma celic TIGK. Malo jedrnih proteinov pomeni, da do povečanja celične smrti tekom poskusa ni prihajalo.

Tabela 25: Seznam potencialnih membranskih tarč 4 nM Kgp.

Ime proteina	Ime gena	Št. identificiranih peptidov		SCR	
Aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (antigen CD166)	ALCAM	13	11	3,5	5,3
Molekula bazalne celične adhezije	BCAM	5	4	10	9
Z levcinskimi ponovitvami bogat transmembranski protein FLRT3	FLRT3	17	10	2,8	8,3
Neaktivna tirozin-proteinska kinaza 7	PTK7	11	10	1,5	4,8
Receptorski tip tirozin-proteinske fosfataze Kapa	PTPRK	5	3	1,4	5
Protein tumorske supresije 14	ST14	11	7	1,8	8
Vasorin	VASN	3	2	3	3

Ker je bilo pri tretiranju celic s 4 nM Kgp identificiranih membranskih proteinov relativno malo (Tabela 25), smo analizirali še višjo koncentracijo Kgp – 75 nM, saj je po količini cepljenih proteinov bolj podobna preostalima gingipainoma, 4 nM RgpB in 4 nM HRgpA.



Slika 46: Graf porazdelitve identificiranih proteinov v vzorcu, kjer smo celice TIGK tretirali s 75 nM Kgp.

Na grafu Slika 46 vidimo, da je kljub počasnejšemu delovanju gingipaina Kgp potekala tudi razgradnja odcepljenih proteinov, saj je delež proteinov, ki so bili v vzorcih v manjšem številu kot v kontroli ($SCR \leq 0,33$), večji kot pri prejšnjih dveh gingipainih (Tabela 26).

Tabela 26: Razporeditev identificiranih proteinov glede na SCR po tretiranju TIGK s 75 nM Kgp.

SCR	Št. identificiranih proteinov
≥ 3	53
$0,33 < \text{SCR} < 3$	238
$\leq 0,33$	150

Proteinom, ki so imeli $\text{SCR} \geq 3$, smo določili celično lokalizacijo, ki je predstavljena v tabeli spodaj (Tabela 27). Nato smo izbrali membranske proteine in naredili seznam potencialnih tarč 75 nM Kgp (Tabela 28).

Tabela 27: Lokalizacija proteinov, ki so bili v vzorcu (TIGK tretirane s 75 nM Kgp) v večjem številu.

Lokalizacija proteina	Št. identificiranih proteinov
Citoplazma	21
Membrana	17
Ostalo	14
Jedro	1

Tabela 28: Seznam potencialnih membranskih tarč 75 nM Kgp.

Ime proteina	Ime gena	Št. identificiranih peptidov		SCR	
ADAM10	ADAM10	2	2	3	4
Aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (antigen CD166)	ALCAM	2	2	5	4
Placentni tip bazične fosfataze	ALPP	1	4	2	8
Molekula bazalne celične adhezije	BCAM	13	10	11,3	9,3
Kolagen alfa 1-(XVII)	COL17A1	2	2	7	5
Kolagen alfa 1-(XVIII)	COL18A1	12	11	5,4	5
Kolagen alfa 1-(VII)	COL7A	16	15	3,6	4
Kopin-3	CPNE3	3	3	6	5
Epitelijski receptor 1, ki vsebuje diskondinsko domeno	DDR1	3	2	4	3
Receptor epidermalnega rastnega faktorja	EGFR	7	6	3,7	3,1
Z levcinskimi ponovitvami bogat transmembranski protein FLRT3	FLRT3	5	5	5	4

Integrin alfa - 6	ITGA6	2	2	3	3
Receptor endotelijskega proteina C	PROCR	2	2	7	4
Neaktivna tirozin-proteinska kinaza 7	PTK7	7	4	8,5	7,5
Receptorski tip tirozin-proteinske fosfataze F	PTPRF	19	21	3,7	4,3
Retikulon-4 receptorju podoben protein 1	RTN4RL1	2	2	3	3
Protein tumorske supresije 14	ST14	9	10	6,7	6
Transferinski receptor 1	TFRC	4	2	5	3
Tetraspanin-4	TSPAN4	3	2	5	5
Vasorin	VASN	2	3	4	7

V tabeli so zbrane potencialne tarče proteazne aktivnosti 75 nM Kgp na površini celic TIGK. S tem gingipainom smo izvedli le dva smiselna poskusa. Kljub drugačni specifičnosti so med tarčami večinoma adhezijski proteini. Iz tega sklepamo, da imajo vsi gingipaini pomembno vlogo, pri razgradnji povezav med celicami in posledično pri uničevanju dlesničnega tkiva ter razvoju paradontalne bolezni.

4.2.5.4 Povzetek rezultatov tretiranja TIGK celic z gingipaini

Če povzamemo zgornje rezultate vidimo, da je v vseh primerih največ proteinov z nespremenjeno koncentracijo. Če primerjamo proteomske rezultate, dobljene z višjo (75 nM) in nižjo (4 nM) koncentracijo gingipainov, opazimo, da je bilo pri 75 nM HRgpA in 75 nM Kgp število proteinov z nižjo koncentracijo občutno večje kot pa v primeru 4 nM. Pri tretiranju celic s Kgp smo ugotovili najnižje število proteinov s $SCR \leq 0,33$, pri čemer smo jih lahko identificirali le 7. Nasprotno pa pri tretiranju z RgpB nismo opazili bistvene razlike v številu proteinov s $SCR \leq 0,33$ pri višji ali nižji koncentraciji gingipaina. Vseeno pa je bilo celokupno število identificiranih proteinov višje pri 75 nM RgpB. To je verjetno posledica odziva celic na višjo koncentracijo RgpB kot tudi večja proteolitska aktivnost. Zaradi vsega omenjenega smo se odločili, da vse nadaljnje eksperimente izvajamo z nižjo koncentracijo gingipainov (4 nM), kjer je obseg razgradnje manjši.

Tabela 29: Seznam membranskih proteinov, ki so bili identificirani s 4 nM RgpB, HRgpA in Kgp.

Protein name	Gene name	RgpB	HRgpA	Kgp
Aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (antigen CD166)	ALCAM	x	x	x
Antigen predstavljaajoči kompleks 2, podenota alfa 1	AP2A1	x		
Molekula bazalne celične adhezije	BCAM			x
Antigen CD109	CD109	x	x	
Antigen CD44	CD44	x	x	
Kadherin-3	CDH3		x	
Kolagen alfa 1-(XVII)	COL17A1	x		
Kolagen alfa 1-(XVIII)	COL18A1	x		

Distroglikan	DAG1	x	x	
Diskoidin	DCBLD2	x	x	
Desmokolin-1	DSC1	x		
Desmoglein-1	DSG1		x	
Desmoplakin	DSP	x		
Efrin-B1	EFNB1		x	
Receptor epidermalnega rastnega faktorja	EGFR	x	x	
Ektonukleotidna alkalna fosfodiesteraza 1	ENPP1	x	x	
Z levčinskimi ponovitvami bogat transmembranski protein FLRT3	FLRT3	x	x	x
Pleksin-A1	PLXNA1	x	x	
Pleksin-B2	PLXNB2	x	x	
Neaktivna tirozin-proteinska kinaza 7	PTK7	x	x	x
Receptorski tip tirozin-proteinske fosfataze F	PTPRF	x	x	
Receptorski tip tirozin-proteinske fosfataze kapa	PTPRK	x	x	x
Receptor tip tirozin-proteinske fosfataze S	PTPRS	x		
Protein tumorske supresije 14	ST14	x	x	x
Teneurin-3	TENM3	x		
Transferinski receptor 1	TFRC	x	x	x
Netrinski receptor UNC5B	UNC5B	x		
Vasorin	VASN			x

Večina proteinov, identificiranih po tretiranju s 4 nM gingipaini, je bilo membranskega izvora, sledili pa so citoplazemskih, jedrnih in ostalih proteinov pa je bilo zanemarljivo malo. Iz tega lahko sklepamo, da gingipainska razgradnja dejansko poteka na površini celic TIGK. V tabeli zgoraj (Tabela 29) smo zbrali 28 membranskih proteinov, ki so potencialni substrati gingipainov. Večina teh je bila identificiranih v vzorcih z RgpB, ki se je izkazal za proteazo z največjo proteolitsko aktivnostjo. Sledi mu HRgpA in nato Kgp z najmanj cepljenimi proteini. Podrobneje smo pogledali Transferinski receptor 1 (TFRC), antigen CD44, Aktivirano levkocitno molekulo za celično adhezijo (ALCAM) in Pleksin B2 (PLXB2). Naredili smo analizo sekvenc peptidov (Slika 47), s katerimi smo identificirali prej omenjene proteine. Opazili smo, da so bile vse cepitve na zunajcelični strani, kar potrjuje našo hipotezo, da so gingipaini sposobni šedinga. RgpB kot najmočnejša proteaza je generiral največ cepitev, poleg tega pa smo opazili, da je večina cepitvenih mest za RgpB in HRgpA identična. To je seveda posledica zelo podobne specifičnosti teh dveh gingipainov. V primeru proteina TFRC smo opazili, da HRgpA in RgpB cepita peptidno vezo med Arg109-Glu110 in celo med Arg100-Leu101, kar je le 12 aminokislinskih ostankov od membrane in potrjuje, da je šlo v tem primeru za šeding. Po drugi strani pa smo opazili, da Kgp cepi TFRC nekoliko dlje, med Lys145-Leu146, morda bi lahko tudi za Lys130 ali Lys134. V primeru ostalih proteinov (ALCAM, CD44, Plexin B2) so bile cepitve še bolj oddaljene od membrane, zato ne moremo z gotovostjo trditi, da je šlo za šeding.

Transferin receptor protein 1 (TFRC)

MMDQARSAFNSLFGGEPLSYTRFSIARQVDGDNHSEMKLAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSIC
 YGTIAHIVFFLIGEMIGYLGCKGVPEKTECERLAGTESPVREFPGEDFPWARRIYWDLLKRLSEKIDST
 DETGTIKLNNENSYVPREAGSOKDENIALYVENOFBPKESKVWRDQHFVKIQVKDSANSVIIVDKN
 GRIVYIVENPGCYVAYSKAATVTKGLVHANFGTKKDFPEDEYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAES
 LNAIGVBIYMDQTKFPIVNAELSEFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGILNIPMOTISRAAAEK
 LFGNMEGDGCPDWDKTFDSTCRMYTSESKNVTKLVSNVLEIKILNIFGVIKGEVAPDHYAVVGAORDA
 WGPGAAGSGVGTALLLKLQMFSDMVEKDGPOPSRSHASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSLHLK
 AETMINLDKAAALGTSNFKYSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNNAASKVEKLTLDNAAP
 FLAYSGIPAVSECECEDTDYPYLGTTMDTFYKELIERIPELNKVARAAAFVAGQGVIKLTHDVELNLDE
 RYNSQIHSEVRLDNOYRADIKEMIGFSLQWLYSARGDFFRATSRLTDEGNARKTDRPVMKKLNDRI
 VMRYEYHFLSPYVSPKESPERHVFVWGSCHTLPALEENLKLRKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQ
 GAANALSGDVWDIDNEF

Antigen CD44 (CD44) (isoform 1)

QIDLNITCRFAGVFHVEKNGRYSISRTEAADLCKAFNSTLPTMAQMBKALSIGFETCRYGFIEGHVVIPRI
 HPNSICAAANTGVYILTSNTSQYDTYCFNASAPPEEDCTSVTDLPNAFDGPITITIVNRDGTIVYQKGEY
 RTNPEDIYPSNPTDDDVSSGSSSSRSSTSGGYIFYTFSTVHPIDEDSPWITDSTDRIPATTLMTSATATE
 TATKRQETWDFSWFLPSESKNHLHTTTQMAGTSSNTISAGWEPNEENEDERHLFSGSGSIDDBE
 DEISSITSTTPRAFDTKQNDWTQWNPSSHNSPEVLLQTTTRMTDVRNGTTAYEGNWNPEAHPLIH
 HEHHEEETPHSTSTIQA TPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPKEDSHSTTGTAASAHSTHPM
 QGRITTPSEDSSWTDFFNPISHPMGRGHQAGRRMDMSSHSITLQPTANPNTGLVEDLDRGTPLSMTT
 QQSNSQSFSHSEGLEEDKDHPTTSTLTSSNRNDVTGGRRDPNHSEGSTTLLEGYTSHPHTKESRTFIP
 VTSAKTSGFVTAATVGDNSNVNRSLSGDQDTEHPSGGSHTTHGSESDGSHSGQGGANNTSGPRT
 POIPEWLIILASLLALALILAVCIAVNSRRRCGQKKKLVINSGNGAVEDRKPSGLNGEASKSQEMVHLVN
 KESSETPDQFMATAETRNLQNVDMKIGV

Aktivirana levkocitna molekula za celično adhezijo (ALCAM) (isoform 1)

MESKGASSCRLLFCLLISATVFRPGLGWYTVNSAYGDTIIPCRLDYPONIMFGKWKYFEKPDGSPVFI
 AERSSTKKSVOYDDVPFYKDRNLNSENYSISNARISDEKREVCMLYTEDNVFEAPTIVKVFQPS
 KPEIVSKALFLETEQLKKLGDCISEDSPDGNITWYRNGKVLHPLEGAVVIFKKEMDPVTQLYTMT
 STLEYKTTKADIQMPETCSVTYYGSPGQKTIHSEQAVFDIYPTTEQVTIQVLPKNAIKEGDNITLKC
 LGNGNPPPEBFLFYLPQOPEGIRSSNTYTHFDVRRNATGDYKCSLIDKKSMASTAITVHYLDLSLNP
 GBVTRQIGDALPVSCTISASRNATVVMKDNIRLRSSPSFSSLHYQDAGNYVCETALQEVEGLKKRES
 LTLIVEGKPKQIKMTKKTDPSSGLSKTICHVEGFPKPAIQWTITGSGSVINQTEESPYINGRYYSKIIISPEE
 NVTLTCTAENQLERTVNSLNVSAISPEHDEADEISDENREKVNDQAKLWGIYVGLLLAALVAGKYVWLY
 MKKSKTASHVKNKDLGNMEENKKLEENNKHTEA

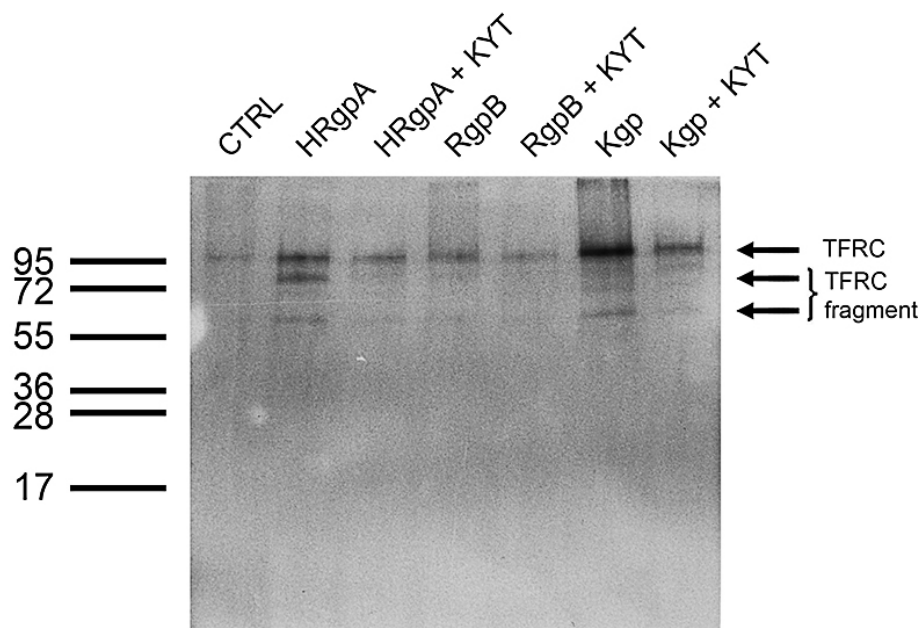
Pleksin B2 (PLXNB2)

