

TARČENJE CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI VNETNIH OBOLENJIH

Lovro Kramer

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija

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

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. dr. Marko Fonovič, predsednik, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija
prof. dr. Gregor Anderluh, član, Kemijski inštitut, Ljubljana, Slovenija
prof. dr. Dušan Turk, član, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Lovro Kramer

TARČENJE CISTEINSKIH KATEPSINOV V VNETNIH
OBOLENJIH

Doktorska disertacija

TARGETING CYSTEINE CATHEPSINS IN INFLAMMATORY
DISEASES

Doctoral Dissertation

Mentor: prof. ddr. Boris Turk

Ljubljana, Slovenija, februar 2017

Zahvala

Za financiranje doktorskega študija se zahvaljujem ARRS. Zahvaljujem se tudi financiranju študijske izmenjave v Švici s strani EC pod okriljem projekta LIVIMODE.

Mentorju prof. ddr. Borisu Turku se zahvaljujem za sprejem v raziskovalno skupino in dobre delovne pogoje tekom doktorskega študija. Zahvaljujem se tudi za mentorstvo pri doktorski disertaciji, kritičen pregled doktorskega dela in številne nasvete pri raziskovalnem delu.

Akademiku prof. dr. Vitu Turku se zahvaljujem za mentorstvo v prvih dveh letih mojega doktorskega študija in vzpodbudo pri raziskovalnem delu.

Prof. dr. Marku Fonoviću in prof. dr. Gregorju Anderluhu se zahvaljujem za strokoven in kritičen pregled doktorske disertacije.

Prof. dr. Dušanu Turku se zahvaljujem za strokoven in kritičen pregled doktorske disertacije ter strokovno pomoč pri reševanju tridimenzionalnih struktur proteinov.

I thank Prof. Dr. Markus Grütter for accepting me into his research group and his contribution to the DARPin project. I also thank Prof. Dr. Markus Seeger, Dr. Heidi Roszitzki-Voser and Rito Zbinden for their contribution and excellent technical assistance.

I thank Dr. Haiyu Hu, Dr. Divya Vats, Aroa Duro-Castano, Prof. Dr. Maria J. Vincent, Dr. Oliver Plettenburg and Prof. Dr. Carsten Shultz for their critical contribution to the development of substrate-based probes used in our studies.

Zahvaljujem se dr. Mateju Vizovišku za opravljene poskuse kinetike in aktivnosti substratnih sond.

Dr. Robertu Vidmarju se zahvaljujem za opravljene poskuse masne spektrometrije.

Dr. Mihi Renku se zahvaljujem za poskuse povezane s kristalizacijo in reševanju tridimenzionalne strukture proteinov.

Dr. Janji Završnik, Ivici Štefe, doc. dr. Olgi Vasiljevi in ostalim sodelavcem z odseka B1 se zahvaljujem za strokovno in tehnično pomoč.

Posebej se zahvaljujem tudi Anji, mami Idi, očetu Jožetu in ostalim domačim za vzpodbudo tekom študija.

Povzetek

Cisteinski katepsini v številnih primerih vnetnih bolezni pripevajo k razvoju in napredovanju bolezni, a natančna vloga posameznih katepsinov ni vedno jasna. Pri boleznih kot so rak, vnetne bolezni sklepov in ateroskleroza, so najpomembnejši katepsini B, K, L in S. Za te encime je v zdravih tkivih značilna endolizosomalna lokalizacija, medtem ko se po indukciji vnetja katepsini delno translocirajo na področje celične membrane ter v zunajcelični prostor, poleg tega pa se njihovo izražanje in aktivnosti povišajo.

V okviru doktorskega dela smo se osredotočili na pripravo novih orodij za spremljanje lokalizacije katepsinov B in S *in vivo*, kar bi omogočilo karakterizacijo njune vloge pri boleznih. Ta pristop ima tudi pomembno translacijsko vrednost v medicini, saj lahko z optičnim slikanjem diagnosticiramo bolezni, za katere je značilno povišano izražanje tarčnega proteina. V primeru katepsinov je bil razvoj selektivnih sond v preteklosti otežen zaradi visoke strukturne podobnosti med encimi te družine.

Pri našem delu smo se osredotočili na dve novi tehniki, ki sta nam omogočili pripravo selektivnih orodij za diferenciacijo med temi zelo ohranjenimi tarčami.

Katepsin B smo specifično tarčili z malimi vezavnimi proteini DARPin, za katere je značilno prepoznavanje velikih tridimenzionalnih epitopov na površini tarčnih proteinov. Razvili smo DARPin *8h6*, ki se z visoko afiniteto veže na katepsin B na strukturno heterogeno območje v družini katepsinov. Fluorescentno označeni DARPin *8h6* se je vezal s katepsinom B na površini tumorskih celic in makrofagov ter v vnetnem mikrookolju v dveh mišjih modelih raka mlečne žleze in v modelu artritisa, kar kaže na možnost uporabe tega DARPina za spremljanje lokalizacije katepsina B. Zaradi hitrega izločanja presežnih koncentracij DARPina iz krvnega obtoka smo v zelo kratkem času po sistemski administraciji v miših zaznali visok kontrast na območju tumorja oziroma artritisa, kar kaže na potencial pri razvoju DARPina kot diagnostičnega orodja za vnetne bolezni. Pri vezavi na katepsin B DARPin *8h6* delno zasede tudi aktivno mesto katepsina B, zaradi česar inhibira njegovo encimsko aktivnost, kar bi v prihodnosti lahko omogočilo tudi terapevtske ali teranostične aplikacije.

V drugem delu doktorata smo selektivno tarčili katepsin S s pametnimi substratnimi sondami, ki smo jih razvili na osnovi reverznega pristopa. Ta metodologija temelji na pretvorbi znanega selektivnega inhibitorja z dobrimi farmakološkimi lastnostmi v fluorescentni substrat, pri čemer se z veliko verjetnostjo ohranja selektivnost za tarčni encim. Selektivno substratno sondo 2 smo nadalje modificirali z lipidno oziroma polimerno skupino za izboljšanje *in vivo* tarčenja. Ugotovili smo, da konjugacija sond ni spremenila selektivnosti za katepsin S ali znižala procesiranja v celičnem modelu diferenciranih makrofagov, kar kaže na možnost uporabe sond v predkliničnih raziskavah bolezni kot tudi za diagnostične namene.

Abstract

Cysteine cathepsins are involved in the development and progression of numerous inflammatory diseases, although the exact role of individual cathepsins is not always clear. Cathepsins B, K, L and S are the most important in cancer, inflammatory bone diseases and atherosclerosis. While these proteases are usually contained in the endolysosomal system within cells, they are translocated in part to the cell membrane and the extracellular space after the induction of inflammation that is also accompanied by their elevated activities.

In this thesis we focused on the development of new tools for following the localization of cathepsins B and S *in vivo*, which would enable characterization of their role in diseases. The technology also has an important translational value in medicine, since optical imaging with these tools can be used for disease diagnosis in the cases in which the target protein is upregulated. In the case of cathepsins, the development of selective probes has been difficult in the past due to the high structural similarity within the cathepsin family.

In our work we focused on two new techniques that allowed us to develop tools for differentiation among these highly conserved targets.

We targeted cathepsin B with small binder proteins DARPins that recognize extended three-dimensional epitopes at the surface of target proteins that enabled differentiation of cathepsin B from the other cathepsins. We developed DARPin *8h6* that binds cathepsin B with high affinity at a site of low structural conservation in the cathepsin family. Fluorescently labelled DARPin *8h6* interacted with cathepsin B on the surface of tumour cells and macrophages and in the inflammatory environment in two mouse models of mammary gland tumours as well as an arthritis model, suggesting that this DARPin is an appropriate tool for following the localization of cathepsin B. Due to the fast elimination of access DARPin from bloodstream after the systemic administration in mice, we could detect a high signal contrast at the site of tumour and arthritis, which points to a potential in a diagnostic tool development for inflammatory diseases. Upon binding of DARPin *8h6* to cathepsin B, the DARPin covered part of the enzyme's active site and inhibited cathepsin B activity. In the future the DARPin could also be used in therapeutic or theranostic applications.

In the second part of the dissertation, we targeted cathepsin S with smart substrate probes that were developed with reversed design. This methodology is based on transformation of a known selective inhibitor with good pharmacological properties into a fluorescent substrate, by preserving the selectivity for the target enzyme. The selective substrate probe 2 was further modified with a lipid or a polymer group for improved *in vivo* targeting. The modification did not change the selectivity of the probes for cathepsin S, neither did it limit the processing in a cell model of differentiated macrophages. This suggests to the applicability of the probes in preclinical research as well as disease diagnostics.