LRPRKLDFFRSEKELNHLAVDEASGVVYLGAVALYQLDAKLQEEQVATGPALDNKKCTPPIEASQC
 HEAEMTDNVNQLLLLDPPRKRLVECGSLFKGICALRALSISLRLEYEDGSGEKSFVASNDEGVATVGL
 VSSTGPGGDRVLFVVGKNGPHDNGIIVSTRLLDRTDSRAEEAYTDHATYKAGYLSNTTQOEVAEED
 GPYVFEVFNQODKHPARNRTLLARMCREDPNYSYLEMDLQCRDPDIHAAAFGTCLAASVAAPGSGR
 VLYAVESRDSRSSGGPGAGLCLEPLDKVHAKMEANRNACYGTREARDIEYKPFHGDIOCGGHAPGS
 KSEPCGSEHLPLYPLGSRDGLRGTAVALQGGGLNLTAVTVAENNHTVAFGLTSDGRILKYVLTDPDGTSS
 YDSILVEINKRVKRDVLVSGDLGSLYAMTODKVFRLPVOECLSYPTCTOCDSDOPYCGWCVEGRCT
 RKAECPRAEASHWLWSRSKSCVAVTSAQPNMSRRAQGEVOLTVSPLPALSEDELLCLFGESPHP
 ARVEGEAVICNSPSSIPVTPPGQDHVAVTIQLLLRRGNIFLTSYQYFEDCROAMSLEENLPCISCVSNR
 WTCOWDLRYHECREASPNBEDGIVRAHMEDESCQFLGPSPLVPMNHETDVNFQGNLDTYKGSLL
 VGSDDLKEMEPVTMOESGTEAFRTPKLSHDANETLPLHLVYKSYGKNIDSKLHVTLNCSFGRSDCSL
 CRAANPDYRCAWCGGQSRGVYEALENTTSECPPVITRIQPETGPLGGGIRITILGSLGVQAGDIQRIS
 VAGRNCFSQPERYSVSTRIVCVIEAAETPFTGGVEVDVFGKLGRSPPNVQFTFOQPKPLSVBPQQGPQA
 GGTTLTIHGTHLDTGSQEDVRVTLNGVPCKVTKFGAQLQCVTGPQATRGQMLLEVSYGGSPVPNPGIF
 FTYRENPLRAFEPLRSFASGGRSINVTGQGFSLIQRFAMVVAEPLOSQWQPPREAESLQPMTVVGTDY
 VFHNDTKVVFLSPAVPEEPEAYNLTVLIEMDGHRALLRTEAGAFEYVPDPTFENFTGGVKKQVKNLIH
 ARGTNLNKAMTLQEAFAFVGAERCTMKTLTETDLYCEPPEVQPPPKRRQKRDTHNLPEFIVKFGSRE
 WVLGRVEYDTRVSDVPLSLILPLVIVPMVYVYVYCYWRKSQAEREYEKIKSQLEGLEESVRDRCKK
 BFTDLMIEMEDQNDVHEAGIPVLDYKTYTDRVFFLPSKDGDKDVMITGKLDIPEPRPVVBQALYQFS
 NLLNSKSLINFIHTLENQREFSARAKVYFASLLTVALHGKLEYTDMHTLFLELLEQYVVAKNPKLM
 LRRSETVVERMLSNWMSICLYQYLKDSAGEPLYKLFKAIKHQVEKGPVDAVQKKAKYTLNDTGLLGD
 DVEYAPLTVSVIVQDEGVDAIPVKVLNCDTISQVKEIIDQVYR

Slika 47: Aminokislinske sekvence izbranih proteinov. Legenda: Rdeče so citosolne regije sekvence, rdeče, poševne in podčrtane z vijugasto črto so transmembranske regije, zunajcelični deli sekvence pa so v črni barvi. Podčrtani so peptidi, ki so nastali s tretiranjem TIGK celic z RgpB, pobarvani s sivo so peptidi, ki jih je cepil HRgpA, odebeljeni pa so peptidi, cepljeni s Kgp.

4.2.6 Potrditev gingipainskih cepitev proteina TFRC

Za nadaljnjo validacijo gingipainskih cepitev smo izbrali protein TFRC, saj smo ga identificirali kot potencialno tarčo vseh treh gingipainov, poleg tega pa smo pri tem proteinu opazili šeding – cepitev blizu membrane. S prenosom po Westernu in imunološko detekcijo smo v vzorcih preverili prisotnost celega TFRC in njegovih fragmentov. Testirali smo šedom in lizat celic TIGK po 45-minutnem tretiranju s 4 nM gingipaini ter gingipaini, inhibiranimi z inhibitorji KYT. Za imuno-detekcijo smo uporabili anti-TFRC protitelesa, ki se vežejo na TFRC v velikosti 95 kDa [215].



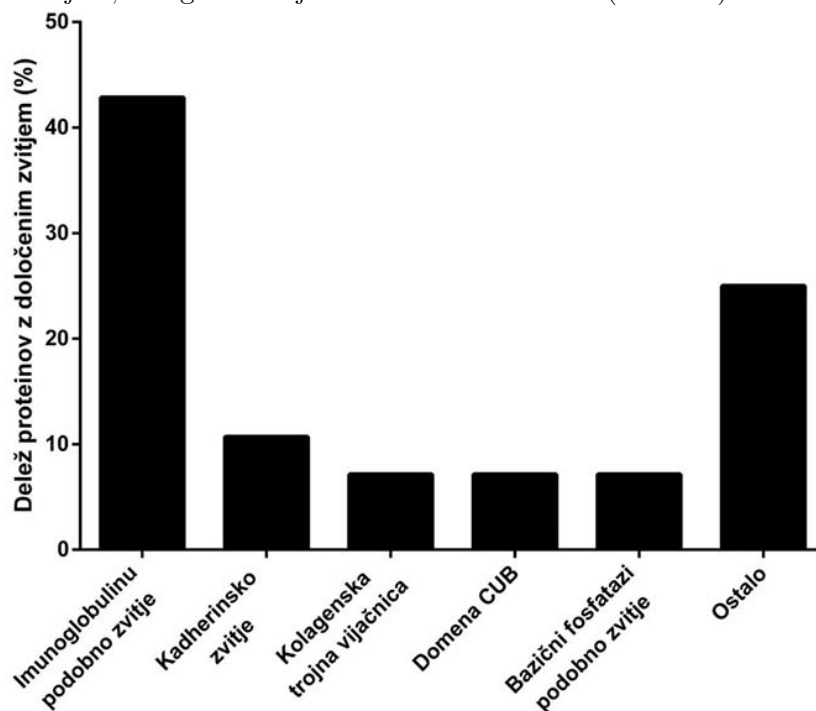
Slika 48: Imunološka detekcija na Western blotu za Transferin receptor protein-1 v šedomu celic TIGK. CTRL predstavlja TNC pufer. Čas ekspozicije je bil 5 minut. Blot je pripravila dr. Alicia Wong.

Na sliki zgoraj (Slika 48) se jasno vidi prisotnost fragmentov TRFC v šedomu celic, tretiranih s 4 nM Kgp, kar potrjuje rezultate masne spektrometrije. V primeru šedomov celic, ki so bile tretirane s HRgpA in RgpB opazimo očitno razliko med učinkovitostjo cepitve oz. šedinga med tema dvema proteazama. Pri RgpB opazimo le majhno povečanje intenzitete proteinskega pasu na imunoblotu v primerjavi s kontrolo, kar nakazuje na takojšnjo razgradnjo odcepljenega fragmenta. V primeru HRgpA pa je videti opazno povečanje intenzitete, prav tako pa lahko vidimo tudi posledice šedinga: poleg celotnega proteina vidimo še dva fragmenta. Večji fragment z velikostjo 75 kDa odgovarja celotnemu proteinu, kateremu je bilo odcepljenih približno 140 aminokislinskih ostankov, kar je pravzaprav celoten zunajcelični del. Manjši fragment z velikostjo 55 kDa pa je verjetno produkt nadaljnje razgradnje prej odcepljenega fragmenta. Slednjega lahko opazimo v vseh šedomih, ne glede na to, kateri gingipain smo uporabili za tretiranje. To spet potrjuje naše rezultate z masne spektroskopije, kjer smo fragment TFRC opazili pri vseh vzorcih.

Kakorkoli, zavedati se je treba, da imunološka detekcija po prenosu po Westernu ni absolutna metoda. Koncentracije proteinov v vzorcih, ki smo jih nanašali na gel so bile včasih zelo majhne, zato je možno, da določenih fragmentov na imunoblotu nismo uspeli detektirati.

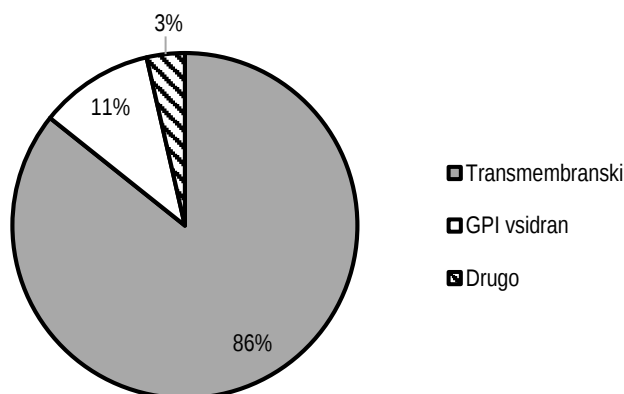
4.2.7 Strukturne in funkcijske podobnosti identificiranih gingipainskih tarč

Tarče vseh treh gingipainov smo sistematično primerjali med seboj s pomočjo spletnega vmesnika InterPro [217] in ugotovili, da so si po strukturi zelo podobne. Namreč, kar 45% odstotkov vseh tarč vsebuje imunoglobulinsko domeno, sledi pa manjši delež proteinov s kadherinskim zvitjem, kolagensko vijačnico in domeno CUB (Slika 49).



Slika 49: Stolpčni diagram deležev posameznih zvitij oz. domen, prisotnih v vseh gingipainskih tarčah, ki smo jih uspeli identificirati z masno spektrometrijo.

Glede na način pritrdjevanja identificiranih proteinov na membrano v veliki meri prevladujejo le klasični transmembranski proteini (86%), majhen delež GPI-usidranih proteinov ter nekaj proteinov z drugačno vezavo na membrano (Slika 50). Iz tega sklepamo, da kljub različni gingipainski specifičnosti za cepitev peptidne vezi vsi trije gingipaini cepijo strukturno podobne proteine.



Slika 50: Graf deleža proteinov z določeno vezavo na membrano.

Primerjali smo tudi funkcijske podobnosti vseh identificiranih tarč. V ta namen smo uporabili vmesnik g:Profiler [218, 219]. g:Profiler je pokazal, da večina proteinov sodeluje pri adheziji celic na matriks (ECM) oz. sosednje celice. Temu pa sledijo celična migracija in gibljivost, odziv celic na dražljaje in signalizacija preko receptorja na površini celice (Tabela 30). S to analizo smo potrdili prej opaženo lastnost gingipainov, da v prvi vrsti ciljajo adhezijske proteine na površini tarčnih celic in povzročajo odlepljanje celic oz. disociacijo posamezne celice iz tkiva.

Tabela 30: **GO anotacije vseh identificiranih proteinov.** Vsi identificirani proteini so bili primerjani z bazo podatkov in dodeljene so jim bili različni biološki procesi - BP, pri katerih sodelujejo.

Ime pogoja	ID pogoja	Vrsta pogoja	Delež genov	p - vrednost
Celična adhezija	GO 0007155	BP	62,2%	$9,84 \times 10^{-15}$
Signalizacija preko receptorja na površini celice	GO 0007166	BP	43,2%	$9,26 \times 10^{-6}$
Celična gibljivost	GO 0040011	BP	40,5%	$6,17 \times 10^{-6}$
Odziv na dražljaje	GO 0050896	BP	91,9%	$4,89 \times 10^{-6}$
Celična migracija	GO 0016477	BP	43,2%	$2,32 \times 10^{-6}$

Poglavje 5

Razprava

Proteaze in njihovi inhibitorji imajo bistveno vlogo v osnovnih bioloških procesih tako v gostiteljskem organizmu, kot tudi pri patogenih bakterijah in v tumorskem mikrookolju. Načinov, kako proteaze sodelujejo pri imunskem odzivu, je veliko, a mi smo se usmerili le v enega: šeding. Kot tak je šeding eden izmed glavnih načinov posttranslacijskih modifikacij in v mnogih primerih ključen za pravilen razvoj celic. V primeru ne reguliranega oz. prekomernega šedinga, pa lahko pride do patoloških stanj. Dva taka primera smo raziskovali v sklopu tega doktorata. V prvem delu smo se ukvarjali s šedingom cisteinskih katepsinov na površini rakavih celic, ki so posledično manj dovzetne za prepoznavo in napad komplementnega sistema. V drugem delu pa smo se poglobili v razvoj paradontalne bolezni, kjer bakterijske cisteinske proteaze – gingipaini – s šedingom oz. razgradnjo povzročajo uničenje mehkega dlesničnega tkiva.

5.1 Cisteinski katepsini vplivajo na aktivacijo komplementa

Že dolgo je znano, da cisteinski katepsini lahko cepijo komponente komplementnega sistema v serumu in na ta način preprečujejo aktivacijo komplementa na tumorskih celicah oz. povečujejo njihovo tumorigenost [97, 117, 123, 124, 126]. Zelo malo pa je znanega o delovanju katepsinov direktno na površini tumorskih celic, o šedingu in povezavi le-tega z aktivacijo komplementa.

Vemo, da šeding predstavlja eno pomembnejših oblik posttranslacijskih modifikacij, ki pripomorejo k širjenju rakastih celic po telesu [41]. Kot šedaze lahko delujejo različne proteaze, ki se stalno izločajo iz tumorskih celic v mikrookolje v vseh stopnjah razvoja tumorja [81, 91, 220]. Primeri teh proteaz so MMP-3 [221], katepsin B in katepsin L [39, 68, 113]. Za katepsin L so pokazali, da kot šedaza deluje na površino tumorskih celic in z njih odcepi številne adhezijske in signalno-regulatorne molekule, vključno s CD55 (inhibitor komplementa). To je bila osnovna ideja za predpostavko, da lahko katepsin L kot šedaza vpliva tudi na aktivacijo komplementa na površini rakavih celic.

Na začetku našega dela smo pokazali, da sta za šeding povezan z nižjo aktivacijo komplementa na površini tumorskih celic, odgovorna le cisteinska katepsina L in S (Slika 23), ne pa tudi MMP-3 in katepsin B (znani šedazi) ali tripsin (splošna, ne-specifična proteaza) – gre torej za specifično lastnost nekaterih cisteinskih katepsinov, predvsem endopeptidaz. Pri našem delu smo kot referenčno molekulo za spremljanje ravni aktivacije komplementa uporabili C3 komponento, ki je osrednja molekula vseh treh poti aktivacij komplementnega sistema.

Po tem, ko je bilo potrjeno, da katepsin L deluje na tumorske celice tako, da je aktivacija komplementa po tretiranju z encimom na njihovi površini nižja, smo zato za večino nadaljnjih eksperimentov uporabili katepsin L. Poleg naših ugotovitev je k tej

odločitvi prispevalo tudi znano dejstvo, da tumorske celice izločajo katepsin L v svoje okolje v visokih koncentracijah [80, 105, 107, 111, 211, 222, 223].

Kot je bilo omenjeno v uvodu, lahko katepsin L cepi C3 komponento in tako preprečuje aktivacijo komplementa. Vendar pa je treba poudariti, da pri našem delu ni prišlo do stika katepsina L s serumom. Torej nižja aktivacija komplementa ni posledica direktne proteolize C3, kot je to opisano v delu D. Jean in sodelavcev [124], pač pa je to posledica delovanja katepsina L na površino tumorskih celic.

Koncentracija katepsina L v tumorskem mikrookolju je ocenjena na nekaj deset nM [117, 211], vendar se predvideva, da je le-ta tik ob membrani, kjer šeding dejansko poteka, lahko nekoliko višja. Pokazali smo (Slika 24), da je bila aktivacija komplementa znižana na celotnem testiranem koncentracijskem območju, od 2 μ M pa vse do 0,01 μ M, kar potrjuje fiziološko relevantnost naših poskusov.

V naslednjem koraku je bilo pokazano, da katepsin L vpliva na aktivacijo komplementa na tumorskih celicah različnega izvora. Poleg na grafu (Slika 25) prikazanih celic raka dojke (MDA-MB-231), raka materničnega vratu (HeLa) in raka na debelem črevesju (Caco-2), smo enak vpliv pokazali tudi na celicah glioblastome (raka na možganih). Vpliv katepsina L na zmanjšano aktivacijo komplementa je torej splošna značilnost vseh tumorskih celic.

Glavno vprašanje doktorskega dela v tem delu raziskave je bilo, kako katepsini povzročijo zmanjšano aktivacijo komplementa na površini tumorskih celic in zato je bilo treba najprej razumeti, katera izmed treh poti aktivacije komplementa je najpomembnejša pri tem procesu. Z dodatkom EGTA smo preprečili aktivacijo po klasični in lektinski poti komplementa [13] (Slika 26) in vezava C3b na površino tumorskih celic (torej, aktivacija komplementa) je bila praktično ničelna. To nakazuje na pomembno vlogo klasične in/ali lektinske poti. Alternativna pot komplementa se začne spontano, zato je bil narejen poskus tretiranja MDA-MB-231 celic s postopoma nižjo koncentracijo seruma. Če bi aktivacija komplementa močno padla z nižjo koncentracijo seruma, bi bil to lahko znak za pomemben doprinos alternativne poti. Vendar pa so rezultati pokazali, da postopno zniževanje koncentracije seruma rezultira v postopnem nižanju aktivacije komplementa. To torej ne kaže na vpliv na alternativno pot. Narejen je bil tudi poskus s serumom brez faktorja B, osrednje molekule, ki tvori C3-konvertazo po alternativni poti. Primerjava aktivacije komplementa po tretiranju s serumom brez faktorja B in kontrolo je pokazala le delno zmanjšanje aktivacije, kar kaže na dejstvo, da alternativna pot nima bistvenega vpliva pri aktivaciji komplementa na površini tumorskih celic. Ker je lektinska pot značilna za mikroorganizme, smo sklepali, da v tem sistemu nima bistvene vloge. Torej je klasična pot aktivacije tista, na katero predhodno tretiranje tumorskih celic s katepsinom L najbolj vpliva. To dejstvo smo potrdili tudi z eksperimentom, kjer so bile celice tretirane s serumom brez MBL, prepoznavne molekule lektinske poti in pri tem nismo opazili bistvene spremembe aktivacije komplementa. Nasprotno pa se je po tretiranju celic s serumom z odstranjenim C1q aktivacija komplementa bistveno znižala.

S tem se je odprlo vprašanje, na katero stopnjo aktivacijske kaskade klasične poti komplementa vpliva katepsin L. Merili smo vezavo različnih komponent komplementnega sistema na površino tumorskih celic: C1q, C4, C3 in MAC. Slika 28 pokaže, da je bila najbolj spremenjena vezava kompleksa MAC, vendar pa je le-ta bolj kot del aktivacije že njena posledica, zato smo se raje osredotočili na ostale komponente. Izmed C1q, C4 in C3 je bila vezava na celice po tretiranju s katepsinom L najbolj zmanjšana ravno pri C1q. Iz tega torej sklepamo, da gre pri šedingu s katepsinom L za cepitev antigenov s površine tumorskih celic in posledično komplement oz. C1q ne prepozna tumorske celice kot spremenjene in aktivacija komplementa ne poteče.

Še bolj natančno smo želeli vedeti, kaj točno se dogaja na površini celic in katere so tiste molekule, ki jih katepsin L poreže s površine in na ta način zmanjša vezavo C1q. Po vezavi biotiniliranega C1q na površino celic MDA-MB-231, zamreženju in izolaciji

kompleksov C1q z vezavnimi partnerji smo z masno spektrometrijo določili nekaj potencialnih vezavnih partnerjev (Tabela 8). Najbolj zanimiva je bila molekula CD44, ki je bila že predhodno opažena kot zunajcelični membranski substrat katepsina L [119]. Kasneje smo CD44 kot vezavni partner C1q in kot tarčo šedinga katepsina L potrdili še z dodatnimi poskusi. Poleg tega smo podobno vlogo, kot jo ima CD44 pri aktivaciji komplementa po šedingu s katepsini, pripisali tudi nevrotilinu-1. Namreč, tudi slednji je bil s pomočjo masne spektrometrije opažen kot vezavni partner C1q, poleg tega pa je že znana tarča šedinga katepsina L na površini celic MDA-MB-231 [119].

CD44 je molekula, ki preko vezave na hialuran, najbolj zastopano molekulo ECM, uravnava vezavo celic na zunajcelični matriks in na ta način sodeluje pri celični adheziji ter prenosu signalov v celico. CD44 je izražen na površini večine rakavih celic, kjer ga šedaze pogosto cepijo in na ta način začenjajo celično migracijo tumorskih celic. Poleg tega pa odcepljeni CD44 lahko posreduje pri parakrini signalizaciji tako, da se intracelularni del prenese v jedro in sproži prepisovanje različnih genov, vključno z genom *CD44* [45, 224]. Vendar pa se postavlja vprašanje, zakaj bi šeding CD44 onemogočil vezavo C1q in preprečil aktivacijo komplementa. Naša predpostavka je, da se po odcepitvi zunajcelične domene CD44 v fragmentu izpostavijo kriptična mesta. To so mesta na proteinu, ki se ob pravilnem zvitju skrita v notranjost, po cepitvi pa se izpostavijo in lahko vežejo razne ligande [225]. V našem primeru predpostavljamo, da se v odcepljenem delu CD44 izpostavijo kriptična mesta, na katera se C1q veže z izredno veliko afiniteto in ostane vezan v kompleksu. Kot tak se ne more več vezati na antigene na površini tumorskih celic in posledično tudi aktivacija komplementa ni več možna.

Kljub temu, da smo do sedaj govorili večinoma o katepsinu L, pa to ni edini cisteinski katepsin, ki se nahaja v tumorskem mikrookolju. Znano je namreč, da tudi imunske celice, na primer makrofagi, ki se infiltrirajo v tumorsko mikrookolje, izločajo katepsine, predvsem B in S in da so te celice glavni vir katepsinov v tumorskem mikrookolju [82, 212, 213]. Dokazali so, da imata katepsin L in S podobne substratne preference [75] in tudi cepita podobne substrate s površine tumorskih celic [119]. Katepsin B pa ni učinkovito odcepljal molekul s površine celic in posledično ni zmanjšal aktivacije komplementa na površini tumorskih celic. Da pa bi bili bliže fiziološkim pogojem, celice nismo tretirali s čistim katepsinom S, pač pa smo pripravili sekretom makrofagov, ki je vseboval tako katepsin B, kot tudi katepsin S (Slika 30). Celice tretirane s sekretom makrofagov so prav tako kazale zmanjšano aktivacijo komplementa na svoji površini (Slika 31). Iz tega lahko sklepamo, da je tudi katepsin S vključen v šedazno aktivnost na površini tumorskih celic. (Slika 23). To je hkrati tudi pokazatelj, da je odziv imunskega sistema lahko koristen za tumorske celice, torej je tumor-promotorski. Konkretno v tem primeru makrofagi izločajo katepsin S (in ostale proteaze), ki s šedingom spremeni površino tumorskih celic, da jih komplementni sistem, natančneje molekula C1q, ne prepozna kot tuje celice in aktivacija komplementa se ne začne.

Mnogi katepsini so tarča za diagnosticiranje ali zdravljenje najrazličnejših bolezni [79]. S tem, ko smo odkrili novo vlogo katepsinov pri razvoju in napredovanju raka, pa so se odprle še dodatne možnosti za nove razvoje terapij oz. za poglobljeno razumevanje mehanizmov rakavih obolenj.

5.2 Gingipaini vplivajo na adhezijo dlesničnih epitelijskih celic

Znano je, da so gingipaini proteaze, ki pomembno pripomorejo k patogenosti bakterij *P. gingivalis*. Bistveni so za pritrjevanje bakterij na dlesni in ostale površine v ustni votlini, sodelujejo pri regulaciji imunskega sistema in izkoriščanja le-tega v svojo korist in nenazadnje s svojo proteazno aktivnostjo povzročajo razgradnjo dlesničnega tkiva ter tako pridobivajo hranila za bakterije (zbrano v [142, 143, 152]). V zadnjih 20 letih je bilo objavljenih tudi nekaj raziskav, ki so prikazovale možnost, da so gingipaini šedaze [194, 195] in celo, da so sposobni šedinga regulatorjev komplementnega sistema [193]. Na podlagi teh dejstev smo postavili našo hipotezo, da gingipaini vplivajo na regulatorje komplementa na površini epitelijskih celic in jih na ta način naredijo dovzetne za napad lastnega imunskega sistema, ki je posledično odgovoren za njihovo uničenje.

Da bi preverili omenjeno hipotezo, smo uporabili imortalizirane dlesnične epitelijske celice - keratinocyte (TIGK) in jih okužili z bakterijami *P. gingivalis*, pri čemer smo uporabili dve koncentraciji bakterij. Nižja koncentracija je predstavljala začetek paradontalne bolezni, medtem ko je višja koncentracija predstavljala že napredovano stanje bolezni. Uporabili smo tudi različne seve *P. gingivalis*, ki so izražali različne kombinacije gingipainov: od divjega tipa, preko seva z izbitim genom za Kgp, seva z izbitim genom za oba R-gingipaina ter $\Delta k\Delta rAB$ - sev brez gingipainov in tudi brez adhezijskih domen. S temi poskusi smo ugotovili dve pomembni stvari:

1.) da so gingipaini bistveni pri razgradnji zunajceličnih proteinov na epitelijskih celicah, saj je bila razgradnja proteinov ob inkubaciji celic TIGK s sevom W83 (divji tip) bistveno bolj izrazita, kot npr. v primeru inkubacije celic s sevom $\Delta k\Delta rAB$. Po drugi strani pa je bil sev $\Delta rgpAB$ (ki izraža le Kgp) najmanj učinkovit, kar potrjuje predhodna odkritja o nižji splošni proteolitski aktivnosti Kgp gingipaina v primerjavi z R-gingipainoma [214]. Iz tega lahko sklepamo, da sta R-gingipaina glavna akterja pri cepitvi in razgradnji membranskih proteinov s površine celic TIGK.

2.) da so adhezijske domene gingipainov prvi pogoj za uspešno razgradnjo membranskih proteinov. Namreč, ko smo bakterijam *P. gingivalis* dodali inhibitorje gingipainov (KYT), smo še vseeno opazili delno razgradnjo membranskih proteinov v primeru W83, občutno manj pa je bilo razgradnje v primeru seva $\Delta k\Delta rAB$, ki nima odstranjenih le gingipainov, pač pa tudi njihove adhezijske domene. Iz tega sklepamo, da brez adhezijskih domen bakterije oz. njihove proteaze ne pridejo dovolj blizu epitelijskim celicam in proteoliza ne poteka v takšnem obsegu kot sicer (Slika 33 in Slika 36) [165-167, 169].

Zaključek teh prvih opažanj je, da so sevi bakterij *P. gingivalis* z adhezijskimi domenami in z R-gingipaini bolj agresivni pri cepitvi membranskih proteinov epitelijskih celic.

Dalje nas je zanimalo, ali so za opaženo razgradnjo proteinov odgovorni izključno gingipaini ali pa morda še druge proteaze, ki jih *P. gingivalis* izločajo v nižjih koncentracijah. Dodatek gingipainskih inhibitorjev k divjemu sevu *P. gingivalis* je pokazal občutno manj razgrajenih proteinov v vzorcu, iz česar smo sklepali, da so gingipaini bistveni za opažene proteazne cepitve, vsekakor pa niso edini. Namreč tudi pri najnižjih koncentracijah bakterij (MOI) smo opazili razgradnjo proteinov, ne glede na to, kateri gingipaini so bili prisotni. Kot smo že omenili, gingipaini predstavljajo 85% vse proteazne aktivnosti bakterij *P. gingivalis*. Ostalih 15% pa predstavljajo druge proteaze, kot na primer PrtT proteaza, Tpr proteaza, Lys-peptidaza, oligopeptidaze in številne druge, ki so lahko odgovorne za opaženo razgradnjo kljub odsotnosti oz. inhibiciji gingipainov [140, 168].

Izsledke dela s *P. gingivalis* smo želeli preveriti še bolj natančno in ugotoviti, katere proteine gingipaini cepijo s površine celic TIGK in kakšno vlogo imajo pri razvoju

paradontalne bolezni. Zato smo celice TIGK tretirali z izoliranimi gingipaini. Tudi tokrat smo uporabili dve koncentraciji gingipainov – obe znotraj fizioloških pogojev. Ugotovljeno je namreč bilo, da je koncentracija gingipainov v močno vnetih dlesnih do $1,5 \mu\text{M}$, sicer pa se giblje okoli nekaj deset nanomolarne koncentracije [173, 196, 226]. Kot zanimivost velja omeniti tudi to, da je tretiranje celic z izoliranimi gingipaini pokazalo, da se sicer močno pritrjene celice TIGK po določenem času tretiranja z gingipaini odlepijo s podlage (Slika 37). Ta pojav je bil opažen tudi pri gojenih dlesničnih fibroblastih [186]. V obeh primerih, tako pri fibroblastih, kot tudi v našem sistemu je bilo pokazano, da celice kljub izgubi stika s podlago preživijo krajše čase inkubacije (vsaj 2h pri fibroblastih ter vsaj 45 minut pri celicah TIGK). Dejstvo, da gingipaini povzročijo odlepljanje celic s podlage so potrdili tudi naši rezultati masne spektrometrije, kjer smo analizirali vzorce supernatantov celic TIGK, tretiranih z izoliranimi gingipaini (Tabela 16, Tabela 21 in Tabela 25). Večina odcepljenih proteinov, ki smo jih z masno spektrometrijo identificirali kot potencialne tarče gingipainov na površini celic, namreč sodeluje pri adheziji celic na ECM oz. na sosednje celice. Druga opaznejša skupina cepljenih proteinov so različne receptorske molekule, med katerimi pa ni nobene, ki bi bila povezana s komplementnim sistemom. Tako smo že na tej točki hipotezo, da gingipaini cepijo regulatorje komplementa, ovrgli in se v nadaljevanju usmerili v raziskovanje in razumevanje delovanja gingipainov na adhezijske proteine.

Masna spektrometrija je v zadnjih letih doživela precejšen razcvet in je izredno uporabna metoda za analizo velikega števila proteinov. Na področju paradontalne bolezni so nam proteomske študije omogočile tako kvalitativno kot tudi kvantitativno analizo proteinov v različnih bioloških vzorcih (od *in vitro* analiz, preko 3D modelov dlesničnega tkiva, *in vivo* testiranj, pa do analiz humanih vzorcev iz ustne votline) [227, 228]. Kljub velikemu številu različnih proteomskih raziskav, pa je naša prva, ki je pod drobnogled vzela celoten sekretom oz. šedom dlesničnih keratinocitov. Izvedli smo obširno proteomsko študijo z gingipaini in našli 28 membranskih proteinov, ki so lahko substrati za gingipainsko razgradnjo. Izmed vseh treh gingipainov sta se R-gingipaina izkazala za najbolj učinkoviti proteazi. Z RgpB smo identificirali največ odcepljenih proteinov (Tabela 14). Sledil mu je HRgpA (Tabela 19), kjer smo v vzorcu identificirali večje število proteinov kot z RgpB, vendar pa jih je bilo manj povezanih s proteazno aktivnostjo na zunaj-membranske proteine. RgpB in HRgpA sta cepila številne skupne proteine, kar seveda ni presenetljivo glede na njuno skorajda identično specifičnost [136, 229]. V primeru Kgp smo pri nižji koncentraciji opazili zelo malo cepljenih substratov (Tabela 26). To je seveda razumljivo, saj je znano, da je Kgp proteaza s počasnejšo proteolitsko aktivnostjo v primerjavi z R-gingipainoma, poleg tega pa je tudi specifičnost cepitve proteinov drugačna (Slika 44) [163]. Ko smo povišali koncentracijo Kgp, smo sicer dobili več potencialnih substratov, vendar pa je bil tudi delež razgradnje višji (Slika 46). Slednje pa ne velja samo za Kgp, pač je bila razgradnja opažena pri vseh treh gingipainih s koncentracijo 75 nM (Slika 39, Slika 41). Poudariti je treba, da se je zelo verjetno s površine celic TIGK odcepilo še več proteinov, ki pa jih zaradi razgradnje, ki je sledila cepitvi, nismo uspeli detektirati z masno spektrometrijo. Z analizo cepljenih proteinov smo opazili tudi, da večina identificiranih proteinov sodeluje pri adheziji celic, sledijo pa še celična migracija in signalizacija preko receptorjev na površini celic. S tem smo potrdili našo domnevo, da gingipaini delujejo na adhezijo celic, ki smo jo prvič opazili, ko smo celice TIGK tretirali z gingipaini in potek spremljali pod mikroskopom (Slika 37). Poleg tega pa lahko gingipaini tudi vplivajo na pomembne signalizacijske poti tako, da razgradijo receptorje na površini celic.