Kazalo

Slike	xv
Tabele	xvii
Kratice	xix
Simboli	xxi
Standardne oznake aminokislin	xxiii
1 Uvod	1
1.1 Vnetje	1
1.1.1 Vnetne bolezni	2
1.1.1.1 Vnetje in rak	2
1.1.1.2 Vnetne bolezni sklepov	3
1.2 Proteaze	5
1.2.1 Cisteinski katepsini	6
1.2.1.1 Biokemijske posebnosti katepsinov B in S	8
1.2.1.2 Vloga katepsinov B in S pri raku	9
1.2.1.3 Vloga katepsinov B in S v vnetnih boleznih sklepov	11
1.3 Molekularne diagnostične tehnike	12
1.3.1 Afinitetne sonde	12
1.3.1.1 DARPini	12
1.3.1.1.1 Diagnostične aplikacije DARPinov	13
1.3.1.1.2 Terapevtske aplikacije DARPinov	14
1.3.2 Aktivnostne in substratne sonde	14
1.3.2.1 Aktivnostne in substratne sonde za cisteinske katepsine	16
2 Namen dela	19
3 Materiali in metode	21
3.1 Materiali	21
3.1.1 Laboratorijska oprema	21
3.1.2 Kemikalije, komercialni kiti in reagenti	22
3.1.3 Pufri in gojišča	23
3.1.4 Začetni oligonukleotidi	27
3.1.5 Vektorji	28
3.1.6 Protitelesa	30
3.1.7 Rekombinantni encimi in ostali proteini	30
3.1.8 Bakterijske in sesalske celične kulture	31
3.1.9 Miši	31
3.2 Metode	31
3.2.1 Ribosomalna predstavitev	31
3.2.1.1 Kloniranje cDNA knjižnice DARPinov v linearne konstrukte z vezavnim mestom za ribosome	32
3.2.1.2 <i>In vitro</i> transkripcija mRNA	34
3.2.1.3 Priprava <i>E. coli</i> S30 ekstrakta	34
3.2.1.4 <i>In vitro</i> translacija DARPinov v obliki terciarnih kompleksov z ribosomi in mRNA	34

3.2.1.5	Imobilizacija tarč na površini imunocevk in mikrotitrskih ploščic	35
3.2.1.6	Ribosomalna predstavitev terciarnih kompleksov	35
3.2.1.7	Povratni prepis mRNA v cDNA	35
3.2.1.8	Kloniranje obogatene cDNA knjižnice DARPinov v vektor pBXNH3	37
3.2.2	Kloniranje cDNA izbranih selektivnih DARPinov v vektor pQE30	37
3.2.3	Priprava mutantov DARPinov s C-končnim cisteinom z verižno reakcijo s polimerazo	38
3.2.4	Izražanje rekombinantnih proteinov	38
3.2.4.1	Izražanje DARPinov v <i>E. coli</i> MC1061 v formatu s 96 luknjicami	38
3.2.4.2	Izražanje DARPinov v <i>E. coli</i> XL-1 Blue v velikem obsegu	38
3.2.5	Izolacija in čiščenje rekombinantnih proteinov	38
3.2.5.1	Priprava topne proteinske frakcije iz bakterijskih celic	38
3.2.5.2	Ni ²⁺ -afinitetna kromatografija	39
3.2.5.3	Gelska filtracija	39
3.2.5.4	Ionsko-izmenjevalna kromatografija	39
3.2.6	Merjenje proteinskih interakcij	40
3.2.6.1	ELISA celokupnih bakterijskih lizatov	40
3.2.6.2	Afinitetni pH test	40
3.2.6.3	Afinitetni test za določanje selektivnosti DARPinov	41
3.2.6.4	Površinska plazmonska resonanca (SPR)	41
3.2.7	Kemijsko označevanje proteinov	41
3.2.7.1	Biotinilacija katapsinov z EZ-link-LC-LC-NHS-biotin	41
3.2.7.2	Označevanje DARPinov z maleimid-Cy5.5 ali maleimid-PEG2-biotin	42
3.2.8	Analiza proteinov	42
3.2.8.1	Določanje proteinske koncentracije	42
3.2.8.2	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)	42
3.2.8.3	Prenos Western in imunološka detekcija proteinov	43
3.2.8.4	Detekcija proteinov s fluorescentnim skenerjem Typhoon	43
3.2.8.5	Analiza proteinov z masno spektrometrijo	43
3.2.9	Encimska kinetika	44
3.2.9.1	Test selektivnosti pametnih substratnih sond	44
3.2.9.2	Določanje kinetičnih parametrov za encimsko pretvorbo fluorescentnih substratov in pametnih substratnih sond	44
3.2.9.3	Določanje vpliva liposomov na kinetične parametre pametnih substratnih sond	44
3.2.9.4	Test katapsinske inhibicije DARPinov	44
3.2.9.5	Določanje kinetičnih parametrov inhibicije katapsina B z DARPini	45
3.2.10	Določanje tridimenzionalne strukture kompleksov katapsina B z DARPini	47
3.2.10.1	Gojenje kristalov	47
3.2.10.2	Snemanje rentgenske difrakcije in določitev kristalne strukture z metodo molekulske zamenjave	47
3.2.11	Metode dela s sesalskimi celicami	47
3.2.11.1	Gojenje in pasažiranje celic	47
3.2.11.2	Spremljanje vezave protiteles in DARPinov s katapsinom B na površini celic	47
3.2.11.3	Zasledovanje pericelularne aktivnosti katapsina B s fluorescentnim substratom z-RR-AMC	48
3.2.11.4	Diferenciacija celic THP-1 s PMA	48
3.2.11.5	Zasledovanje aktivnosti katapsina S s pametnimi substratnimi sondami	48
3.2.11.6	Spremljanje asociacije pametnih substratnih sond s celično membrano	48
3.2.12	Metode dela z mišmi	49
3.2.12.1	Dovoljenje etične komisije za delo z mišmi	49

3.2.12.2	Priprava primarnih tumorskih celic PyMT	49
3.2.12.3	Priprava primarnih makrofagov	49
3.2.12.4	Priprava ortotopičnih modelov PyMT in 4T1	49
3.2.12.5	Priprava modela akutnega vnetja tačke	49
3.2.12.6	Spremljanje biodistribucije fluorescentno označenih DARPinov s sistemom IVIS Spectrum.....	49
3.2.12.7	Imunohistokemija tkiv.....	50
3.2.12.8	<i>In situ</i> zimografija tkiv.....	50
3.2.12.9	Ovrednotenje interakcije med DARPini in Katepsinom B <i>in vivo</i> 50	
3.2.13	Statistična obdelava podatkov	51
4	Rezultati	53
4.1	Priprava, karakterizacija in aplikacija selektivnih DARPinov za Katepsin B	53
4.1.1	Biotinilacija Katepsinov	53
4.1.2	Selekcija selektivnih DARPinov za Katepsin B.....	54
4.1.2.1	ELISA celokupnih bakterijskih lizatov	54
4.1.2.2	Presejalni testi DARPinov.....	57
4.1.3	Biokemijska karakterizacija DARPinov <i>81</i> in <i>8h6</i>	60
4.1.3.1	Testi za določanje selektivnosti DARPinov <i>81</i> in <i>8h6</i>	60
4.1.3.2	Kinetika inhibicije DARPinov <i>81</i> in <i>8h6</i>	62
4.1.3.3	Kristalna struktura kompleksov DARPinov <i>81</i> in <i>8h6</i> s Katepsinom B.....	67
4.1.3.4	Označevanje DARPinov z biotinom in fluorescentnim barvilom Cy5.5.....	70
4.1.4	Označevanje Katepsina B z DARPinom <i>8h6</i> v celicah in tkivih.....	71
4.1.4.1	Analiza izločanja Katepsina B iz celic.....	71
4.1.4.2	Interakcija DARPinov s Katepsinom B na površini celic.....	72
4.1.4.3	Zimografija tumorskih tkiv	74
4.1.5	Označevanje Katepsina B z DARPinom <i>8h6</i> v miših.....	75
4.1.5.1	Serumska stabilnost <i>8h6</i>	75
4.1.5.2	Spremljanje biodistribucije DARPinov v modelu mlečne žleze PyMT	76
4.1.5.3	Spremljanje biodistribucije DARPinov v modelu mlečne žleze 4T1	82
4.1.5.4	Spremljanje biodistribucije DARPinov v modelu akutnega vnetja tačke	84
4.2	Karakterizacija pametnih substratnih sond za Katepsin S	86
4.2.1	Analiza selektivnosti pametnih substratnih sond	86
4.2.2	Analiza aktivnosti sond na živih celicah	88
5	Razprava	91
6	Zaključki	101
	Literatura	103
	Bibliografija	115
	Biografija	116

Slike

Slika 1: Shematski prikaz nomenklature po Schechterju in Bergerju	6
Slika 2: Tridimenzionalna struktura Katepsinov B in S.	9
Slika 3: Shematski prikaz strukture DARPinov.....	13
Slika 4: Shematski prikaz afinitetnih, aktivnostnih in substratnih sond.....	15
Slika 5: Shematski prikaz razvoja selektivnih substratnih sond z reverznim pristopom. ...	17
Slika 6: Plazmidna mapa vektorja pBXNH3	28
Slika 7: Plazmidna mapa vektorja pRDV.....	29
Slika 8: Plazmidna mapa vektorja pQE30.....	30
Slika 9: Shematski prikaz obogatitve knjižnice DARPinov z metodo ribosomalne predstavitve, ki smo jo uporabili pri našem delu.....	32
Slika 10: Shematski prikaz strategije ribosomalne predstavitve za pridobitev selektivnih bispecifičnih vezavnih proteinov za človeški in mišji Katepsin B.....	36
Slika 11: Shematski prikaz encimske inhibicije v skladu z metodo splošnega modifikatorja.....	45
Slika 12: Detekcija biotiniziranih Katepsinov po ločitvi na NaDS-PAGE in prenosu Western.....	53
Slika 13: Masni spektri po analizi z MALDI-TOF masnim spektrometrom	54
Slika 14: Primer spektrofotometrične analize po testu ELISA celokupnih bakterijskih lizatov.	55
Slika 15: Aminokislinska zaporedja DARPinov, ki smo jih uporabili v presejalnih testih....	56
Slika 16: Afinitetni pH test DARPinov.....	57
Slika 17: SPR senzogram za interakcije DARPina <i>8h6</i> z imobiliziranim človeškim (zgoraj) in mišjim (spodaj) Katepsinom B.....	58
Slika 18: Test inhibicije encimske aktivnosti človeškega (hCatB) in mišjega (mCatB) Katepsina B z DARPini.	59
Slika 19: Afinitetni testi za preverjanje selektivnosti DARPinov <i>81</i> in <i>8h6</i>	61
Slika 20: Test selektivnosti inhibicije Katepsinske aktivnosti.....	62
Slika 21: Karakterizacija inhibicijskega mehanizma DARPina <i>8h6</i> za človeški Katepsin B.	63
Slika 22: Karakterizacija inhibicijskega mehanizma DARPina <i>8h6</i> za mišji Katepsin B.....	64
Slika 23: Karakterizacija inhibicijskega mehanizma DARPina <i>81</i> za človeški Katepsin B....	65
Slika 24: Karakterizacija inhibicijskega mehanizma DARPina <i>81</i> za mišji Katepsin B.	66
Slika 25: Struktura kompleksov med DARPinom <i>8h6</i> in človeškim Katepsinom B ter DARPinom <i>81</i> in človeškim Katepsinom B.....	69
Slika 26: Primerjava struktur kompleksov DARPina <i>8h6</i> in Katepsina B, DARPina <i>81</i> in Katepsina B ter prokatepsina B (PDB ID: 3PBH).....	70
Slika 27: Uspešnost biotinizacije DARPinov.....	70
Slika 28: Uspešnost označevanja DARPinov s fluorescentnim barvilom Cy5.5.....	71
Slika 29: Analiza pericelularnega Katepsina B v tumorskih celicah PyMT in 4T1 ter makrofagih.	72
Slika 30: Vezava DARPina <i>8h6</i> s pericelularnim Katepsinom B.	73
Slika 31: Vezave DARPina <i>8h6</i> s Katepsinom B v tkivnem vzorcu tumorja.....	74
Slika 32: Serumska stabilnost DARPina <i>8h6</i>	75
Slika 33: Neinvazivno optično slikanje z DARPini v tumorskem modelu PyMT v zgodnjih časovnih točkah.	77
Slika 34: Neinvazivno optično slikanje z DARPini v tumorskem modelu PyMT v poznih časovnih točkah.	78
Slika 35: Optično slikanje izoliranih organov 3 h po administraciji fluorescentnih DARPinov <i>E3_5</i> , <i>81</i> ali <i>8h6</i> v modelu PyMT.	79
Slika 36: Optično slikanje izoliranih organov 72 h po administraciji fluorescentnih DARPinov <i>E3_5</i> , <i>81</i> ali <i>8h6</i>	80
Slika 37: Histokemijska analiza tumorskega tkiva po administraciji fluorescentnega DARPina <i>8h6</i> v modelu PyMT.	81

Slika 38: Afinitetna precipitacija po intratumoralni aplikaciji biotiniliranih DARPinov.	82
Slika 39: Neinvazivno optično slikanje z DARPini v tumorskem modelu 4T1.	83
Slika 40: Optično slikanje izoliranih organov 3 h po administraciji fluorescentnih DARPinov <i>E3_5</i> ali <i>8h6</i> v modelu 4T1.	84
Slika 41: Neinvazivno optično slikanje z DARPini v modelu akutnega vnetja tačke z zymosanom.	85
Slika 42: Kvantifikacija fluorescentnih signalov v primeru modela akutnega vnetja z zymosanom.	85
Slika 43: Test selektivnosti substratnih sond 2, 2-PGA in 3.	87
Slika 44: Vpliv liposomov na sondi 2 in 3.	88
Slika 45: Spremljanje aktivacije substratnih sond v celicah THP-1 s fluorescentno mikroskopijo.	89
Slika 46: Spremljanje mehanizma vstopa sond v celice THP-1 s fluorescentno mikroskopijo.	89
Slika 47: Spremljanje aktivacije substratnih sond v celicah MCF7 s fluorescentno mikroskopijo.	90
Slika 48: Glavne vloge katepsinov v terapevtskem in diagnostičnem razvoju.	92
Slika 49: Shematski prikaz tarčenja katepsina B z DARPinom <i>8h6</i>	94

Tabele

Tabela 1: Zadetki po testu ELISA celokupnih bakterijskih lizatov.....	55
Tabela 2: Zbrani SPR podatki o interakcijah med DARPini in Katepsinom B.	59
Tabela 3: Parametri inhibicije človeškega in mišjega Katepsina B z DARPinom <i>8h6</i> oziroma <i>81</i>	67
Tabela 4: Kristalografski podatki za kristalne strukture kompleksov Katepsina B in DARPina <i>8h6</i> oziroma <i>81</i>	68
Tabela 5: Uspešnost označevanja DARPinov s fluorescentnim barvilom Cy5.5.....	71
Tabela 6: Kinetična karakterizacija substratnih sond 2, 2-PGA in 3.	88

Kratice

4MβNA	...	4-Metoksi-β-naftilamid
AMC	...	4-amino-7-metilkumarid
ABP	...	Aktivnostna sonda (angl. activity-based probe)
ATP	...	Adenozin trifosfat
BHQ-3	...	Dušilec v FRET paru za Cy5.5
BSA	...	Goveji serumski albumin
bp	...	Bazni par
CA074	...	(L-3-trans-(propilkarbamil)oksiran-2-karbonil)-L-izoleucil-L-prolin
cDNA	...	Komplementarna DNA
CSF	...	Kolonije stimulirajoči faktor (angl. colony-stimulating factor)
Cy5.5	...	NIR fluorescentno barvilo Cyanine5.5
DAMP	...	Poškodbam pridruženi molekularni vzorci (angl. damage-associated molecular patterns)
DARPin	...	Protein z načrtanimi ankirinskimi ponovitvami (angl. designed ankyrin repeat protein)
DNA	...	Deoksiribonukleinska kislina
DTT	...	Ditiotreitol
DMSO	...	Dimetilsulfoksid
E64	...	trans-Epoksisukcinil-L-leucilamido(4-gvanidino)butan
E64d	...	trans-Epoksisukcinil-L-leucilamido-3-metilbutan etil ester
ECL	...	Ojačana kemiluminiscenca (angl. enhanced chemiluminescence)
<i>E. coli</i>	...	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	...	Etilen diamintetraacetat
FBS	...	Fetalni goveji serum
FRET	...	Försterjev prenos resonančne energije (angl. Förster resonance energy transfer)
GM-CSF	...	Granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči faktor (angl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
HBSS	...	Uravnotežena pufrska raztopina po Hanku (angl. Hank's balanced salt solution)
HLA	...	Človeški levkocitni antigen (angl. human leukocyte antigen)
HRP	...	Hrenova peroksidaza
IPTG	...	Izopropil β-D-tiogalaktozid
LB	...	Gojišče po Luria-Bertani
MALDI	...	ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem (angl. matrix-assisted laser desorption/ionization)
MES	...	2-(N-morfolino)etansulfonska kislina
MHC	...	Poglavitni kompleks tkivne skladnosti (angl. major histocompatibility complex)
MRI	...	Slikanje z magnetno resonanco
mRNA	...	Informacijska RNA
MWCO	...	Velikost por v enotah molekulske mase (angl. molecular weight cut-off)
NaDS	...	Natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	...	Poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti NaDS
NF-κB	...	Jedrni dejavnik κB (angl. nuclear factor κB)
NHS	...	N-hidroksi sukcinimid
NIR	...	Bližnja infra rdeča svetloba (angl. near infra-red)
PAMP	...	Patogenom pridruženi molekularni vzorci (angl. pathogen-associated molecular patterns)

PCR	...	Verižna reakcija s polimerazo
PET	...	Pozitronska emisijska tomografija
PEG	...	Polietilen glikol
PIPES	...	1,4-Piperazin dietansulfonska kislina
PRR	...	Receptorji za prepoznavo molekularnih vzorcev (angl. pattern recognition receptors)
RANKL	...	Receptor aktivator liganda NF κ B (angl. receptor activator of NF κ B ligand)
RD	...	Ribosomalna predstavitev (angl. ribosome display)
RNA	...	Ribonukleinska kislina
	...	
SPECT	...	Enofotonska izsevna računalniška tomografija
STAT	...	Pretvornik signala in aktivator transkripcije (angl. signal transducer and activator of transcription)
TCEP	...	Tris(2-karboksietil)fosfin
TEMED	...	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletilendiamin
TGF- β		Transformirajoči rastni dejavnik β (angl. transforming growth factor β)
TNF- α	...	Dejavnik tumorske nekroze α (angl. tumour necrosis factor α)
TRIS	...	Tris(hidroksimetil) aminometan
z	...	Benziloksikarbonil