Sedaj se pojavi vprašanje: ali gre res za šeding, torej omejeno proteolizo v bližini membrane epitelijskih celic? Ali pa je vse skupaj del obsežnejše razgradnje zunajceličnih domen membranskih proteinov? Spomnimo se, da je definicija šedinga cepitev ekto-domen, ki imajo v medcelični oz. plazmi novo biološko vlogo [41, 42]. Nasprotno pa je razgradnja manj reguliran način delovanja proteaz, ki ima za posledico izgubo biološke funkcije

substrata. Na gelski elektroforezi smo opazili, da višja koncentracija gingipainov povzroči obsežno razgradnjo proteinov celic TIGK – v primeru najvišje koncentracije je bila razgradnja celo tako obsežna, da na gelu praktično nismo več detektirali proteinov. Pri nižjih koncentracijah, pa smo opazili tudi lise v območju višjih in srednjih molekulskih mas (Slika 33, Slika 36). Iz tega smo zaključili, da pri višjih koncentracijah gingipainov prihaja do razgradnje. Kaj pa nižje koncentracije gingipainov? Če bi v teh primerih šlo za šeding, bi morali po tretiranju celic TIGK z gingipaini, v šedomu detektirati odcepljene domene proteinov, ki smo jih na masnem spektrometru zaznali kot potencialne tarče. To smo uspeli pokazati za protein TFRC. Z gingipainom Kgp, ki ima manjšo proteolitsko aktivnost v primerjavi z R-gingipainoma, smo pokazali, da v šedomu tretiranih celic TIGK ostanejo fragmenti TFRC, ki predstavljajo cepitev v bližini membrane. Torej gre za šeding (Slika 48), vendar pa so ti odcepljeni fragmenti hitro razgrajeni. To se verjetno še toliko bolj izrazi v fizioloških pogojih, kjer je prisotnih veliko različnih proteaz.

Rezultat, ki je pokazal, da večina odcepljenih proteinov sodeluje pri adheziji nam je dal misliti, da mora biti prekinitev medceličnih stikov in povezav celic z ECM eden izmed načinov *P. gingivalis* za uničenje dlesničnega tkiva. Guo in sodelavci [152] so v svojem preglednem članku že leta 2010 prvič opozorili na povezavo gingipainov in programirane celične smrti anoikis, naši rezultati pa so to tezo še dodatno podprli.

Anoikis je oblika apoptoze, torej programirana celična smrt, ki se sproži kot posledica izgube medceličnih stikov pri adhezijskih celicah [230]. Načeloma je pomembna za vzdrževanje normalnega, zdravega stanja v telesu – je del homeostaze in je natančno regulirana. Kadar pa ta regulacija odpove, lahko pride do patološkega stanja. Najpogosteje se anoikis omenja v povezavi z rakavimi obolenji. V teh primerih govorimo o odpornosti metastazirajočih tumorskih celic na anoikis. Preko te rezistence lahko celice, ki se ločijo od tumorja, preživijo pot po telesu, dokler se ne zasidrajo na novem mestu, kjer tvorijo metastaze [231]. V primeru bakterijskih obolenj pa je anoikis opažen kot posledica delovanja bakterij in njihovih sekretornih proteaz na gostiteljske celice [147, 232, 233]. Ni še popolnoma jasno, kako lahko izguba adhezijskih povezav sproži anoikis, obstajajo pa različne možne razlage. Znano je, da se citoskeletne strukture pri pritrjenih celicah in pri celicah, ki so izgubile stike, razlikujejo. Potem, ko proteaza odcepi zunajcelični del transmembranskih adhezijskih proteinov, se lahko spremeni tudi konformacija njenih citoplazemskih delov. Ta sprememba v nadaljevanju preko signalizacije s kinazami sproži anoikis [234]. Ta razlaga bi lahko ustrezala tudi našemu primeru, saj smo pokazali, da je večina gingipainskih tarč ravno transmembranskih proteinov (Slika 50). V času vezave celic na ECM receptorji rastnih faktorjev delujejo kot preživetveni signali. Adhezijske celice namreč lahko izkoristijo medsebojni vpliv integrinov, povezanih z ECM in receptorjev rastnih faktorjev za anti-apoptotski oz. preživetveni signal. Kadar pa celice nimajo povezav z ECM, nevezani integrini, npr. integrin $\beta 1$, posredujejo signale za zmanjšano izražanje EGFR, kar se odraža v akumulaciji molekule Bim in posledično aktivaciji programirane celične smrti [235, 236]. Tudi mi smo pokazali, da so gingipaini sposobni odcepitve EGFR s površine celic TIGK. Iz tega sklepamo, da tudi sama odcepitev aktivne zunajcelične domene EGFR deluje kot pro-apoptotski signal, ki vodi v začetek anoikisa. Po drugi strani pa vemo tudi, da so gingipaini sposobni cepitve mnogih adhezijskih molekul ter sestavnih delov ECM [201]. Izmed struktur ECM so kolagen I, fibronektin, laminin ter tenascin tesno povezani z regulacijo anoikisa in pokazali so, da lahko gingipaini cepijo in razgradijo tudi te proteine [138, 237-239]. Med našimi identificiranimi potencialnimi tarčami gingipainske proteolizne aktivnosti na površini dlesničnih epitelijskih celic, je molekula CD44 najtesneje povezana z anoikisom. CD44 je receptor za hialuronsko kislino, komponento ECM, in je bistven pri celični signalizaciji in pri signalizaciji med celicami in ECM. Kot tak ima zelo pomembno vlogo pri preprečevanju oz. sprožitvi anoikisa. Pokazano je bilo, da utišanje gena za CD44 naredi celice bolj dovzetne za anoikis, saj je onemogočena vezava CD44 s

hialuronsko kislino oz. z ECM, to pa preko še ne poznanih mehanizmov sproži anoikis [231, 240]. V našem primeru smo opazili razgradnjo CD44, kar pa tako kot utišanje gena onemogoči vezavo na hialuronsko kislino. Sklepamo torej, da je to eden izmed možnih načinov, kako gingipaini sprožijo anoikis dlesničnih epitelijskih celic TIGK.

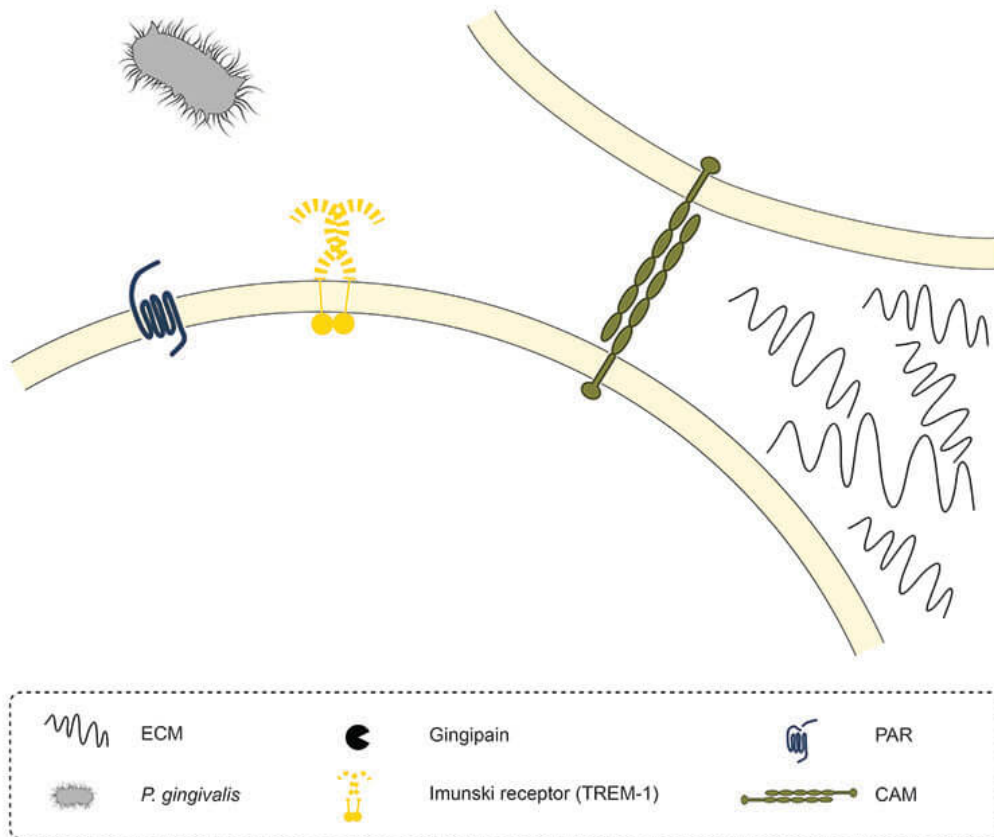
Čeprav je literature in dokazov za povezavo bakterijskega šedinga oz. razgradnje zunajceličnih proteinov in anoikisa malo, pa raziskave kažejo, da bi to lahko bil dejanski mehanizem tudi pri bakterijski okužbi. Anoikis so namreč opazili pri bakterijski okužbi pljučnih epitelijskih celicah z Gram negativnimi bakterijami *Stenotrophomonas maltophilia*. Serinske proteaze teh bakterij povzročijo odlepljanje epitelijske celične linije v enakem koncentracijskem območju in pri enaki dolžini inkubacije, kot smo jo uporabili mi. Še več, opazili so, da lahko te proteaze razgradijo fibronektin in njegov receptor integrin $\alpha 5 \beta 1$, fibrogen, E-kadherin, okludin in kolagen I – pomembne komponente zunajceličnega matriksa (ECM) in celične adhezije. Z eksperimentom, kjer so merili aktivacijo kaspaz, pa so potrdili, da gre v tem primeru nedvomno za anoikis [233]. Anoikis kot posledico delovanja bakterij so opazili tudi na endotelijskih celicah okuženih z Gram negativnimi bakterijami *Pseudomonas aeruginosa*. Eksoproteaze bakterij *Pseudomonas aeruginosa*, tako kot gingipaini v primeru *P. gingivalis*, cepijo številne adhezijske molekule, kot na primer fibronektin, VE-kadherin, okludin in uPAR ter s tem povzročijo osamitev celic in posledično anoikis. Pri tej raziskavi so poudarili pomen cepitve VE-kadherina in okludina, dveh komponent endotelijske membrane, ki sta bistveni za preživetje endotelijskih celic, za razvoj anoikisa [232]. Vemo tudi, da lahko *P. gingivalis* vstopijo v krvni obtok in tam pridejo v stik z endotelijskimi celicami. In tudi za gingipaine so pokazali, da lahko cepijo in razgradijo okludin in VE-kadherin [241, 242].

Podobnost teh dveh raziskav z našo, z enakim tipom celic, s skupnimi tarčami bakterijskih proteaz in enakim razpletom njihovega delovanja, je le še ena potrditev, da gredo naša dognanja v pravilno smer. Potrebno pa bo še nekaj dodatnih poskusov, da bomo anoikis dlesničnih epitelijskih celic kot posledico delovanja gingipainov lahko zares potrdili.

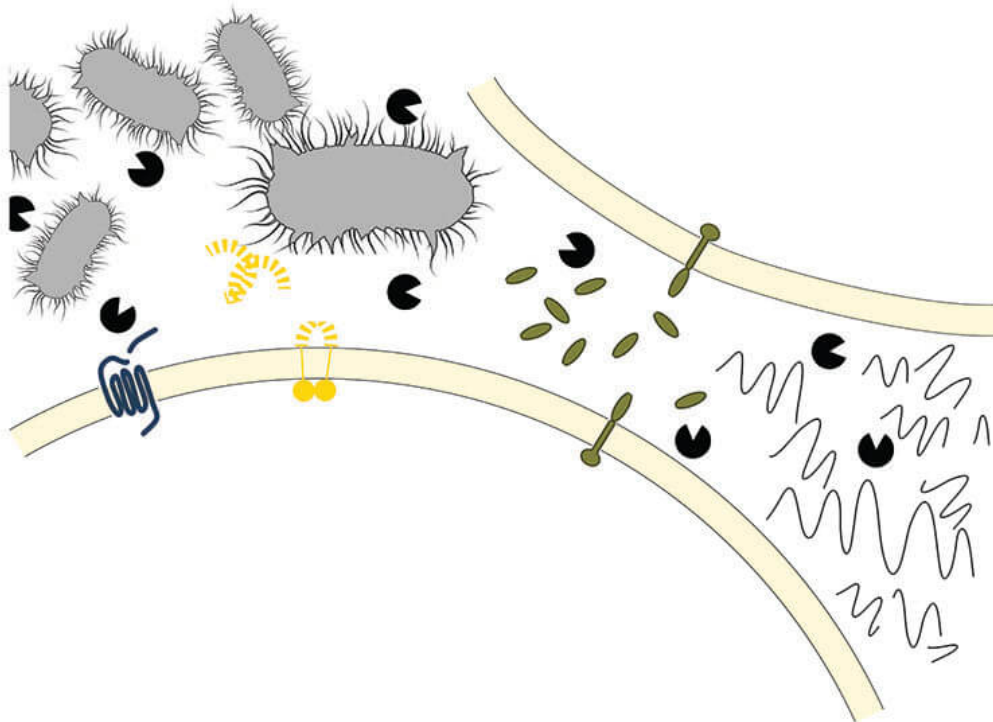
Za zaključek smo pripravili shematski povzetek delovanja gingipainov (oz. bakterij *P. gingivalis*) na površino epitelijskih celic (Slika 51). Na podlagi vseh zbranih rezultatov predlagamo naslednji mehanizem kot možno delovanje gingipainov na membranske proteine epitelijskih celic. V prvem koraku gingipaini in verjetno še katere druge bakterijske proteaze odcepijo številne membransko vezane proteine s površine celic in v okolico sprostijo ektodomene, ki pa se potem dokončno razgradijo [201]. O šedingu vemo tudi to, da se po cepitvi lahko izpostavijo nova cepitvena mesta in se tako omogočijo številne nove cepitve ektodomene. Podobne rezultate in domneve so objavljene v številnih drugih študijah, kjer so sprva opazili šeding, ko pa so koncentracijo gingipainov ali bakterij *P. gingivalis* povečali oz. ko so podaljšali čas inkubacije, pa so zaznali le še razgradnjo pred identificiranih proteinov [176, 196, 198-200, 214, 243].

Razlika v obsežnosti razgradnje proteinov pri nižji in višji koncentraciji gingipainov odraža razliko med začetnim stanjem paradontalne bolezni in naprednim. Na začetku gre predvsem za preživetje bakterij v ustni votlini oz. v obzobnih žepkih ter vzdrževanje vnetja. Bakterije se morajo pritrditi na tkivo in nekako preživeti v tem mikrookolju. Zato pa potrebujejo hranilne snovi (ki jih dobijo z gingipainsko razgradnjo gostiteljskih proteinov). Poleg tega pa morajo vzpostaviti ravnotežno stanje z imunskim odzivom. Kasneje, ko se bolezen razvije dalje, se delovanje bakterij (in z njimi gingipainov) spremeni iz preživetvenega v invazivno. Bakterijsko delovanje postane destruktivno, saj si podredijo imunski sistem, da jih ne odstrani, hkrati pa jim vnetje oz. vnetni produkti prinašajo hranila za preživetje in nadaljnjo rast. To se odraža kot hudo vnetje v ustni votlini, ki povzroča razgradnjo dlesni in čeljustne kosti [152, 158, 172, 173, 184, 244-246].

A - ZDRAVO STANJE



B - PARADONTALNA BOLEZEN



Slika 51: Grafični povzetek delovanja gingipainov na površino gostiteljskih celicah. A predstavlja normalno stanje, kjer so celice med seboj povezane preko adhezijskih molekul, CAM (*cell adhesion molecule*) in ECM, signalizacija je skrbno nadzorovana. Imunski receptorji lahko prepoznajo bakterije *P. gingivalis* in jih preko aktivacije imunskega odziva lahko odstranijo iz okolja. Slika B pa predstavlja že napredno stanje paradontalne bolezni, kjer so gingipaini razlog za številne spremembe in napačno regulacijo. Gingipaini omogočijo, da se *P. gingivalis* izogibajo imunskemu sistemu, tako, da naprej postrizejo (šeding) in nato razgradijo številne receptorje in komponente komplementnega sistema, z razgradnjo adhezijskih molekul in ECM prekinejo kontakte med celicami in povzročijo deregulacijo signalnih pot. Vse to vodi v slabši imunski odziv in poškodbo tkiva.

Zakaj sploh raziskujemo mehanizme delovanja patogenov? Če želimo iskati zdravilo za določeno bolezen, je najprej treba natančno poznati njen razvoj in mehanizme čim večih virulentnih faktorjev oz. načinov, kako patogen deluje na naše celice. Šele ko imamo vse to znanje in dobro predstavo o poteku bolezni, lahko začnemo iskati najšibkejši člen, na katerega bi lahko ciljali z zdravilom in zaradi katerega bi se razvoj bolezni ustavil oz. bi lahko stanje vrnil nazaj v normalno.

Eden izmed pomembnih stopenj razvoja tako paradontalne bolezni kot tudi raka je zunajcelična razgradnja. V povezavi z rakavimi obolenji se o tem govori že dlje časa, a šele v zadnjih letih je prišlo do zanimivih in potencialno uporabnih odkritij. Sedaj vemo, da katapsini, ki izvirajo iz tumorskih in tudi iz imunskih celic, spreminjajo površino rakavih celic in jo lahko naredijo neprepoznavno za imunski sistem. Še več, v zadnjih letih so se začele tudi raziskave delovanja katapsinov na ECM [111]. Torej, se ne omejujemo več striktno na površino celice, pač pa tudi na njeno okolico, ki pomembno vpliva na delovanje celice.

V zvezi s paradontalno boleznijo je znanega še veliko manj, saj se to področje šele dobro razvija. Naša raziskava predstavlja majhen doprinos k razumevanju delovanja gingipainov, z njo pa smo odprli tudi številna nova vprašanja. Zanimivo bi bilo preveriti vpliv gingipainov na fibroblaste, saj vemo, da so bakterije *P. gingivalis* sposobne prodiranja globlje v dlesnično tkivo [247]. Preveriti in potrditi bi bilo treba, ali gingipaini sprožajo anoikis, kot smo predpostavljali, ali pa morda sprožijo katero drugo obliko celične smrti. Dalje nas zanima, kako gingipaini delujejo na površino bakterijskih celic, jih morda tako kot katapsini tumorske celice spremenijo in naredijo neprepoznavne za imunski sistem? Še več, znano je, da *P. gingivalis* tvorijo biofilm [248]. Torej, kakšna je vloga gingipainov v biofilmu?

Zaenkrat pravega zdravila za paradontalno bolezen nimamo in najbolj učinkovito zdravljenje predstavlja mehanska odstranitev oblog na zobeh. To pa je boleče in ne zagotavlja, da se vnetje ne bo ponovilo. Zato je raziskovanje mehanizmov razvoja bolezni, vključno z razumevanje delovanja proteaz pomemben korak k razvoju zdravila.

Poglavje 6

Zaključek

V sklopu tega doktorskega dela smo preučevali delovanje cisteinskih proteaz na površino celic. V prvem delu smo študirali delovanje cisteinskih katepsinov na tumorske celice in se spraševali, ali so lahko katepsini odgovorni za izogibanje tumorskih celic pred eliminacijo z imunskim sistemom. Ugotovili smo, da lahko katepsin L in deloma tudi katepsin S, ki ju izločajo tako tumorske celice kot tudi celice tumorskega mikrookolja, s površine celic odcepita številne adhezijske in regulatorne proteine, med drugim tudi CD44. Znano je, da je ta molekula marker rakastih matičnih celic ter ima pomembno vlogo pri adheziji celic na ECM. Njena cepitev torej pripomore k migraciji tumorskih celic in metastaziranju. Poleg tega pa smo ugotovili, da se je po šedingu s površine tumorskih celic aktivacija komplementa močno znižala. Razlog za to bi lahko bila kriptična mesta, ki se izpostavijo šele po odcepitvi CD44 in drugih substratov s površine celic. Na ta mesta se veže C1q z močno afiniteto, da ostane vezan v kompleksu in potem ne opravlja več funkcije kot prepoznavna oz. začetna molekula aktivacije komplementa.

V drugem delu tega doktorskega dela smo se ukvarjali s cisteinskimi proteazami patogenih bakterij *Porphyromonas gingivalis*. Ugotovili smo, da gingipaini s površine epitelijskih celic odcepijo in nato razgradijo številne membranske proteine in tako vplivajo na adhezivnost epitelijskih celic. Gingipainovih tarč, povezanih s komplementom nismo detektirali, kar pa ne pomeni, da regulatorji komplementa niso substrati gingipainov. Možno je, da jih bakterijske proteaze takoj po odcepitvi z membrane razgradijo in jih zato mi ne detektiramo – niti z masno spektrometrijo, niti s prenosom po Westernu in imunodetekcijo, ki sta sicer zelo občutljivi metodi. Ali gre za šeding ali za splošno razgradnjo je težko odgovoriti, saj procesa potekata hkrati. Vsekakor smo pokazali, da šeding poteka, vendar pa je to verjetno le prvi korak v obsežnejši proteolizi. Glavna naloga gingipainov je bakterijam *P. gingivalis* omogočiti preživetje v gostitelju, šeding oz. razgradnja zunajceličnih proteinov sta samo dva izmed možnih načinov, kako to dosežejo. Opazili smo tudi, da je obsežnost šedinga oz. razgradnje odvisna od prisotnosti adhezijskih domen in od koncentracije gingipainov, kar je povezano z napredovanjem bolezni. V začetni fazi paradontalne bolezni oz. še v času gingivitisa, je gingipainov in bakterij *P. gingivalis* v ustni votlini malo, zato je tudi cepitev zunajceličnih substratov malo in šeding kot tak lahko poteka. Ko pa se bolezen razvije dalje in je koncentracija gingipainov višja, pa prevlada razgradnja nad šedingom. Na ta način gingipaini onesposobijo oz. si podjarmijo imunski sistem gostitelja, spremenijo regulatorne in signalizacijske poti ter posledično sprožijo programirano celično smrt gostiteljskih epitelijskih celic, imenovano anoikis. Vse to se navzven odraža kot razgradnja dlesničnega tkiva in čeljustne kosti. Izmed identificiranih substratov za gingipaine jih je večina povezana s celično adhezijo, kar nakazuje, da so gingipaini lahko vpleteni v sprožitev anoikisa – celične smrti zaradi pomanjkanja medceličnih kontaktov in kontaktov celic z ECM.

Literatura

- [1] P. J. Delves, S. J. Martin, D. R. Burton, and I. M. Roitt, "Roitt's Essential Immunology," 12 ed Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2011.
- [2] M. Vozelj, V. Kotnik, and J. Lunder, *Temelji imunologije*. Ljubljana: DZS, 2000.
- [3] B. Ghesquiere, B. W. Wong, A. Kuchnio, and P. Carmeliet, "Metabolism of stromal and immune cells in health and disease," *Nature*, vol. 511, pp. 167-76, Jul 10 2014.
- [4] J. Bourdet, "Sur le mode d'action des sérums préventifs," *Ann Inst Pasteur*, vol. 10, pp. 193-219, 1896.
- [5] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2012.
- [6] G. J. Arlaud and M. G. Colomb, "Complement: Classical Pathway," in *Encyclopedia of Life Sciences*, ed Chichester: Nature Pub. Group, 2011.
- [7] N. R. Cooper, "The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component," *Adv Immunol*, vol. 37, pp. 151-216, 1985.
- [8] C. Ehrnsthaller, A. Ignatius, F. Gebhard, and M. Huber-Lang, "New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system," *Mol Med*, vol. 17, pp. 317-29, Mar-Apr 2010.
- [9] I. H. Lepow , G. B. Naff , E. W. Todd , J. Pensky , and C. F. Hinz , Jr., "Chromatographic Resolution of the First Component of Human Complement into Three Activities," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 117, pp. 983-1008, 1963.
- [10] K. B. Reid and R. R. Porter, "Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement," *Biochem J*, vol. 155, pp. 19-23, Apr 01 1976.
- [11] J. A. Schifferli, P. Woo, and D. K. Peters, "Complement-mediated inhibition of immune precipitation. I. Role of the classical and alternative pathways," *Clin Exp Immunol*, vol. 47, pp. 555-62, Mar 1982.
- [12] R. Wallis, D. A. Mitchell, R. Schmid, W. J. Schwaeble, and A. H. Keeble, "Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation," *Immunobiology*, vol. 215, pp. 1-11, 2009.
- [13] R. M. Des Prez, C. S. Bryan, J. Hawiger, and D. G. Colley, "Function of the classical and alternate pathways of human complement in serum treated with ethylene glycol tetraacetic acid and MgCl₂-ethylene glycol tetraacetic acid," *Infect Immun*, vol. 11, pp. 1235-43, Jun 1975.
- [14] H. J. Muller-Eberhard, "Molecular organization and function of the complement system," *Annu Rev Biochem*, vol. 57, pp. 321-47, 1988.

- [15] A. Sahu and J. D. Lambris, "Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity," *Immunological Reviews*, vol. 180, pp. 35-48, 2001.
- [16] L. Cui, D. F. Carney, and T. E. Hugli, "Primary structure and functional characterization of rat C5a: an anaphylatoxin with unusually high potency," *Protein Sci*, vol. 3, pp. 1169-77, Aug 1994.
- [17] J. Tschopp, H. J. Muller-Eberhard, and E. R. Podack, "Formation of transmembrane tubules by spontaneous polymerization of the hydrophilic complement protein C9," *Nature*, vol. 298, pp. 534-8, Aug 05 1982.
- [18] V. W. Hu, A. F. Esser, E. R. Podack, and B. J. Wisnieski, "The membrane attack mechanism of complement: photolabeling reveals insertion of terminal proteins into target membrane," *J Immunol*, vol. 127, pp. 380-6, Jul 1981.
- [19] M. Matsushita and T. Fujita, "Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease," *J Exp Med*, vol. 176, pp. 1497-502, Dec 01 1992.
- [20] S. Thiel, T. Vorup-Jensen, C. M. Stover, W. Schwaeble, S. B. Laursen, K. Poulsen, *et al.*, "A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement," *Nature*, vol. 386, pp. 506-10, Apr 03 1997.
- [21] C. B. Chen and R. Wallis, "Stoichiometry of complexes between mannose-binding protein and its associated serine proteases. Defining functional units for complement activation," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 25894-902, Jul 13 2001.
- [22] D. Iwaki, K. Kanno, M. Takahashi, Y. Endo, N. J. Lynch, W. J. Schwaeble, *et al.*, "Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway," *J Immunol*, vol. 177, pp. 8626-32, Dec 15 2006.
- [23] V. Rossi, F. Teillet, N. M. Thielens, I. Bally, and G. J. Arlaud, "Functional characterization of complement proteases C1s/mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) chimeras reveals the higher C4 recognition efficacy of the MASP-2 complement control protein modules," *J Biol Chem*, vol. 280, pp. 41811-8, Dec 23 2005.
- [24] P. Gal, J. Dobo, P. Zavodszky, and R. B. Sim, "Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions," *Mol Immunol*, vol. 46, pp. 2745-52, Sep 2009.
- [25] L. Pillemer, L. Blum, I. H. Lepow, O. A. Ross, E. W. Todd, and A. C. Wardlaw, "The properdin system and immunity__ Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena," *Science*, vol. 120, pp. 279-85, Aug 20 1954.
- [26] D. Ricklin, G. Hajishengallis, K. Yang, and J. D. Lambris, "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis," *Nat Immunol*, vol. 11, pp. 785-97, Sep 2010.
- [27] M. K. Pangburn, R. D. Schreiber, and H. J. Muller-Eberhard, "Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3," *J Exp Med*, vol. 154, pp. 856-67, Sep 01 1981.

- [28] J. M. Thurman and V. M. Holers, "The central role of the alternative complement pathway in human disease," *J Immunol*, vol. 176, pp. 1305-10, Feb 01 2006.
- [29] P. F. Zipfel and C. Skerka, "Complement: The Alternative Pathway," in *Encyclopedia of Life Sciences*, ed Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- [30] D. A. C. Heesterbeek, B. W. Bardoel, I. Bennett, A. Pyne, E. T. M. Berends, M. Ruyken, *et al.*, "The Role of C5 Convertases in Membrane Attack Complex Dependent Killing of Gram-negative bacteria," presented at the 16th European Meeting of Complement in Human Disease, Copenhagen, Denmark, 2017.
- [31] S. Tomlinson, P. W. Taylor, B. P. Morgan, and J. P. Luzio, "Killing of gram-negative bacteria by complement. Fractionation of cell membranes after complement C5b-9 deposition on to the surface of *Salmonella minnesota* Re595," *Biochemical Journal*, vol. 263, pp. 505-511, 1989.
- [32] B. P. Morgan and C. L. Harris, "Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 14, pp. 857-77, Dec 2015.
- [33] S. C. Makrides, "Therapeutic inhibition of the complement system," *Pharmacol Rev*, vol. 50, pp. 59-87, Mar 1998.
- [34] D. M. Kraus, G. S. Elliott, H. Chute, T. Horan, K. H. Pfenninger, S. D. Sanford, *et al.*, "CSMD1 Is a Novel Multiple Domain Complement-Regulatory Protein Highly Expressed in the Central Nervous System and Epithelial Tissues," *The Journal of Immunology*, vol. 176, pp. 4419-4430, 2006.
- [35] C. Gialeli, B. Gungor, and A. M. Blom, "Novel potential inhibitors of complement system and their roles in complement regulation and beyond," *Mol Immunol*, vol. 102, pp. 73-83, Oct 2018.
- [36] B. Turk, D. Turk, and V. Turk, "Protease signalling: the cutting edge," *The EMBO journal*, vol. 31, pp. 1630-43, Apr 4 2012.
- [37] I. Schechter and A. Berger, "On the size of the active site in proteases. I. Papain.," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 47, pp. 157-162, 1967.
- [38] M. Fonovic and B. Turk, "Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1840, pp. 2560-70, Aug 2014.
- [39] M. M. Mohamed and B. F. Sloane, "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer," *Nat Rev Cancer*, vol. 6, pp. 764-75, Oct 2006.
- [40] S. Rose-John and P. C. Heinrich, "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function," *Biochem J*, vol. 300 (Pt 2), pp. 281-90, Jun 01 1994.
- [41] J. Arribas and A. Borroto, "Protein ectodomain shedding," *Chem Rev*, vol. 102, pp. 4627-38, Dec 2002.
- [42] K. Hayashida, A. H. Bartlett, Y. Chen, and P. W. Park, "Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding," *Anat Rec (Hoboken)*, vol. 293, pp. 925-37, Jun 2010.
- [43] S. F. Lichtenthaler, M. K. Lemberg, and R. Fluhrer, "Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals-hardware, concepts, and recent developments," *Embo j*, vol. 37, Aug 1 2018.
- [44] J. Massague and A. Pandiella, "Membrane-anchored growth factors," *Annu Rev Biochem*, vol. 62, pp. 515-41, 1993.