Simboli

α	...	Parameter nekompetitivnosti inhibicije
A_x	...	Absorbanca pri valovni dolžini x nm
β	...	Parameter hiperboličnosti inhibicije
Da	...	Dalton
E	...	Encim
ε_x	...	Ekstinkcijski koeficient pri valovni dolžini x nm
k_a	...	Kinetična konstanta asociacije
k_{cat}	...	Katalitična konstanta hitrosti cepitve substrata
k_{cat}/K_M	...	Kvocient katalitične učinkovitosti
K_D	...	Termodinamska konstanta disociacije kompleksa
k_d	...	Kinetična konstanta disociacije
K_I	...	Termodinamska ravnotežna konstanta inhibicije
K_M	...	Michaelis-Mentenina konstanta
I	...	Inhibitor
m/z	...	Razmerje med maso in nabojem
σ	...	Razmerje med koncentracijo substrata in Michaelis-Mentenino konstanto
S	...	Substrat
V/V	...	Razmerje med volumnom in volumnom
v_0	...	Hitrost encimske reakcije v odsotnosti inhibitorja
v_i	...	Hitrost encimske reakcije v prisotnosti inhibitorja
v_{rez}	...	Rezidualna hitrost encimske reakcije
v_{max}	...	Maksimalna hitrost reakcije
U	...	Enota encimske aktivnosti

Standardne oznake aminokislin

Aminokislina	Tričrkovna oznaka	Enočrkovna oznaka
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginska kislina	Asp	D
Cistein	Cys	C
Fenilalanin	Phe	F
Glicin	Gly	G
Glutamin	Gln	Q
Glutaminska kislina	Glu	E
Histidin	His	H
Izolevcin	Ile	I
Levcin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Tirozin	Tyr	Y
Treonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Valin	Val	V

Poglavje 1

Uvod

1.1 Vnetje

Vnetje je kompleksen biološki odziv organizma na mikrobnе patogene, rakaste novotvorbe ali fizične poškodbe tkiva. Glavni mediatorji vnetja so celice prirojenega imunskega sistema, sodelujejo pa tudi ostale vrste celic, komponente zunajceličnega matriksa ter plazemski proteini. V fiziološkem kontekstu je kontrolirano vnetje odgovor na homeostatsko neravnovesje, namen pa je hitra nevtralizacija vzroka za neravnovesje, odstranitev poškodovanega tkiva in ponovna vzpostavitev homeostaze (Medzhitov, 2008).

Na molekularnem nivoju vnetje sprožijo patogenom pridruženi molekulski vzorci (PAMP) v primeru okužb z mikrobi oziroma poškodbam pridruženi molekulski vzorci (DAMP) v primeru rakastih novotvorb in ostalih tkivnih poškodb (Ashley in sod., 2012). Med molekule PAMP spadajo komponente bakterijskih membran, membranski proteini ter bakterijska in virusna DNA. Na drugi strani so molekule DAMP oziroma alarmini komponente gostiteljskega organizma, ki se ob poškodbi celice sprostijo iz notranjosti celice na celično membrano ali v zunajceličnino. Najpomembnejši alarmini so proteini HMGB1, S100A8, serumski amiloid A, nukleinske kisline ter purinski metaboliti, kot je ATP. Skupna lastnost PAMP in DAMP molekul je vezava na receptorje za prepoznavo molekularnih vzorcev (PRR) na celicah prirojenega imunskega sistema. Vezava sproži znotrajcelične signalne poti, ki vodijo do povišanega izražanja in izločanja vnetnih citokinov in kemokinov na področju vnetja. To vodi do infiltracije novih efektorskih imunskih celic, kot so monociti in nevtrofilci, ki s sproščanjem škodljivih snovi v okolico uničijo vzrok vnetja, sočasno pa poškodujejo lokalno tkivo. Na področju vnetja se povišajo tudi količine številnih drugih vnetnih signalnih in efektorskih molekul, kot so prostoglandini in levkotrieni, kar vodi do vazodilatacije in povišane prepustnosti ožilja. To se na makroskopskem nivoju odraža v rdečici, toploti, oteklini, bolečini in zmanjšani dejavnosti organa. V odziv se v drugi fazi vključijo tudi komponente pridobljenega imunskega sistema, kot so B in T limfociti, ki bolj selektivno ciljajo na vzroke poškodbe in za okoliško tkivo niso tako škodljivi kot odziv prirojene imunosti. Selektivnost izvira iz antigenske predstavitve komponent uničenih mikrobov ali rakastih celic na površini antigen-predstavitvenih celic, predvsem dendritičnih celic in makrofagov. Celice pridobljenega imunskega sistema, kot so B limfociti in T celice ubijalke, nato prepoznajo te komponente in s proizvodnjo selektivnih nevtralizacijskih protiteles ali ciljano celično toksičnostjo uničijo okužene ali poškodovane celice. Regulaciji vnetja se v tej fazi priključijo T celice pomagalk z izločanjem vnetnih citokinov in T celice zaviralke z izločanjem protivnetnih citokinov. Po nevtralizaciji poškodbe oziroma okužbe sledi razrešitev vnetja, ko predvsem makrofagi izločajo lipoksine, ki preprečijo nadaljnjo infiltracijo nevtrofilcev in privlačijo monocite, ki vodijo proces celjenja rane (Ashley in sod., 2012; Medzhitov, 2008).

1.1.1 Vnetne bolezni

Napake v regulaciji imunskega odziva lahko na eni strani vodijo do pomanjkanja ustreznega vnetnega odziva, kar vodi do neučinkovite odstranitve poškodbe ali okužbe, po drugi strani pa lahko napake v razrešitvi vnetnega odziva vodijo do kroničnega vnetja in bolezni, kot so rak, ateroskleroza in osteoartritis (Goldring and Otero, 2011; Grivennikov in sod., 2010). Poseben primer napak v razrešitvi vnetnega odziva proti komponentam lastnega organizma vodi do avtoimunskih obolenj, kot so revmatoidni artritis, diabetes tipa I, multipla skleroza in luskavica (Cho and Gregersen, 2011; McInnes and Schett, 2011). Vse zgoraj naštetе bolezni skupaj imenujemo z vnetjem povezane bolezni.

1.1.1.1 Vnetje in rak

Rak je poleg kardiovaskularnih obolenj drugi najpogostejši vzrok smrti na svetu (WHO, 2012). Za rakasta obolenja je značilen razvoj malignih tumorjev, ki so na molekularnem nivoju posledica zmožnosti nekontrolirane delitve, nesmrtnosti in invazivnosti rakastih celic, ki se uspešno izognejo mehanizmom celične smrti in zaviranja rasti. Vzrok za transformacijo celic iz zdravih v rakaste je v genetski nestabilnosti celic, ki jo lahko spodbudi prekomerna izpostavljenost sevanju, hormonska nestabilnost, toksične kemikalije, debelost, mikrobne okužbe ali dedne genetske napake. V tumorjih se spremeni lokalna energetska presnova tkiva v korist rasti tumorjev ter spodbudi rast ožilja, kar je pomembno tako za dovod hranilnih snovi kot tudi za sposobnost zasevanja rakastih celic v druge organe. Nastali tumorji so sestavljeni iz rakastih celic in progenitorskih rakastih izvornih celic ter tumorskega mikrookolja, ki ga tvorijo okoliške endotelijske celice, periciti, fibroblasti, imunske celice ter komponente zunajceličnine (Hanahan and Weinberg, 2011).

Imunski sistem ima pri raku dihotomično vlogo. V osnovi deluje protitumorsko, saj uničuje novonastale rakaste celice, pri čemer so ključne naravne celice ubijalke in T celice ubijalke, ki prepoznajo rakaste celice, sproščajo citotoksične granule in v tarčnih rakastih celicah sprožijo celično smrt (Shalapour and Karin, 2015). Naravne celice ubijalke prepoznajo rakaste celice po visoko izraženih membranskih proteinih MICA in MICB, medtem ko T celice ubijalke prepoznajo raznolike tumorske antigene, ki jih predstavijo antigen-predstavitvene celice preko molekul poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC) I. Pri predstavitvi so najučinkovitejše dendritične celice, posebej v primeru nekaterih protitumorskih terapij, ki v rakastih celicah sprožijo imunogeno celično smrt. Za slednjo je značilna izpostavitve molekul DAMP na površino umirajočih celic ali v okolje, kjer aktivirajo dendritične celice in s tem povečajo učinkovitost pridobljenega imunskega odziva na tumorske antigene (Kroemer in sod., 2013).

Drugo plat imunskega odziva v tumorjih pa predstavlja kronično vnetje, ki paradoksalno pripomore k zaviranju protitumorskega imunskega odziva in hkrati ojača rast tumorjev (Shalapour and Karin, 2015). Ključno vlogo pri vzdrževanju vnetja imajo makrofagi, nevtrofilci, fibroblasti in mieloidne zaviralne celice v tumorskem mikrookolju. Skupna lastnost teh celic je izločanje vnetnih mediatorjev, ki stimulirajo preživetje, rast in invazivnost rakastih celic, spodbujajo rast ožilja ter zavirajo protitumorski imunski odziv. Makrofagi imajo pri tem zelo kompleksno vlogo, saj je zanje značilna plastičnost, ki vodi do široke fenotipske raznolikosti (Noy and Pollard, 2014; Ruffell and Coussens, 2015). Skrajni polarizacijski obliki fenotipa predstavljata klasično stanje M1 in alternativno stanje M2. V zgodnjih fazah rasti tumorjev so prisotni predvsem M1-polarizirani makrofagi, ki izločajo vnetne mediatorje, kot so interlevkin-1, interlevkin-6, interlevkin-23, TNF- α ter sodelujejo pri antigenski predstavitvi tumorskih antigenov. Ko pride zaradi rasti tumorske mase do nastanka hipoksičnih področij in kopičenja mlečne kisline, makrofagi preidejo v alternativno aktivirano stanje M2. To aktivacijo vzbudijo protivnetni citokin interlevkin-4 ali rastni dejavniki CSF1, GM-CSF in TGF- β . M2-polarizirani makrofagi izločajo rastne dejavnike, kot je VEGF, ki spodbujajo rast ožilja in s tem povečane količine kisika in hranil

ter tako omogočijo tumorju nadaljnjo rast. Imajo pa tudi pomembne protivnetne lastnosti, saj izločajo protivnetne dejavnike interleukin-10, TGF- β , arginazo 1 in nekatere HLA molekule, ki zavirajo protitumorsko aktivnost naravnih celic ubijalk in T celic ubijalk. M2-polarizirani makrofagi izločajo tudi velike količine proteaz iz družine cisteinskih katepsinov, ki pomembno prispevajo k invazivnosti in metastaziranju tumorjev primarno zaradi razgradnje komponent zunajceličnine (Gocheva in sod., 2010; Yan in sod., 2016). Ker ima polarizacijsko stanje M1 protitumorsko aktivnost, se nekatere eksperimentalne terapije osredotočajo na »prevzgojitev« makrofagov iz stanja M2 v M1, kar lahko med drugim sproži inhibicija prepisovalnega dejavnika NF κ B, inhibicija receptorja rastnega dejavnika CSF-1 ali stimulacija s citokinom TNF- α (Quail and Joyce, 2013).

Kronično vnetje je povezano z napredovanjem raka v skoraj vseh primerih trdnih malignih obolenj, poleg tega pa je vnetje lahko tudi vzrok za sam nastanek raka. Tako nastali tumorji prispevajo okoli 15–20 % smrti, povezanih z rakom, med katerimi sta najpogostejša rak želodca po okužbi s *Helicobacter pylori* in rak debelega črevesa po kronični vnetni črevesni bolezni (Shalapour and Karin, 2015). V primeru raka debelega črevesa, ki se razvije po izgubi tumorskih zaviralcev APC in p53 ter aktivaciji onkogenov β -katenina in K-Ras, kronična vnetna črevesna bolezen v manjši meri spodbuja nastanek mutacij preko povišanih nivojev reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti. Druga posledica kronične vnetne črevesne bolezni, ki se je izkazala za še pomembnejšo v povezavi z rakom, pa je aktivacija vnetnih prepisovalnih dejavnikov NF κ B in STAT3, ki v epitelijskih celicah sprožijo mehanizme za preživetje in povišajo nivoje citokinov, udeleženih pri spodbujanju celične rasti, kar vodi do razvoja raka (Shaked in sod., 2012). Vnetje igra ključno vlogo tudi v primeru raka debelega črevesja, ki ni induciran preko kronične vnetne črevesne bolezni, vendar je za njegov nastanek ponovno ključno vnetje. V tem primeru pride po izgubi tumorskega zaviralca APC do razrahljanja črevesne pregrade, ki vodi do vdora komenzalnih bakterij v črevesne kripte in aktivacije makrofagov preko Tollu podobnih receptorjev (Grivennikov in sod., 2012). Sledi izločanje vnetnih citokinov in aktivacija prepisovalnega dejavnika STAT3 in razvoja raka. Podobna vzročna povezava med vnetjem in razvojem raka je znana tudi pri vnetju po okužbi z nekaterimi virusi (npr. virus hepatitisa B ali C, virus Rousovega sarkoma), pri sistemskem vnetju zaradi debelosti, pri nekaterih genetskih vnetnih boleznih (dedni pankreatitis) ter pri sterilnem vnetju zaradi mehanske (npr. dolgotrajna uporaba urinarnega katetra), kemične (azbestoza) ali sevalne poškodbe (Trinchieri, 2012).

1.1.1.2 Vnetne bolezni sklepov

Med vnetne bolezni sklepov ali vnetne artritise prištevamo vsa obolenja, ki prizadenejo komponente kosti ali hrustanca v sklepih in pri katerih je vnetje vzrok ali ključna komponenta pri napredovanju bolezni. Glavni posledici sta bolečina in postopna zmanjšana aktivnost sklepov zaradi degeneracije, pogosto pa ima bolezen tudi sistemske posledice na celoten organizem. Artritis v razvitem svetu prizadene okoli 20 % prebivalstva, od katerih jih ima okoli 10 % zaradi bolezni omejitve pri gibanju. Najpogostejše oblike so protin oz. putika ter avtoimunske bolezni revmatoidni artritis, psoriatični artritis in ankilozirajoči spondilitis (Klippel in sod., 2008).

Med njimi je protin najbolj obvladljiva bolezen, saj je ozdravljiva s kombinacijo protivnetnih zdravil in zniževanjem serumskega urata, ki je vzrok bolezni. Hiperurikemija je največkrat posledica preseženega vnosa purinskih prekurzorjev urata v telo pri uživanju hrane ali pa okvar v izločanju urata v ledvicah, kar je najpogostejše genetsko pogojeno (Choi in sod., 2005; Neogi, 2011). Urat v sklepih prstov nog kristalizira, kar aktivira monocite, ki kristale fagocitirajo. Pri tem se sproži imunska reakcija primarno preko izločanja interleukina-8, ki privlači nevtrofilce, pa tudi TNF- α , interleukina-1b, interleukina-6 in COX-2 ter proangiogenih dejavnikov, ki stimulirajo endotelijske celice za invazijo nevtrofilcev. Pomembno vlogo pri indukciji vnetja imajo tudi sinovialni fibroblasti

ter mastociti, ki izločajo histamin in druge vnetne dejavnike. Pri protinu lahko pride do spontane razrešitve akutnega vnetja preko apoptoze infiltrirajočih nevtrofilcev in njihove odstranitve s strani fagocitov. Aktivirani makrofagi fagocitirajo kristale urata in pri tem izločajo lipoksine, TGF- β in antagoniste receptorja interleukina-1, ki zavirajo delovanje levkocitov in endotelijskih celic. V primeru hujše oblike bolezni lahko ob pomanjkanju zdravljenja bolezen preide v kronično obliko, ki vodi do erozije hrustanca in kosti. V tej fazi imajo ključno vlogo metaloproteaze matriksa, ki jih izločajo hondrociti po fagocitozi kristalov urata (Liu in sod., 2004).

Vse tri avtoimunske vnetne bolezni sklepov imajo nekatere skupne lastnosti, kot je visoka genetska pogojenost (npr. specifični aleli genov HLA) in sorodne tarče avtoimunosti, so pa med njimi tudi pomembne razlike. Bolniki za revmatoidnim artritisom imajo zelo pogosto prisotno aminokislinsko zaporedje Glu-Lys-Arg-Ala-Ala na proteinu HLA-DR, kar lahko vodi do povišane vezave MHC molekul na artritogene peptide, do povišane selekcije avtoimunih T limfocitov ali do znižane aktivnosti T celic zaviralk. Na incidenco revmatoidnega artritisa vpliva tudi spol, saj lahko povišana vrednost estrogena pri ženskah vpliva na pridobljeni imunski odziv. Pomembni pa so tudi ostali dejavniki, kot je kajenje, ki zvišuje količine citruliniranih peptidov, udeleženih pri avtoimunski reakciji, ter okužbe s patogeni, ki lahko dodatno stimulirajo imunski odziv (Klippel in sod., 2008). Ta je pri revmatoidnem artritisu sestavljen iz T celične avtoimunosti in proizvodnje avtoprotiteles, med katerimi so najpomembnejša protitelesa proti Fc delu imunoglobulinov, ki jih imenujemo revmatoidni faktor, ter proti citruliniranim peptidom in kolagenu tipa II (McInnes and Schett, 2011). Vnetje se najpogosteje in najprej pojavi v zapestjih in sklepih prstov, kasneje pa tudi v ostalih sklepih okončin. Na molekularnem nivoju je pri tem ključna proizvodnja vnetnih interleukinov, TNF- α , GM-CSF in kemokinov ter proangiogenih dejavnikov s strani sinovialnih makrofagov in fibroblastov. TNF- α ima ključen vpliv, saj stimulira izločanje številnih ostalih citokinov, proteaz (metaloproteaz matriksa in cisteinskih katepsinov), zniža sintezo proteoglikanov in sodeluje pri diferenciaciji osteoklastov (Caglic in sod., 2013; Hou in sod., 2002; Moelants in sod., 2013). Temu sledi degeneracija sklepov zaradi razgradnje hrustanca s strani aktiviranih sinovialnih fibroblastov tipa B, hondrocitov, nevtrofilcev in makrofagov. Ključne so metaloproteaze matriksa, tripsin, kimotripsin in cisteinski katepsini, ki razgrajujejo kolagen tipa 2 ter proteoglikane. Sledi tudi erozija kosti, ki jo vodijo osteoklasti po aktivaciji z vnetnim dejavnikom RANKL (Hashimoto in sod., 2001; Hou in sod., 2001; Pozgan in sod., 2010).