- [45] I. Okamoto, Y. Kawano, D. Murakami, T. Sasayama, N. Araki, T. Miki, *et al.*, "Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway," *J Cell Biol*, vol. 155, pp. 755-62, Nov 26 2001.
- [46] M. E. Fortini, "Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges," *Curr Opin Cell Biol*, vol. 13, pp. 627-34, Oct 2001.
- [47] A. Hafezi-Moghadam and K. Ley, "Relevance of L-selectin shedding for leukocyte rolling in vivo," *J Exp Med*, vol. 189, pp. 939-48, Mar 15 1999.
- [48] M. Ii, H. Yamamoto, Y. Adachi, Y. Maruyama, and Y. Shinomura, "Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis," *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 231, pp. 20-7, Jan 2005.
- [49] S. Mochizuki and Y. Okada, "ADAMs in cancer cell proliferation and progression," *Cancer Sci*, vol. 98, pp. 621-8, May 2007.
- [50] N. M. Hooper, A. J. Trew, E. T. Parkin, and A. J. Turner, "The role of proteolysis in Alzheimer's disease," *Adv Exp Med Biol*, vol. 477, pp. 379-90, 2000.
- [51] K. J. Garton, P. J. Gough, and E. W. Raines, "Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses," *Journal of leukocyte biology*, vol. 79, pp. 1105-16, Jun 2006.
- [52] J. Xu, P. W. Park, F. Kheradmand, and D. B. Corry, "Endogenous attenuation of allergic lung inflammation by syndecan-1," *J Immunol*, vol. 174, pp. 5758-65, May 01 2005.
- [53] S. Gibot, M. N. Kolopp-Sarda, M. C. Bene, P. E. Bollaert, A. Lozniewski, F. Mory, *et al.*, "A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis," *J Exp Med*, vol. 200, pp. 1419-26, Dec 06 2004.
- [54] R. A. Black, C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, *et al.*, "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells," *Nature*, vol. 385, pp. 729-33, Feb 20 1997.
- [55] M. Kaup, K. Dassler, U. Reineke, C. Weise, R. Tauber, and H. Fuchs, "Processing of the human transferrin receptor at distinct positions within the stalk region by neutrophil elastase and cathepsin G," *Biol Chem*, vol. 383, pp. 1011-20, Jun 2002.
- [56] S. Artigiani, D. Barberis, P. Fazzari, P. Longati, P. Angelini, J. W. van de Loo, *et al.*, "Functional regulation of semaphorin receptors by proprotein convertases," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 10094-101, Mar 21 2003.
- [57] L. Hedstrom, "Serine Protease Mechanism and Specificity," *Chemical Reviews*, vol. 102, pp. 4501-4524, Dec 2002 2002.
- [58] S. Patel, "A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator," *Allergologia et immunopathologia*, vol. 45, pp. 579-591, Nov-Dec 2017.
- [59] C. M. Overall and C. P. Blobel, "In search of partners: linking extracellular proteases to substrates," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, p. 245, 02/14/online 2007.
- [60] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, and R. Finn, "Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors," in *Nucleic Acids Research* vol. 44, ed, 2016, pp. Database issue D343-D350.

- [61] L. Polgár, "Chapter 405 - Catalytic Mechanisms of Cysteine Peptidases A2 - Rawlings, Neil D," in *Handbook of Proteolytic Enzymes*, G. Salvesen, Ed., ed: Academic Press, 2013, pp. 1773-1784.
- [62] A. C. Storer and R. Menard, "Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases," *Methods Enzymol*, vol. 244, pp. 486-500, 1994.
- [63] N. C. Price and L. Stevens, *Fundamentals of Enzymology*. Oxford: Oxford Press, 1999.
- [64] B. Turk, D. Turk, and V. Turk, "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1477, pp. 98-111, Mar 7 2000.
- [65] V. Turk, B. Turk, and D. Turk, "Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities," *Embo J*, vol. 20, pp. 4629-33, Sep 3 2001.
- [66] V. Turk, V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk, *et al.*, "Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1824, pp. 68-88, Jan 2012.
- [67] B. Turk, J. G. Bieth, I. Bjork, I. Dolenc, D. Turk, N. Cimerman, *et al.*, "Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins," *Biol Chem Hoppe Seyler*, vol. 376, pp. 225-30, Apr 1995.
- [68] O. C. Olson and J. A. Joyce, "Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response," *Nat Rev Cancer*, vol. 15, pp. 712-29, Dec 2015.
- [69] K. Brix, A. Dunkhorst, K. Mayer, and S. Jordans, "Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions," *Biochimie*, vol. 90, pp. 194-207, Feb 2008.
- [70] R. Coulombe, P. Grochulski, J. Sivaraman, R. Menard, J. S. Mort, and M. Cygler, "Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment," *Embo j*, vol. 15, pp. 5492-503, Oct 15 1996.
- [71] Y. Nishimura, T. Kawabata, K. Furuno, and K. Kato, "Evidence that aspartic proteinase is involved in the proteolytic processing event of procathepsin L in lysosomes," *Arch Biochem Biophys*, vol. 271, pp. 400-6, Jun 1989.
- [72] A. Fujishima, Y. Imai, T. Nomura, Y. Fujisawa, Y. Yamamoto, and T. Sugawara, "The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64," *FEBS Lett*, vol. 407, pp. 47-50, Apr 21 1997.
- [73] O. Vasiljeva, T. Reinheckel, C. Peters, D. Turk, V. Turk, and B. Turk, "Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets," *Curr Pharm Des*, vol. 13, pp. 387-403, 2007.
- [74] D. Turk, G. Guncar, M. Podobnik, and B. Turk, "Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases," *Biological chemistry*, vol. 379, pp. 137-47, Feb 1998.
- [75] M. Vizovisek, R. Vidmar, E. Van Quickelberghe, F. Impens, U. Andjelkovic, B. Sobotic, *et al.*, "Fast profiling of protease specificity reveals similar substrate specificities for cathepsins K, L and S," *Proteomics*, vol. 15, pp. 2479-90, Jul 2015.
- [76] L. C. Alves, R. L. Melo, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, G. Caliendo, *et al.*, "S1 subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana* compared with cruzain, human cathepsin L and papain

- using substrates containing non-natural basic amino acids," *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 268, pp. 1206-12, Mar 2001.
- [77] Y. Choe, F. Leonetti, D. C. Greenbaum, F. Lecaille, M. Bogyo, D. Bromme, *et al.*, "Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities," *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, pp. 12824-32, May 5 2006.
- [78] R. Vidmar, M. Vizovisek, D. Turk, B. Turk, and M. Fonovic, "Protease cleavage site fingerprinting by label-free in-gel degradomics reveals pH-dependent specificity switch of legumain," *EMBO J*, vol. 36, pp. 2455-2465, Aug 15 2017.
- [79] L. Kramer, D. Turk, and B. Turk, "The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 38, pp. 873-898, 2017.
- [80] E. Vidak, U. Javoršek, M. Vizovišek, and B. Turk, "Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment," *Cells*, vol. 8, p. 264, 2019.
- [81] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, pp. 646-74, Mar 4 2011.
- [82] J. W. Pollard, "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis," *Nat Rev Cancer*, vol. 4, pp. 71-8, 2004.
- [83] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, pp. 57-70, Jan 07 2000.
- [84] R. A. Gatenby and R. J. Gillies, "Why do cancers have high aerobic glycolysis?," *Nat Rev Cancer*, vol. 4, pp. 891-9, Nov 2004.
- [85] J. A. Joyce and J. W. Pollard, "Microenvironmental regulation of metastasis," *Nat Rev Cancer*, vol. 9, pp. 239-52, Apr 2009.
- [86] P. Vaupel, F. Kallinowski, and P. Okunieff, "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review," *Cancer Res*, vol. 49, pp. 6449-65, Dec 1 1989.
- [87] L. K. Borouhgs and R. J. DeBerardinis, "Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth," *Nat Cell Biol*, vol. 17, pp. 351-9, Apr 2015.
- [88] S. D. Webb, J. A. Sherratt, and R. G. Fish, "Alterations in proteolytic activity at low pH and its association with invasion: a theoretical model," *Clin Exp Metastasis*, vol. 17, pp. 397-407, Jul 2000.
- [89] D. Hanahan, "Rethinking the war on cancer," *Lancet*, vol. 383, pp. 558-63, Feb 8 2014.
- [90] F. Klemm and J. A. Joyce, "Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer," *Trends Cell Biol*, vol. 25, pp. 198-213, Apr 2015.
- [91] S. D. Mason and J. A. Joyce, "Proteolytic networks in cancer," *Trends Cell Biol*, vol. 21, pp. 228-37, Apr 2011.
- [92] R. Pio, D. Ajona, and J. D. Lambris, "Complement inhibition in cancer therapy," *Semin Immunol*, vol. 25, pp. 54-64, Feb 2013.
- [93] R. D. Schreiber, L. J. Old, and M. J. Smyth, "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion," *Science*, vol. 331, pp. 1565-70, Mar 25 2011.
- [94] C. Stover, "Dual role of complement in tumour growth and metastasis (Review)," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 25, pp. 307-313, 2010.

- [95] L. Corrales, D. Ajona, S. Rafail, J. J. Lasarte, J. I. Riezu-Boj, J. D. Lambris, *et al.*, "Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression," *J Immunol*, vol. 189, pp. 4674-83, Nov 1 2012.
- [96] M. Okrój and J. Potempa, "Complement Activation as a Helping Hand for Inflammophilic Pathogens and Cancer," *Frontiers in Immunology*, vol. 9, 2019-January-10 2019.
- [97] D. M. Kochanek, S. M. Ghouse, M. M. Karbowniczek, and M. M. Markiewski, "Complementing Cancer Metastasis," *Frontiers in Immunology*, vol. 9, 2018-July-16 2018.
- [98] L. Hölzen, M. A. Parigiani, and T. Reinheckel, "Tumor cell- and microenvironment-specific roles of cysteine cathepsins in mouse models of human cancers," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1868, p. 140423, 2020/07/01/ 2020.
- [99] J. Dennemärker, T. Lohmüller, J. Mayerle, M. Tacke, M. Lerch, L. Coussens, *et al.*, "Deficiency for the cysteine protease cathepsin L promotes tumor progression in mouse epidermis," *Oncogene*, vol. 29, pp. 1611-21, Mar 18 2010.
- [100] Z. Yang and J. L. Cox, "Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma," *Cancer Cell Int*, vol. 7, p. 8, May 8 2007.
- [101] G. Mikhaylov, D. Klimpel, N. Schaschke, U. Mikac, M. Vizovisek, M. Fonovic, *et al.*, "Selective targeting of tumor and stromal cells by a nanocarrier system displaying lipidated cathepsin b inhibitor," *Angewandte Chemie*, vol. 53, pp. 10077-81, Sep 15 2014.
- [102] V. Gocheva, H. W. Wang, B. B. Gadea, T. Shree, K. E. Hunter, A. L. Garfall, *et al.*, "IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion," *Genes Dev*, vol. 24, pp. 241-55, Feb 01 2010.
- [103] K. Miyamoto, M. Iwadate, Y. Yanagisawa, E. Ito, J. Imai, M. Yamamoto, *et al.*, "Cathepsin L is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors," *Int J Oncol*, vol. 39, pp. 1109-15, Nov 2011.
- [104] N. Singh, P. Das, S. Datta Gupta, P. Sahni, R. M. Pandey, S. Gupta, *et al.*, "Prognostic significance of extracellular matrix degrading enzymes-cathepsin L and matrix metalloproteases-2 [MMP-2] in human pancreatic cancer," *Cancer Invest*, vol. 31, pp. 461-71, Aug 2013.
- [105] S. S. Chauhan, L. J. Goldstein, and M. M. Gottesman, "Expression of cathepsin L in human tumors," *Cancer Res*, vol. 51, pp. 1478-81, Mar 01 1991.
- [106] J. Rozhin, M. Sameni, G. Ziegler, and B. F. Sloane, "Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells," *Cancer Res*, vol. 54, pp. 6517-25, Dec 15 1994.
- [107] Y. Hashimoto, C. Kondo, T. Kojima, H. Nagata, A. Moriyama, T. Hayakawa, *et al.*, "Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells," *Cancer Biother Radiopharm*, vol. 21, pp. 217-24, Jun 2006.
- [108] J. A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F. Y. Tsai, *et al.*, "Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis," *Cancer Cell*, vol. 5, pp. 443-53, May 2004.

- [109] W. Zhang, S. Wang, Q. Wang, Z. Yang, Z. Pan, and L. Li, "Overexpression of cysteine cathepsin L is a marker of invasion and metastasis in ovarian cancer," *Oncol Rep*, vol. 31, pp. 1334-42, Mar 2014.
- [110] D. R. Sudhan and D. W. Siemann, "Cathepsin L inhibition by the small molecule KGP94 suppresses tumor microenvironment enhanced metastasis associated cell functions of prostate and breast cancer cells," *Clin Exp Metastasis*, vol. 30, pp. 891-902, Oct 2013.
- [111] M. Vizovišek, M. Fonović, and B. Turk, "Cysteine cathepsins in extracellular matrix remodeling: Extracellular matrix degradation and beyond," *Matrix Biol*, Feb 1 2018.
- [112] M. Fonovic and B. Turk, "Cysteine cathepsins and their potential in clinical therapy and biomarker discovery," *Proteomics. Clinical applications*, vol. 8, pp. 416-26, Jun 2014.
- [113] V. Gocheva and J. A. Joyce, "Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion," *Cell Cycle*, vol. 6, pp. 60-4, Jan 1 2007.
- [114] B. Wang, J. Sun, S. Kitamoto, M. Yang, A. Grubb, H. A. Chapman, *et al.*, "Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 6020-9, Mar 03 2005.
- [115] F. Veillard, A. Saidi, R. E. Burden, C. J. Scott, L. Gillet, F. Lécaille, *et al.*, "Cysteine cathepsins S and L modulate anti-angiogenic activities of human endostatin," *J Biol Chem*, vol. 286, pp. 37158-67, Oct 28 2011.
- [116] V. Gocheva, W. Zeng, D. Ke, D. Klimstra, T. Reinheckel, C. Peters, *et al.*, "Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis," *Genes Dev*, vol. 20, pp. 543-56, Mar 1 2006.
- [117] L. Sevenich and J. A. Joyce, "Pericellular proteolysis in cancer," *Genes Dev*, vol. 28, pp. 2331-47, Nov 1 2014.
- [118] L. Sevenich, R. L. Bowman, S. D. Mason, D. F. Quail, F. Rapaport, B. T. Elie, *et al.*, "Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S," *Nat Cell Biol*, vol. 16, pp. 876-88, Sep 2014.
- [119] B. Sobotić, M. Vizovisek, R. Vidmar, P. Van Damme, V. Gocheva, J. A. Joyce, *et al.*, "Proteomic Identification of Cysteine Cathepsin Substrates Shed from the Surface of Cancer Cells," *Mol Cell Proteomics*, vol. 14, pp. 2213-28, Aug 2015.
- [120] S. Nakao, S. Zandi, D. Sun, and A. Hafezi-Moghadam, "Cathepsin B-mediated CD18 shedding regulates leukocyte recruitment from angiogenic vessels," *The FASEB Journal*, vol. 32, pp. 143-154, 2018.
- [121] L. Goretzki, M. Schmitt, K. Mann, J. Calvete, N. Chucholowski, M. Kramer, *et al.*, "Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L," *FEBS Lett*, vol. 297, pp. 112-8, Feb 3 1992.
- [122] G. Kostoulas, A. Lang, H. Nagase, and A. Baici, "Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases," *FEBS Lett*, vol. 455, pp. 286-90, Jul 23 1999.