Pri psoriatičnem artritisu se v okviru napredne luskavice (psoriaze) pojavi izolirano vnetje končnih sklepov prstov rok ali posameznih večjih sklepov, lahko pa pride tudi do poliartritisa in spondilitisa (vnetje vretenc). Genetske predispozicije vključujejo prisotnost nekaterih alelov genov HLA, genov za receptorje naravnih celic ubijalk KIR, interleukina-1 in TNF- α , kar podobno kot v primeru revmatoidnega artritisa vodi do T celične avtoimunosti. Bolezen sprožijo okoljski dejavniki, kot je poškodba ali okužba na koži, kjer pride do aktivacije T limfocitov in sledečega vdora monocitov. Monociti izločajo številne vnetne dejavnike, med katerimi je najpomembnejši TNF- α . Aktivirani monociti in T limfociti nato migrirajo v sklepe, kjer sledi indukcija lokalnega vnetja in degeneracije sklepov na zelo podoben način kot v primeru revmatoidnega artritisa (Cantini in sod., 2010; Ritchlin in sod., 2003).

Ankilozirajoči spondilitis se simptomatsko precej razlikuje od ostalih dveh avtoimunskih bolezni, saj primarno prizadene vretence, v nekaterih primerih pa tudi kolke. Za razliko od ostalih vnetnih bolezni sklepov je pri ankilozirajočem spondilitisu prisotna ne le degeneracija, pač pa tudi novotvorba vretenčnih teles, kar je posledica povišanja dejavnika kostnega morfogenega proteina. Novonastala kost ni funkcionalna, kar vodi do karakteristične zatrditve sklepov (Klippel in sod., 2008).

Poseben sklop bolezni pri otrocih označujemo s terminom juvenilni idiopatski artritis, ki ima podobne vzroke in patogenezo kot bolezni pri odraslih. Pomemben in potencialno

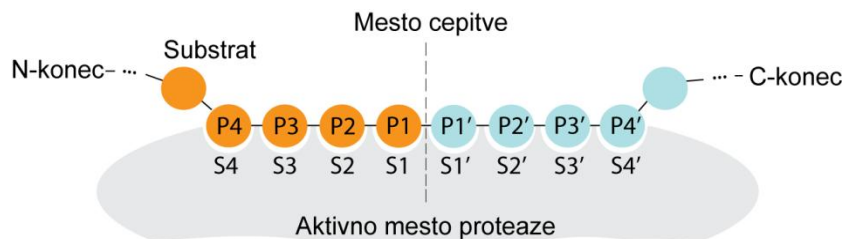
življenjsko nevaren je tudi septični artritis, ki je posledica bakterijske okužbe sklepov, kar se v večini primerov zgodi po primarni okužbi, npr. pljučnici, okužbi ledvic ali kože. Najpogostejša je okužba z Gram-pozitivnimi koki, kot je *Staphylococcus aureus*, povišana pa je verjetnost po operacijah menjave sklepov z umetnimi. Vnetje sklepov je pogosto pridruženo tudi nekaterim sistemskim obolenjem, kot so lupus eritematozus, Sjogrenov sindrom, vnetna črevesna bolezen in mikrobne infekcije, kot je borelioza (Klippel in sod., 2008).

Sorodna bolezen vnetnim boleznim sklepov je tudi osteoartritis, ki je primarno degenerativna in ne vnetna bolezen. Bolezen prizadene podobne sklepe kot revmatoidni artritis in ima nekatere ostale podobnosti s to avtoimunsko boleznijo, se pa od nje tudi pomembno razlikuje. Ključna makroskopska razlika je v hipertrofični naravi osteoartritisa, ki se odraža v povišani kostni gostoti in tvorbi kosti okoli sklepov. To je v nasprotju z atrofičnim revmatoidnim artritisom, ki vodi do erozivnih in osteoporotičnih sprememb v okolici prizadetega hrustanca. Degeneracija sklepnega hrustanca pri osteoartritisu je posledica porušenega ravnotežja med razgradnjo in proizvodnjo hrustanca s strani hondrocitov (Burr and Gallant, 2012; Kapoor in sod., 2011). Vnetni dejavniki, kot so citokini, prostaglandini in reaktivne kisikove zvrsti, imajo pomembno vlogo predvsem pri vzdrževanju proizvodnje proteaz, med katerimi so najpomembnejše metaloproteaze matriksa ter cisteinski katepsini, zelo velik pomen pa imajo tudi mehanske poškodbe sklepov, ki lahko sprožijo degeneracijo hrustanca (Dejica in sod., 2012; Li in sod., 2011).

1.2 Proteaze

Proteaze ali proteinaze so hidrolitični encimi, ki katalizirajo ireverzibilno razgradnjo peptidne vezi v peptidih in proteinih, s čimer sodelujejo tako pri splošnem proteinskem katabolizmu kot tudi pri molekularni signalizaciji. V človeškem genomu je okoli 560 genov za proteaze. Glede na katalitski mehanizem jih razdelimo med cisteinske, serinske, metalo, treoninske, glutamatne in aspartatne proteaze ter proteaze z mešanim katalitskim mehanizmom in proteaze z neznanim katalitskim mehanizmom. Glede na mesto cepitve proteina nadalje razdelimo proteaze med endopeptidaze, ki cepijo znotraj peptidne verige, ter aminopeptidaze in karboksipeptidaze, ki cepijo proteine na proteinskih koncih. Po specifičnosti ločimo visoko-specifične proteaze, ki cepijo samo za določenimi aminokislinskimi ostanki (npr. kaspaze, ki cepijo le za Asp), in široko-specifične proteaze, ki lahko cepijo peptidno vez za številnimi aminokislinskimi ostanki (npr. proteasom ali katepsini) (López-Otín and Bond, 2008; Turk, 2006; Turk in sod., 2012a).

Specifičnost proteaz je pogojena s tridimenzionalno zgradbo aktivnega mesta, ki ga shematsko označimo z nomenklatur po Schechter in Bergerju (Slika 1). Vsak substratov aminokislinski ostanek okoli cepljene peptidne vezi, označen s črko P, se veže z določenim strukturnim delom proteaze, ki ga označimo s črko S (Schechter and Berger, 1967). Na možnost vezave substrata v aktivno mesto v največji meri vplivajo sterične ovire in naboj na mestih S, čeprav imajo lahko vpliv tudi oddaljena mesta (angl. exosites).



Slika 1: Shematski prikaz nomenklature po Schechterju in Bergerju (Schechter and Berger, 1967). Aminokisline substrata okoli cepitvenega mesta označimo s P1, P2, itd. (v smeri od cepitvenega mesta proti N-koncu substrata) in P1', P2', itd. (v smeri od cepitvenega mesta proti C-koncu substrata). Vezavna mesta za te aminokisline v aktivnem mestu proteaze pa označimo z ustreznimi S oznakami.

Proteaze so tako kot ostali proteini podvržene regulaciji na nivoju transkripcije, translacije in kompartmentalizacije, poleg tega pa je njihova encimska aktivnost uravnavana na več nivojih. Večina proteaz je sintetiziranih v obliki proencimov, ki vsebujejo dodaten strukturni element, imenovan propeptid. Ta se veže v aktivno mesto in prepreči aktivnost proteaze, dokler ne pride do cepitve in disociacije propeptida, kar lahko katalizira druga proteaza ali pa cepitev poteka avtokatalitično. Dodatni mehanizmi aktivacije nekaterih proteaz vključujejo alosterično ali konformacijsko aktivacijo aktivnega mesta ali aktivacijo z vezavo kofaktorjev (Turk in sod., 2012a). Aktivnost proteaz je nadalje uravnavana z endogenimi proteinskimi inhibitorji, ki jih je po številu bistveno manj kot proteaz. Večina inhibitorjev je selektivna za določeno katalitsko družino proteaz, znotraj družine pa je selektivnost inhibitorjev v številnih primerih zelo široka (Fortelny in sod., 2014; Mason and Joyce, 2011).

Proteaze predstavljajo pomembno skupino encimov v vnetnih okoljih, njihovo izražanje in aktivnost pa sta pogosto povišani v primerjavi s fiziološkim stanjem. Med takšne spadajo številne metaloproteaze, nekatere serinske proteaze, kot je nevtrofilna elastaza, ter katepsini (Deu in sod., 2012; Turk, 2006).

1.2.1 Cisteinski katepsini

V skupino cisteinskih katepsinov spadajo endopeptidaze katepsin F, K, L, S in V, aminopeptidazi katepsin C in H, karboksipeptidazi katepsin B in X ter katepsina W in O z neznano specifičnostjo. Katepsina B in H v določenih primerih izkazujejo tudi endopeptidazno aktivnost. Vsi encimi so papainu podobne proteaze z zelo ohranjeno tridimenzionalno strukturo. Z izjemo tetramernega katepsina C so vsi ostali katepsini monomeri z molekularno maso med 20 in 40 kDa. Sestavljeni so iz leve (L) in desne (R) domene, med katerima se razteza aktivno mesto. L-domeno gradijo tri alfa vijačnice, R-domena pa je beta sodček z dodatno alfa vijačnico na dnu. Vsaka domena prispeva po en katalitični aminokislinski ostanek (Cys, His) na sredini aktivnega mesta, ki se razprostira ob stičišču obeh domen (Turk in sod., 1998). Tiolat-imidazolni par v aktivnem mestu je zelo močan nukleofil, ki pri vseh cisteinskih proteazah katalizira razpad peptidne vezi. Aminopeptidaze in karboksipeptidaze imajo dodatne strukturne elemente v okolici aktivnega mesta, ki sterično onemogočijo vezavo v maniri endopeptidaz in vsebujejo ustrezno nabite aminokislinske ostanke, ki prispevajo k vezaviaminske oziroma karboksilne skupine na koncih proteinskih substratov. Substratna specifičnost katepsinov je zelo široka, kar se sklada s primarno vlogo katepsinov kot ključnih katabolnih proteaz v lizosomih (Vizovisek in sod., 2015). Iz strukturnega vidika je to posledica slabo definiranih vezavnih mest v aktivnem mestu. Izjema je globok vezavni žep S2, v katerega se prednostno vežejo hidrofobne aminokisline in ki deloma določa tudi razlike v substratni specifičnosti med katepsini. Za vezavno mesto S1 je pri katepsinih značilno, da ne vežejo Pro (Turk in sod., 2012b).

Katepsini so sintetizirani kot preproencimi s signalnim peptidom za sekretorno pot in z N-končnim propeptidom, ki se veže vzdolž aktivnega mesta in preprečuje vezavo substratov. Propeptid je poleg tega nujno potreben za ustrezno zvitje katepsinov ter za pravilno znotrajcelično lokalizacijo (Tao in sod., 1994; Wiederanders in sod., 2003). Po translaciji so glikozilirani, zaradi česar se vežejo na manoza-6-fosfatne receptorje, ki usmerijo njihovo lokalizacijo v endolizosomalni sistem. Proencimi so stabilni pri nevtralnem pH, medtem ko se interakcija med propeptidom in katepsini razrahlja v kislem pH, kar je povod za proteolitsko cepitev in posledično disociacijo propeptida. Cepitev lahko izvede katera druga endolizosomalna proteaza ali pa *in trans* druga molekula enake proteaze (Pungercar in sod., 2009). Zreli katepsini so z izjemo katepsina S stabilni le v kislem pH in so podvrženi ireverzibilni denaturaciji v nevtralnem, kar je posledica izgube urejene strukture zaradi deprotonacije His v aktivnem mestu (Turk in sod., 1994). Kljub temu je iz številnih primerov razvidno, da katepsini lahko tudi po premestitvi zunajlizosomalne celične predele z nevtralnim pH ohranijo aktivnost dovolj časa, da vplivajo na procese v citoplazmi, jedru in zunajceličnini (Fonović in Turk, 2014).

Aktivnost cisteinskih katepsinov je regulirana tudi s strani endogenih proteinskih inhibitorjev iz družin cistatinov, tiropinov in serpinov. Najpomembnejši so cistatini tipa 1, kamor spadata znotrajcelična stefin A in B, ter cistatini tipa 2, kamor spadajo zunajcelični cistatini C, S, SA, SN, D, E/M in F. Cistatini so direktni kompetitivni inhibitorji, ki inhibirajo aktivnost katepsinov z nanomolarno ali pikomolarno konstanto inhibicije. Izjema so nekatere interakcije s karboksipeptidazami ali aminopeptidazami, kjer so afinitete bistveno šibkejše. Na aktivnost katepsinov vplivajo tudi glikozaminoglikani, ki povečajo stabilnost in stimulirajo aktivacijo prokatepsinov (Caglic in sod., 2007; Turk in sod., 2012b).

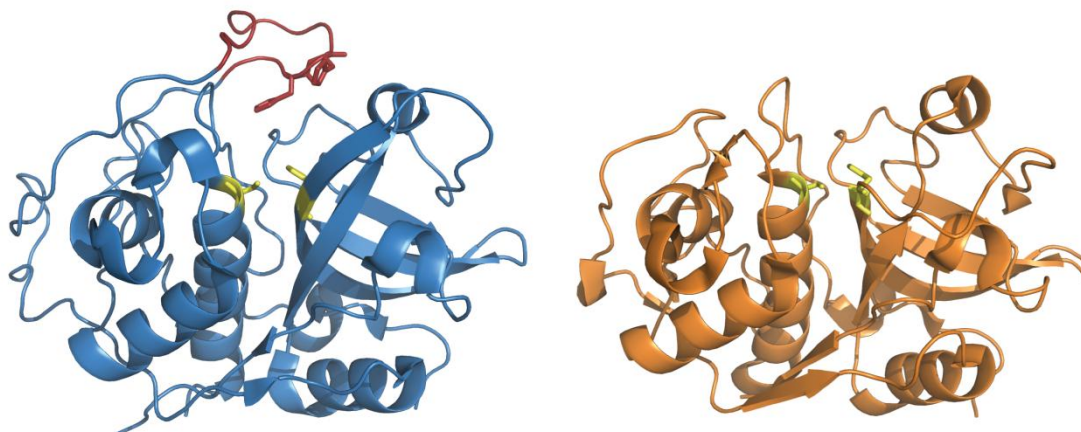
Katepsini B, C, H in L so prisotni v večini celic in tkiv, medtem ko je izražanje ostalih katepsinov omejeno pretežno na celice imunskega sistema. Katepsin K izražajo predvsem osteoklasti, kjer pomembno vpliva na proces kostne resorpcije. Katepsin W, znan tudi kot limfopain, izražajo T celice ubijalke in naravne celice ubijalke, medtem ko je izražanje katepsina S omejeno na profesionalne antigen-predstavitvene celice. Katepsin V, ki ima visoko homologijo s katepsinom L, je izražen le v celicah timusa in testisov (Unanue in sod., 2016).

V preteklih letih je bilo pokazano, da katepsini poleg ključne vloge v splošni lizosomalni razgradnji proteinov pomembno sodelujejo tudi pri procesih regulacije imunskega odziva, programirani celični smrti, procesiranju hormonov in razgradnji zunajceličnega matriksa ter celičnih adhezijskih molekul, s čimer prispevajo k patogenezi številnih obolenj (Turk, 2006; Vasiljeva in sod., 2007). Slednje potrjujejo raziskave o nivojih količin katepsinov v kliničnih vzorcih pacientov z različnimi oblikami raka ali artritisa, pa tudi živalski modeli teh bolezni, kjer sta izbitje genov za posamezne katepsine ali farmakološka inhibicija katepsinov pomembno vplivali na razvoj bolezni (Kos and Lah, 1998; Reinheckel in sod., 2012). Posebej dobro je raziskana vloga katepsina K v osteoporozi, kjer s kolagenolitično aktivnostjo pomembno prispeva k razgradnji kostnine in je atraktivna tarča za zdravljenje te bolezni (Bromme in sod., 2016). Na področju vnetja se izražanje in aktivnost katepsinov poveča predvsem v infiltrirajočih imunskih celicah, pa tudi v fibroblastih in endotelijskih celicah ter tumorskih celicah v primeru raka (Caglic in sod., 2013; Schurigt in sod., 2005; Verdoes in sod., 2012). Pomembna je tudi spremenjena lokalizacija, saj so bili katepsini v vnetnih okoljih najdeni tudi na površini celic ter v zunajceličnem matriksu (Cavallo-Medved in sod., 2003; Kwok in sod., 2011; Yan in sod., 2016), kar razširja spekter potencialnih substratov in vezavnih partnerjev in s tem poti, preko katerih so udeleženi pri patogenezi.

1.2.1.1 Biokemijske posebnosti katepsinov B in S

Katepsin B je edini od katepsinov z dipeptidil karboksipeptidazno aktivnostjo. To je posledica dodatne strukturne komponente na koncu aktivnega mesta, t. i. zaporne zanke, ki služi kot sidro za C-končni aminokislinski ostanek proteinskega substrata. Vsebuje namreč dva His aminokislinska preostanka, ki prispevata pozitivni naboj z negativno nabito karboksilno skupino proteinskega termina (Slika 2). Zaporna zanka je v kislem pH povezana s preostalim delom katepsina B z elektrostatskimi interakcijami, ki se ošibijo v nevtralnem pH, kar vodi do endopeptidazne aktivnosti encima (Illy in sod., 1997; Podobnik in sod., 1997). Posebnost aktivnega mesta katepsina B je prisotnost negativno nabitega Glu245 v vezavnem žepu S2, zaradi česar katepsin B prednostno cepi substrate s pozitivno nabitim Arg na mestu P2. V primeru endopeptidazne aktivnosti je za katepsin B značilna prednostna cepitev substratov z Gly na mestu P3', kar je posledica steričnih ovir, ki jih predstavlja premaknjena zaporna zanka. Aktivacijo prokatepsina B pospešijo glikozaminoglikani, ki oslabijo interakcijo med propeptidom in zrelim katepsinom, kar vodi do encimske aktivnosti prokatepsina in posledične avtokatalitične aktivacije *in trans* (Caglic in sod., 2007). Katepsin B endogeni proteinski inhibitorji inhibirajo bistveno slabše kot katepsinske endopeptidaze. Izjema je cistatin C, ki inhibira katepsin B s konstanto inhibicije 0,27 nM, medtem ko so konstante inhibicije za ostale cistatine nad 1 nM ali pa inhibicije celo ni, kot v primeru cistatinov D in F (Turk in sod., 2012b). Med sintetičnimi inhibitorji je najpomembnejši epoksid CA074, ki je zelo selektiven za katepsin B. V poskusih s sesalskimi celicami se pogosto uporablja tudi manj selektivni derivat CA074-OMe, ki lahko prehaja celične membrane, ampak ta spojina inhibira tudi katepsin L (Montaser in sod., 2002).