- [123] D. Jean, J. Hermann, F. Rodrigues-Lima, M. Barel, M. Balbo, and R. Frade, "Identification on melanoma cells of p39, a cysteine proteinase that cleaves C3, the third component of complement: amino-acid-sequence identities with procathepsin L," *Biochem J*, vol. 312 (Pt 3), pp. 961-9, Dec 15 1995.
- [124] D. Jean, M. Bar-Eli, S. Huang, K. Xie, F. Rodrigues-Lima, J. Hermann, *et al.*, "A cysteine proteinase, which cleaves human C3, the third component of complement, is involved in tumorigenicity and metastasis of human melanoma," *Cancer Res*, vol. 56, pp. 254-8, Jan 15 1996.
- [125] D. Jean, F. Rodrigues-Lima, B. Cassinat, J. Hermann, J. Cabane, and R. Frade, "Co-expression and secretion of C3, the third component of complement and a C3-cleaving cysteine proteinase in a highly metastatic human melanoma cell line," vol. 58, pp. 107-112, July 1997 1997.
- [126] R. Frade, F. Rodrigues-Lima, S. Huang, K. Xie, N. Guillaume, and M. Bar-Eli, "Procathepsin-L, a proteinase that cleaves human C3 (the third component of complement), confers high tumorigenic and metastatic properties to human melanoma cells," *Cancer Res*, vol. 58, pp. 2733-6, Jul 1 1998.
- [127] N. Rousselet, L. Mills, D. Jean, C. Tellez, M. Bar-Eli, and R. Frade, "Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human melanoma cells by anti-cathepsin L single chain variable fragment," *Cancer Res*, vol. 64, pp. 146-51, Jan 01 2004.
- [128] M. K. Liszewski, M. Kolev, G. Le Friec, M. Leung, P. G. Bertram, A. F. Fara, *et al.*, "Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation," *Immunity*, vol. 39, pp. 1143-57, Dec 12 2013.
- [129] H. D. Perez, O. Ohtani, D. Banda, R. Ong, K. Fukuyama, and I. M. Goldstein, "Generation of biologically active, complement-(C5) derived peptides by cathepsin H," *J Immunol*, vol. 131, pp. 397-402, Jul 1983.
- [130] K.-A. Nguyen, J. Żylicz, P. Szczesny, A. Sroka, N. Hunter, and J. Potempa, "Verification of a topology model of PorT as an integral outer-membrane protein in *Porphyromonas gingivalis*," *Microbiology*, vol. 155, pp. 328-337, 2009.
- [131] A. Eichinger, H. G. Beisel, U. Jacob, R. Huber, F. J. Medrano, A. Banbula, *et al.*, "Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold," *Embo j*, vol. 18, pp. 5453-62, Oct 15 1999.
- [132] R. N. Pike and J. Potempa, "Chapter 523 - Gingipain K A2 - Rawlings, Neil D," in *Handbook of Proteolytic Enzymes*, G. Salvesen, Ed., ed: Academic Press, 2013, pp. 2337-2344.
- [133] M. A. Curtis, H. K. Kuramitsu, M. Lantz, F. L. Macrina, K. Nakayama, J. Potempa, *et al.*, "Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*," *J Periodontal Res*, vol. 34, pp. 464-72, Nov 2000.
- [134] J. Mikolajczyk, K. M. Boatright, H. R. Stennicke, T. Nazif, J. Potempa, M. Bogoy, *et al.*, "Sequential autolytic processing activates the zymogen of Arg-gingipain," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 10458-64, Mar 21 2003.
- [135] T. Kadowaki, K. Nakayama, F. Yoshimura, K. Okamoto, N. Abe, and K. Yamamoto, "Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*," *J Biol Chem*, vol. 273, pp. 29072-6, Oct 30 1998.

- [136] J. Potempa, J. Mikolajczyk-Pawlinska, D. Brassell, D. Nelson, I. B. Thogersen, J. J. Enghild, *et al.*, "Comparative properties of two cysteine proteinases (gingipains R), the products of two related but individual genes of *Porphyromonas gingivalis*," *J Biol Chem*, vol. 273, pp. 21648-57, Aug 21 1998.
- [137] R. Pike, W. McGraw, J. Potempa, and J. Travis, "Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization, and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins," *J Biol Chem*, vol. 269, pp. 406-11, Jan 07 1994.
- [138] R. Takii, T. Kadowaki, A. Baba, T. Tsukuba, and K. Yamamoto, "A Functional Virulence Complex Composed of Gingipains, Adhesins, and Lipopolysaccharide Shows High Affinity to Host Cells and Matrix Proteins and Escapes Recognition by Host Immune Systems," *Infection and Immunity*, vol. 73, pp. 883-893 2005-02-01 2005.
- [139] N. M. O'Brien-Simpson, P. D. Veith, S. G. Dashper, and E. C. Reynolds, "Porphyromonas gingivalis Gingipains: The Molecular Teeth of a Microbial Vampire," *Curr Protein Pept Sci*, vol. 4, pp. 409-26, Dec 2003.
- [140] J. Potempa, R. Pike, and J. Travis, "Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes," *Biol Chem*, vol. 378, pp. 223-30, Mar-Apr 1997.
- [141] R. E. Fitzpatrick, L. C. Wijeyewickrema, and R. N. Pike, "The gingipains: scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*," *Future Microbiol*, vol. 4, pp. 471-87, May 2009.
- [142] G. Hajishengallis and P. I. Diaz, "Porphyromonas gingivalis: Immune Subversion Activities and Role in Periodontal Dysbiosis," *Current Oral Health Reports*, vol. 7, pp. 12-21, 2020/03/01 2020.
- [143] G. Hajishengallis, "The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota," *Molecular Oral Microbiology*, vol. 29, pp. 248-257, 2014.
- [144] J. Koziel, P. Mydel, and J. Potempa, "The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review," *Curr Rheumatol Rep*, vol. 16, p. 408, Mar 2014.
- [145] L. Reyes, P. Phillips, B. Wolfe, T. G. Golos, M. Walkenhorst, A. Progulsk-Fox, *et al.*, "Porphyromonas gingivalis and adverse pregnancy outcome," *Journal of Oral Microbiology*, vol. 9, p. 1374153, 2017/01/01 2017.
- [146] R. J. Genco and T. E. Van Dyke, "Prevention: Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis," *Nat Rev Cardiol*, vol. 7, pp. 479-80, Sep 2010.
- [147] T. Hoppe, D. Kraus, R. Probstmeier, S. Jepsen, and J. Winter, "Stimulation with *Porphyromonas gingivalis* enhances malignancy and initiates anoikis resistance in immortalized oral keratinocytes," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 234, pp. 21903-21914, 2019.
- [148] H. Inaba, H. Sugita, M. Kuboniwa, S. Iwai, M. Hamada, T. Noda, *et al.*, "Porphyromonas gingivalis promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation," *Cell Microbiol*, vol. 16, pp. 131-45, Jan 2013.

- [149] S. S. Dominy, C. Lynch, F. Ermini, M. Benedyk, A. Marczyk, A. Konradi, *et al.*, "Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors," *Science Advances*, vol. 5, p. eaau3333, 2019.
- [150] N. Huang, E. Shimomura, G. Yin, C. Tran, A. Sato, A. Steiner, *et al.*, "Immunization with cell-free-generated vaccine protects from Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 46, pp. 197-205, 2019.
- [151] Z. Chen, J. Potempa, A. Polanowski, M. Wikstrom, and J. Travis, "Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from Porphyromonas gingivalis," *J Biol Chem*, vol. 267, pp. 18896-901, Sep 15 1992.
- [152] Y. Guo, K. A. Nguyen, and J. Potempa, "Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins," *Periodontol 2000*, vol. 54, pp. 15-44, Oct 2010.
- [153] P. S. Bhogal, N. Slakeski, and E. C. Reynolds, "A cell-associated protein complex of Porphyromonas gingivalis W50 composed of Arg- and Lys-specific cysteine proteinases and adhesins," *Microbiology*, vol. 143, pp. 2485-95, Jul 1997.
- [154] T. Imamura, J. Potempa, and J. Travis, "Comparison of pathogenic properties between two types of arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from Porphyromonas gingivalis," *Microb Pathog*, vol. 29, pp. 155-163, 2000.
- [155] N. Pavloff, P. A. Pemberton, J. Potempa, W. C. Chen, R. N. Pike, V. Prochazka, *et al.*, "Molecular cloning and characterization of Porphyromonas gingivalis lysine-specific gingipain. A new member of an emerging family of pathogenic bacterial cysteine proteinases," *J Biol Chem*, vol. 272, pp. 1595-600, Jan 17 1997.
- [156] R. D. Pathirana, N. M. O'Brien-Simpson, G. C. Brammar, N. Slakeski, and E. C. Reynolds, "Kgp and RgpB, but not RgpA, are important for Porphyromonas gingivalis virulence in the murine periodontitis model," *Infect Immun*, vol. 75, pp. 1436-42, Mar 2007.
- [157] T. Yongqing, J. Potempa, R. N. Pike, and L. C. Wijeyewickrema, "The lysine-specific gingipain of Porphyromonas gingivalis : importance to pathogenicity and potential strategies for inhibition," *Adv Exp Med Biol*, vol. 712, pp. 15-29, 2011.
- [158] T. Kadowaki, K. Nakayama, K. Okamoto, N. Abe, A. Baba, Y. Shi, *et al.*, "Porphyromonas gingivalis proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases," *J Biochem*, vol. 128, pp. 153-9, Aug 2000.
- [159] J. M. Joyce, D. L. Aubrey, J. S. MacDonald, and U. Y. Ryo, "Lung uptake of technetium-99m HDP in giant-cell tumor metastases," *Clinical nuclear medicine*, vol. 14, pp. 767-8, Oct 1989.
- [160] T. Guevara, A. Rodríguez-Banqueri, A. M. Lasica, M. Ksiazek, B. A. Potempa, J. Potempa, *et al.*, "Structural determinants of inhibition of Porphyromonas gingivalis gingipain K by KYT-36, a potent, selective, and bioavailable peptidase inhibitor," *Scientific Reports*, vol. 9, p. 4935, 2019/03/20 2019.

- [161] M. A. Gorman, C. A. Seers, B. J. Michell, S. C. Feil, N. L. Huq, K. J. Cross, *et al.*, "Structure of the lysine specific protease Kgp from *Porphyromonas gingivalis*, a target for improved oral health," *Protein Sci*, vol. 24, pp. 162-6, Jan 2014.
- [162] M. A. Curtis, J. Aduse-Opoku, and M. Rangarajan, "Cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*," *Crit Rev Oral Biol Med*, vol. 12, pp. 192-216, 2001.
- [163] I. de Diego, F. Veillard, M. N. Sztukowska, T. Guevara, B. Potempa, A. Pomowski, *et al.*, "Structure and mechanism of cysteine peptidase gingipain K (Kgp), a major virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis," *J Biol Chem*, vol. 289, pp. 32291-302, Nov 14 2014.
- [164] N. Abe, A. Baba, R. Takii, K. Nakayama, A. Kamaguchi, Y. Shibata, *et al.*, "Roles of Arg- and Lys-gingipains in coaggregation of *Porphyromonas gingivalis*: identification of its responsible molecules in translation products of *rgpA*, *kgp*, and *hagA* genes," *Biol Chem*, vol. 385, pp. 1041-7, Nov 2004.
- [165] M. Tokuda, M. Duncan, M. I. Cho, and H. K. Kuramitsu, "Role of *Porphyromonas gingivalis* protease activity in colonization of oral surfaces," *Infect Immun*, vol. 64, pp. 4067-73, Oct 1996.
- [166] T. Chen and M. J. Duncan, "Gingipain adhesin domains mediate *Porphyromonas gingivalis* adherence to epithelial cells," *Microb Pathog*, vol. 36, pp. 205-9, Apr 2004.
- [167] T. Chen, K. Nakayama, L. Belliveau, and M. J. Duncan, "Porphyromonas gingivalis Gingipains and Adhesion to Epithelial Cells," *Infect. Immun.*, vol. 59, pp. 3048-3056 2001-05-01 2001.
- [168] D. Grenier and V. D. La, "Proteases of *Porphyromonas gingivalis* as important virulence factors in periodontal disease and potential targets for plant-derived compounds: a review article," *Curr Drug Targets*, vol. 12, pp. 322-31, Mar 01 2010.
- [169] R. D. Pathirana, N. M. O'Brien-Simpson, P. D. Veith, P. F. Riley, and E. C. Reynolds, "Characterization of proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*," *Microbiology*, vol. 152, pp. 2381-94, Aug 2006.
- [170] A. Sroka, M. Sztukowska, J. Potempa, J. Travis, and C. Attardo Genco, "Degradation of Host Heme Proteins by Lysine- and Arginine-Specific Cysteine Proteinases (Gingipains) of *Porphyromonas gingivalis*," *Journal of Bacteriology*, vol. 183, pp. 5609-5616 2001-10-01 2001.
- [171] M. D. Carlisle, R. N. Srikantha, and K. A. Brogden, "Degradation of human alpha- and beta-defensins by culture supernatants of *Porphyromonas gingivalis* strain 381," *J Innate Immun*, vol. 1, pp. 118-22, 2009.
- [172] G. Hajishengallis, "Complement and periodontitis," *Biochemical Pharmacology*, vol. 80, pp. 1992-2001, 12/15/ 2010.
- [173] K. Popadiak, J. Potempa, K. Riesbeck, and A. M. Blom, "Biphasic Effect of Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the Human Complement System," *J Immunol*, vol. 178, pp. 7242-50, Jun 01 2007.
- [174] C. C. Calkins, K. Platt, J. Potempa, and J. Travis, "Inactivation of Tumor Necrosis Factor- α by Proteinases (Gingipains) from the Periodontal Pathogen, *Porphyromonas gingivalis*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, pp. 6611-6614, 1998-03-20 1998.

- [175] V. Tam, N. M. O'Brien-Simpson, Y. Y. Chen, C. J. Sanderson, B. Kinnear, and E. C. Reynolds, "The RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis* Inactivate the Th2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5," *Infect Immun*, vol. 77, pp. 1451-8, Apr 2009.
- [176] S. Sugawara, E. Nemoto, H. Tada, K. Miyake, T. Imamura, and H. Takada, "Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness," *J Immunol*, vol. 165, pp. 411-8, Jul 01 2000.
- [177] Y. Kitamura, S. Matono, Y. Aida, T. Hirofuji, and K. Maeda, "Gingipains in the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis* cleave CD4 and CD8 on human T cells," *J Periodontal Res*, vol. 37, pp. 464-8, Dec 2002.
- [178] P. L. Yun, A. A. Decarlo, C. C. Chapple, C. A. Collyer, and N. Hunter, "Binding of *Porphyromonas gingivalis* gingipains to human CD4+ T cells preferentially down-regulates surface CD2 and CD4 with little affect on co-stimulatory molecule expression," *Microb Pathog.*, vol. 38, pp. 85-96, February-March 2005 2005.
- [179] T. Imamura, S. Tanase, T. Hamamoto, J. Potempa, and J. Travis, "Activation of blood coagulation factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*," *Biochem J*, vol. 353, pp. 325-31, Jan 15 2001.
- [180] T. Imamura, A. Banbula, P. J. Pereira, J. Travis, and J. Potempa, "Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (Gingipains R) from *porphyromonas gingivalis*," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 18984-91, Jun 01 2001.
- [181] A. Lourbakos, Y. Yuan, A. L. Jenkins, J. Travis, P. Andrade-Gordon, R. Santulli, *et al.*, "Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity," *Blood*, vol. 97, pp. 3790-3797, 2001.
- [182] A. Lourbakos, C. Chinni, P. Thompson, J. Potempa, J. Travis, E. J. Mackie, *et al.*, "Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*," *FEBS Letters*, vol. 435, pp. 45-48, 1998.
- [183] A. Lourbakos, J. Potempa, J. Travis, M. R. D'Andrea, P. Andrade-Gordon, R. Santulli, *et al.*, "Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion," *Infect Immun*, vol. 69, pp. 5121-30, Aug 2001.
- [184] J. Potempa, A. Banbula, and J. Travis, "Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses," *Periodontol 2000*, vol. 24, pp. 153-92, Oct 2000.
- [185] N. M. O'Brien-Simpson, R. D. Pathirana, R. A. Paolini, Y. Y. Chen, P. D. Veith, V. Tam, *et al.*, "An immune response directed to proteinase and adhesin functional epitopes protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss," *J Immunol*, vol. 175, pp. 3980-9, Sep 15 2005.
- [186] A. Baba, N. Abe, T. Kadowaki, H. Nakanishi, M. Ohishi, T. Asao, *et al.*, "Arg- gingipain Is Responsible for the Degradation of Cell Adhesion Molecules of Human Gingival Fibroblasts and Their Death Induced by *Porphyromonas gingivalis*," *Biol Chem*, vol. 382, pp. 817-24, May 2001.

- [187] S. Urnowey, T. Ansai, V. Bitko, K. Nakayama, T. Takehara, and S. Barik, "Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling," *BMC Microbiol*, vol. 6, p. 26, Mar 08 2006.
- [188] P. G. Stathopoulou, J. C. Galicia, M. R. Benakanakere, C. A. Garcia, J. Potempa, and D. F. Kinane, "Porphyromonas gingivalis induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism," *BMC Microbiology*, vol. 9, pp. 1-12, 2009.
- [189] J. A. Wingrove, R. G. DiScipio, Z. Chen, J. Potempa, J. Travis, and T. E. Hugli, "Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis*," *J Biol Chem*, vol. 267, pp. 18902-7, Sep 15 1992.
- [190] M. A. Jagels, J. Travis, J. Potempa, R. Pike, and T. E. Hugli, "Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*," *Infect Immun*, vol. 64, pp. 1984-91, Jun 1996.
- [191] K. Okuda, T. Kato, Y. Naito, M. Ono, Y. Kikuchi, and I. Takazoe, "Susceptibility of *Bacteroides gingivalis* to bactericidal activity of human serum," *J Dent Res*, vol. 65, pp. 1024-7, Jul 1986.
- [192] M. Potempa, J. Potempa, M. Okroj, K. Popadiak, S. Eick, K. A. Nguyen, *et al.*, "Binding of complement inhibitor C4b-binding protein contributes to serum resistance of *Porphyromonas gingivalis*," *J Immunol*, vol. 181, pp. 5537-44, Oct 15 2008.
- [193] H. Mahtout, F. Chandad, J. M. Rojo, and D. Grenier, "Porphyromonas gingivalis mediates the shedding and proteolysis of complement regulatory protein CD46 expressed by oral epithelial cells," *Oral Microbiol Immunol*, vol. 24, pp. 396-400, Oct 2009.
- [194] E. Andrian, D. Grenier, and M. Rouabhia, "Porphyromonas gingivalis gingipains mediate the shedding of syndecan-1 from the surface of gingival epithelial cells," *Oral Microbiol Immunol*, vol. 21, pp. 123-8, Apr 2006.
- [195] M. Feldman, V. D. La, T. B. Lombardo Bedran, D. M. Palomari Spolidorio, and D. Grenier, "Porphyromonas gingivalis-mediated shedding of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) by oral epithelial cells: a potential role in inflammatory periodontal disease," *Microbes and Infection*, vol. 13, pp. 1261-1269, 1/1/2011 2011.
- [196] A. Wilensky, R. Tzach-Nahman, J. Potempa, L. Shapira, and G. Nussbaum, "Porphyromonas gingivalis Gingipains Selectively Reduce CD14 Expression, Leading to Macrophage Hyporesponsiveness to Bacterial Infection," *Journal of Innate Immunity*, vol. 7, pp. 127-135, 2014.
- [197] L. Duncan, M. Yoshioka, F. Chandad, and D. Grenier, "Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles," *Microb Pathog*, vol. 36, pp. 319-25, Jun 2004.

- [198] A. Oleksy, A. Banbula, M. Bugno, J. Travis, and J. Potempa, "Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation," *Microbial Pathogenesis*, vol. 32, pp. 173-181, 2002/04/01/ 2002.
- [199] L. W. P. Yun, A. A. Decarlo, and N. Hunter, "Blockade of Protease-Activated Receptors on T Cells Correlates with Altered Proteolysis of CD27 by Gingipains of *Porphyromonas gingivalis*," *J Clin Exp Immunol.* , vol. 150, pp. 217-229, 2007.
- [200] R. Mezyk-Kopec, M. Bzowska, J. Potempa, N. Jura, A. Sroka, R. A. Black, *et al.*, "Inactivation of membrane tumor necrosis factor alpha by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*," *Infect Immun*, vol. 73, pp. 1506-14, Mar 2005.
- [201] K. Hocevar, J. Potempa, and B. Turk, "Host cell-surface proteins as substrates of gingipains, the main proteases of *Porphyromonas gingivalis*," *Biol Chem*, vol. 399, pp. 1353-1361, Jun 1 2018.
- [202] L. Groth-Pedersen and M. Jaattela, "Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes," *Cancer Lett*, vol. 332, pp. 265-74, May 28 2010.
- [203] M. Harboe, E. B. Thorgersen, and T. E. Mollnes, "Advances in assay of complement function and activation," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 63, pp. 976-87, Sep 16 2011.
- [204] R. Nunez, "Flow cytometry: principles and instrumentation," *Curr Issues Mol Biol*, vol. 3, pp. 39-45, Apr 2001.
- [205] J. Rappsilber, M. Mann, and Y. Ishihama, "Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips," *Nat Protoc*, vol. 2, pp. 1896-906, 2007.
- [206] J. Cox and M. Mann, "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification," *Nature biotechnology*, vol. 26, pp. 1367-72, Dec 2008.
- [207] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, R. A. Scheltema, J. V. Olsen, and M. Mann, "Andromeda: a Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment," *Journal of proteome research*, vol. 10, pp. 1794-805, Apr 1 2011.
- [208] S. Tyanova, T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M. Y. Hein, T. Geiger, *et al.*, "The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data," *Nat Methods*, vol. 13, pp. 731-40, Sep 2016.
- [209] H. Liu, R. G. Sadygov, and J. R. Yates, 3rd, "A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics," *Anal Chem*, vol. 76, pp. 4193-201, Jul 15 2004.
- [210] Y. Perez-Riverol, A. Csordas, J. Bai, M. Bernal-Llinares, S. Hewapathirana, D. J. Kundu, *et al.*, "The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data," *Nucleic Acids Research*, vol. 47, pp. D442-D450, 2018.
- [211] R. Xing, A. K. Addington, and R. W. Mason, "Quantification of cathepsins B and L in cells," *Biochem J*, vol. 332 (Pt 2), pp. 499-505, Jun 01 1998.
- [212] J. Condeelis and J. W. Pollard, "Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis," *Cell*, vol. 124, pp. 263-6, Jan 27 2006.
- [213] B. Ruffell, N. I. Affara, and L. M. Coussens, "Differential macrophage programming in the tumor microenvironment," *Trends Immunol*, vol. 33, pp. 119-26, Mar 2012.

- [214] H. Tada, S. Sugawara, E. Nemoto, T. Imamura, J. Potempa, J. Travis, *et al.*, "Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains," *J Dent Res*, vol. 82, pp. 796-801, Oct 2003.
- [215] K. Hočevár, M. Vizovišek, A. Wong, J. Kozieł, M. Fonović, B. Potempa, *et al.*, "Proteolysis of Gingival Keratinocyte Cell Surface Proteins by Gingipains Secreted From Porphyromonas gingivalis – Proteomic Insights Into Mechanisms Behind Tissue Damage in the Diseased Gingiva," *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, April-28 2020.
- [216] J. C. Oliveros, "Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.," ed, 2007-2015.
- [217] A. Mitchell, H. Y. Chang, L. Daugherty, M. Fraser, S. Hunter, R. Lopez, *et al.*, "The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years," *Nucleic Acids Res*, vol. 43, pp. D213-21, Jan 2014.
- [218] J. Reimand, M. Kull, H. Peterson, J. Hansen, and J. Vilo, "g:Profiler--a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments," *Nucleic acids research*, vol. 35, pp. W193-200, Jul 2007.
- [219] J. Reimand, T. Arak, P. Adler, L. Kolberg, S. Reisberg, H. Peterson, *et al.*, "g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update)," *Nucleic Acids Res*, vol. 44, pp. W83-9, Jul 08 2016.
- [220] J. L. Griffin and R. A. Kauppinen, "Tumour metabolomics in animal models of human cancer," *J Proteome Res*, vol. 6, pp. 498-505, Feb 2007.
- [221] C. Mehner, E. Miller, A. Nassar, W. R. Bamlet, E. S. Radisky, and D. C. Radisky, "Tumor cell expression of MMP3 as a prognostic factor for poor survival in pancreatic, pulmonary, and mammary carcinoma," *Genes Cancer*, vol. 6, pp. 480-9, Nov 2015.
- [222] C. L. Wilder, C. Walton, V. Watson, F. A. Stewart, J. Johnson, S. R. Peyton, *et al.*, "Differential cathepsin responses to inhibitor-induced feedback: E-64 and cystatin C elevate active cathepsin S and suppress active cathepsin L in breast cancer cells," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 79, pp. 199-208, Oct 2016.
- [223] A. Barbarin and R. Frade, "Procathepsin L secretion, which triggers tumour progression, is regulated by Rab4a in human melanoma cells," *Biochem J*, vol. 437, pp. 97-107, Jul 01 2011.
- [224] M. Zoller, "CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?," *Nat Rev Cancer*, vol. 11, pp. 254-67, Apr 2011.
- [225] S. Vajda, D. Beglov, A. E. Wakefield, M. Egbert, and A. Whitty, "Cryptic binding sites on proteins: definition, detection, and druggability," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 44, pp. 1-8, May 22 2018.
- [226] A. Guentsch, M. Kramesberger, A. Sroka, W. Pfister, J. Potempa, and S. Eick, "Comparison of gingival crevicular fluid sampling methods in patients with severe chronic periodontitis," *J Periodontol*, vol. 82, pp. 1051-60, Jul 2011.
- [227] N. I. Binti Badlishah Sham, S. D. Lewin, and M. M. Grant, "Proteomic Investigations of In Vitro and In Vivo Models of Periodontal Disease," *PROTEOMICS – Clinical Applications*, vol. n/a, p. 1900043, 2019.

- [228] N. Bostanci and K. Bao, "Contribution of proteomics to our understanding of periodontal inflammation," *Proteomics*, vol. 17, Feb 2016.
- [229] N. Ally, J. C. Whisstock, M. Sieprawaska-Lupa, J. Potempa, B. F. Le Bonniec, J. Travis, *et al.*, "Characterization of the specificity of arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* reveals active site differences between different forms of the enzymes," *Biochemistry*, vol. 42, pp. 11693-700, Oct 14 2003.
- [230] P. Chiarugi and E. Giannoni, "Anoikis: a Necessary Death Program for Anchorage-Dependent Cells," *Biochem Pharmacol*, vol. 76, pp. 1352-64, Dec 1 2008.
- [231] J. Bunek, P. Kamarajan, and Y. L. Kapila, "Anoikis Mediators in Oral Squamous Cell Carcinoma," *Oral Dis*, vol. 17, pp. 355-61, May 2010.
- [232] N. Beaufort, E. Corvazier, S. Mlanaoindrou, S. de Bentzmann, and D. Pidard, "Disruption of the endothelial barrier by proteases from the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: implication of matrilysis and receptor cleavage," *PLoS One*, vol. 8, p. e75708, 2013.
- [233] A. L. DuMont and N. P. Cianciotto, "Stenotrophomonas maltophilia Serine Protease StmPr1 Induces Matrilysis, Anoikis, and Protease-Activated Receptor 2 Activation in Human Lung Epithelial Cells," *Infect Immun*, vol. 85, pp. e00544-17, Dec 2017.
- [234] S. M. Frisch and R. A. Screaton, "Anoikis mechanisms," *Curr Opin Cell Biol*, vol. 13, pp. 555-62, Oct 2001.
- [235] M. L. Taddei, E. Giannoni, T. Fiaschi, and P. Chiarugi, "Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases," *J Pathol*, vol. 226, pp. 380-93, Jan 2011.
- [236] L. Moro, M. Venturino, C. Bozzo, L. Silengo, F. Altruda, L. Beguinot, *et al.*, "Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival," *Embo j*, vol. 17, pp. 6622-32, Nov 16 1998.
- [237] S. Ruggiero, R. Cosgarea, J. Potempa, B. Potempa, S. Eick, and M. Chiquet, "Cleavage of extracellular matrix in periodontitis: Gingipains differentially affect cell adhesion activities of fibronectin and tenascin-C," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1832, pp. 517-526, 2013.
- [238] M.-A. Houle, D. Grenier, P. Plamondon, and K. Nakayama, "The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 221, pp. 181-185, 2003.
- [239] M. A. Scragg, S. J. Cannon, M. Rangarajan, D. M. Williams, and M. A. Curtis, "Targeted disruption of fibronectin-integrin interactions in human gingival fibroblasts by the RI protease of *Porphyromonas gingivalis* W50," *Infect Immun*, vol. 67, pp. 1837-43, Apr 1999.
- [240] B. Cieply, C. Koontz, and S. M. Frisch, "CD44S-hyaluronan Interactions Protect Cells Resulting from EMT Against Anoikis," *Matrix Biol*, vol. 48, pp. 55-65, Oct 2015.
- [241] J. Katz, V. Sambandam, J. H. Wu, S. M. Michalek, and D. F. Balkovetz, "Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes," *Infect Immun*, vol. 68, pp. 1441-9, Mar 2000.

- [242] J. Katz, Q.-B. Yang, P. Zhang, J. Potempa, J. Travis, S. M. Michalek, *et al.*, "Hydrolysis of Epithelial Junctional Proteins by *Porphyromonas gingivalis* Gingipains," *Infect. Immun.*, vol. 70 pp. 2512-2518 2002-05-01 2002.
- [243] N. Bostanci, T. Thurnheer, J. Aduse-Opoku, M. A. Curtis, A. S. Zinkernagel, and G. N. Belibasakis, "Porphyromonas gingivalis Regulates TREM-1 in Human Polymorphonuclear Neutrophils via Its Gingipains," *PLOS ONE*, vol. 8, p. e75784, 2013.
- [244] G. Hajishengallis, J. L. Krauss, S. Liang, M. L. McIntosh, and J. D. Lambris, "Pathogenic microbes and community service through manipulation of innate immunity," *Adv Exp Med Biol*, vol. 946, pp. 69-85, 2011.
- [245] G. Hajishengallis, T. Abe, T. Maekawa, E. Hajishengallis, and J. D. Lambris, "Role of complement in host-microbe homeostasis of the periodontium," *Seminars in Immunology*, vol. 25, pp. 65-72, 2// 2013.
- [246] C. Damgaard, P. Holmstrup, T. E. Van Dyke, and C. H. Nielsen, "The complement system and its role in the pathogenesis of periodontitis: current concepts," *Journal of Periodontal Research*, vol. 50, pp. 283-293, 2015.
- [247] N. Al-Shibani and L. J. Windsor, "Effects of *Porphyromonas gingivalis* on human gingival fibroblasts from healthy and inflamed tissues," *J Periodontal Res*, vol. 43, pp. 465-70, Aug 2008.
- [248] J. Mysak, S. Podzimek, P. Sommerova, Y. Lyuya-Mi, J. Bartova, T. Janatova, *et al.*, "Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview," *Journal of Immunology Research*, vol. 2014, 2014.

Bibliografija

Znanstvena članka

- K. Hočevar, J. Potempa, and B. Turk, "Host cell-surface proteins as substrates of gingipains, the main proteases of *Porphyromonas gingivalis*," *Biol Chem*, Jun 1 2018.
- K. Hočevar, M. Vizovišek, A. Wong, J. Koziel, M. Fonović, B. Potempa, *et al.*, "Proteolysis of Gingival Keratinocyte Cell Surface Proteins by Gingipains Secreted From *Porphyromonas gingivalis* – Proteomic Insights Into Mechanisms Behind Tissue Damage in the Diseased Gingiva," *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, April-28, 2020.

Prispevek na konferenci

- K. Hočevar, B. Sobotič, M. Potempa, M. Martin, A. Blom, and B. Turk, "Cysteine cathepsins L and S diminish complement activation on the surface of tumour cells," *Molecular Immunology*, vol. 89, pp. 122-123, Sept 1, 2017 – prispevek s konference *16th Eropean Meeting on Complement in human disease*, Copenhagen, Denmark, 2017

Članek v pripravi

- B. Sobotič, M. Vizovišek, K. Hočevar, M. Martin, N. Kavčič, M. Potempa, J. Potempa, M. Fonović, A. Blom, and B. Turk, "Extracellular cathepsins blunt complement activation on tumour cells through shedding of C1q binding partners"

Biografija

Katarina Hočevar, rojena Korenčan, se je po končani Škofijski klasični gimnaziji vpisala na predbolonjski študijski program Kemije na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. V zadnjem letniku si je izbrala izbirni sklop Fizikalna kemija in biokemija. Leta 2013 je študij zaključila z diplomsko nalogo z naslovom: "Sipanje svetlobe v vodnih raztopinah izotaktične polimetakrilne kisline v prisotnosti CsCl", ki jo je opravila na Katedri za fizikalno kemijo. Istega leta (2013) se je kot mlada raziskovalka vpisala na podiplomski študij 3. bolonjske stopnje na Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana, smer NANOZnanost in nanotehnologija. Pod mentorstvom prof. ddr. Borisa Turka je na oddelku za Biokemijo, molekularno in strukturno biologijo na Institutu "Jožef Stefan" opravila svoje raziskovalno delo. Tekom doktorskega študija se je udeležila številnih mednarodnih konferenc, kjer je tudi predstavila dotedanje raziskovalno delo. Leta 2015 in 2016 (Erasmus praksa) je obiskala Jagiellonsko univerzo v Krakovu na Poljskem, kjer je pod mentorstvom prof. dr. Jana Potempe naredila del eksperimentov, ključnih za doktorsko nalogo.