Katepsin S je katepsinu L-podobna endopeptidaza, ki se od ostalih katepsinov pomembno razlikuje v stabilnosti pri nevtralnem pH. Primarna razlika v substratni specifičnosti je predvsem v vezavnem mestu S2, ki je v primeru katepsina S nekoliko širše kot v primeru sorodnih katepsinov L in K (Slika 2). Del S2 žepa namreč pri katepsinu S tvorita Gly137 in Gly165, medtem ko sta pri katepsinu L na teh mestih Ala in Gly in pri katepsinu K Ala in Ala (Lee-Dutra in sod., 2011; McGrath in sod., 1998). Proteomske raziskave so pokazale, da katepsin S v mesto S2 prednostno veže Lys, medtem ko katepsin K tolerira Pro in katepsin L aromatične aminokisliline, ki jih katepsin S ne veže. Razlika v primerjavi s katepsinoma L in K je tudi v vezavnem mestu S1, kjer katepsin S lahko veže Thr, in v vezavnem mestu S1', kjer lahko veže Ile (Vizovisek in sod., 2015). Avtokatalitično aktivacijo prokatepsina S lahko pospešijo glikozaminoglikani tako v kislem kot v nevtralnem pH, kar je možen mehanizem aktivacije ob izločanju v zunajceličnino (Vasiljeva in sod., 2005). Katepsin S inhibirajo cistatini s konstanto inhibicije v pikomolarnem območju, razviti pa so bili tudi številni selektivni sintetični inhibitorji. V biomedicinskih raziskavah sta poleg splošnega katepsinskega inhibitorja E64 in njegovih derivatov najpomembnejša inhibitorja Clk-60 in LHVS, ki sta selektivna za katepsin S (Turk in sod., 2012b).



Slika 2: Tridimenzionalna struktura Katepsinov B in S. Katepsin B (PDB ID: 1CSB) je prikazan na levi (modra), katepsin S (PDB ID: 1MS6) pa na desni (oranžna). V strukturah obeh encimov sta z rumeno označena Cys in His v aktivnem mestu. Pri katepsinu B je z rdečo označena zaporna zanka z dvema His, ki prispevata pozitivni naboj za sidranje C-konca substratov. Slika je bila pripravljena s programom PyMOL.

1.2.1.2 Vloga katepsinov B in S pri raku

Posebej dobro je raziskana vloga cisteinskih katepsinov pri raku. Tumorske celice, makrofagi, fibroblasti in endotelijske celice izločajo katepsine v tumorsko mikrookolje, kjer lahko katepsini razgrajujejo komponente zunajceličnine in s tem prispevajo k širjenju in zasevanju raka. Imajo pa katepsini različne in včasih celo nasprotujoče si vloge v različnih tipih raka, kot so pokazale številne raziskave na mišjih modelih z izbitimi geni. Najbolje sta raziskana primera modela raka trebušne slinavke RIP-Tag2 in raka mlečne žleze MMTV-PyMT. Pri obeh je izbris genov za katepsine B, H, L, S in X zaviral napredovanje raka, pri čemer je bil najpomembnejši doprinos katepsinov k znižanju celične smrti in povišanju celične proliferacije, spodbujanju rasti ožilja in nastanku zasevkov. Izjema je katepsin C, ki v teh dveh modelih nima protumorske vloge (Olson in Joyce, 2015; Reinheckel in sod., 2012). Drugačna pa je vloga katepsinov v modelu skvamoznega karcinoma kože K14-HPV16, kjer je izbris gena za katepsin L vodil do hitrejšega napredovanja raka, kar kaže na protitumorsko vlogo katepsina L v tem modelu (Dennmäker in sod., 2010). V modelu K14-HPV16 izbris gena za katepsin B ni vplival na karcinogenezo, medtem ko je izbris gena za katepsin C upočasnil napredovanje raka (Ruffell in sod., 2013). Ključni prispevek k razumevanju vloge katepsinov v raku so prinesle tudi študije na omenjenih modelih, kjer so izbili gene za dva ali več katepsinov. Te raziskave so razkrile kompleksno vlogo družine cisteinskih katepsinov, saj imajo katepsini pogosto nadomestljivo vlogo, kjer lahko en katepsin prevzame vlogo drugega, po drugi strani pa lahko en katepsin regulira aktivnost drugega (Akkari in sod., 2016; Gopinathan in sod., 2012). S terapevtskega stališča je najverjetneje najpomembnejša vloga katepsinov kot mediatorjev slabe učinkovitosti številnih ustaljenih oblik kemoterapije, kot je npr. terapija s paklitakselom, etoposidom ali doksorubicinom (Shree in sod., 2011). Tovrstne kemoterapije namreč stimulirajo tumorske makrofage do povišanega izražanja in izločanja katepsinov, kar vodi do znižanega učinka kemoterapije in celo povišanega potenciala za

zasevanje rakastih celic zaradi spodbujanja procesov, kot je limfangiogeneza (Alishekevitz in sod., 2016). Zaradi tega ima kombinatorna terapija raka s klasičnimi kemoterapevtiki in ciljano inhibicijo katepsinov velik potencial, posebej zaradi možnih ugodnih sekundarnih efektov inhibicije katepsinov. Številne oblike kemoterapije namreč vzbudijo vnetje in bolečine v prebavnem traktu, kar lahko zaviramo z inhibicijo katepsinov (Alamir in sod., 2010).

Potencialno vlogo katepsina B pri napredovanju različnih oblik raka so najprej pokazale številne raziskave o nivojih ekspresije in aktivnosti katepsina B v tumorskih biopsijah in serumu bolnikov (Kos in Lah, 1998; Lah in sod., 2000; Nouh in sod., 2011). Katepsin B je bil zato predlagan kot prognostični označevalec za paciente z rakom debelega črevesa, dojke, pljuč, glave in vratu ter za melanome in gliome. V trdnih tumorjih se povišane količine katepsina B nahajajo predvsem na invazivni fronti tumorja, kar nakazuje na njegovo vlogo pri invazivnosti v okoliško tkivo in zasevanju (Joyce in sod., 2004). Za katepsin B v rakastih celicah je značilno, da se nahaja tudi v membranskih kaveolah, kjer je lahko udeležen pri aktivaciji nekaterih drugih proteolitičnih encimov, kot so urokinazni aktivator plasminogena in metaloproteaze matriksa, ali razgradnji proteaznih inhibitorjev, kot sta TIMP-1 in TIMP-2 (Cavallo-Medved in sod., 2005; Guo in sod., 2002; Olson in Joyce, 2015). Poleg aktivacije teh kolagenolitičnih encimov lahko tudi sam katepsin B direktno sodeluje pri razgradnji zunajceličnega matriksa, tako v zunajceličnem oziroma membranskem predelu kot tudi po endocitozi delov zunajceličnega matriksa v lizosomih (Cavallo-Medved in sod., 2009; Mirković in sod., 2015). Z razgradnjo komponent zunajceličnine katepsin B ne prispeva le direktno k zvišanemu invazivnemu potencialu tumorskih celic, pač pa tudi k povišani rasti ožilja, saj se pri tem sproščajo rastni dejavniki, kot sta VEGF in TGF- β , ki sta predhodno povezana z zunajceličnim matriksom v neaktivni obliki (Guo in sod., 2002; Malla in sod., 2011; Vasiljeva in sod., 2006). Katepsin B je udeležen tudi pri znotrajcelični signalizaciji celične smrti, saj lahko inaktivira proapoptotske dejavnike, kot so Bak, Mcl-1 in XIAP ter aktivira Bid (Droga-Mazovec in sod., 2008).

Poleg zgoraj opisanega negativnega prispevka katepsinov iz tumorskih makrofagov ob klasičnih oblikah kemoterapije ima katepsin B še specifično vlogo v mijeloidnih celicah zaviralkah po kemoterapiji s 5-fluorouracilom ali gemcitabinom. V teh primerih pride do puščanja lizosomalne membrane, zaradi česar se katepsin B prenese v citosol. Tam je katepsin B udeležen pri aktivaciji NLRP3 inflammasoma, čeprav ni povsem jasno, ali je pri tem pomembna proteolitična aktivnost katepsina B ali le vezava na domeno levčinskih ponovitev na NLRP3. Inflammasom je pomembna večproteinska platforma za aktivacijo kaspaze-1, ki procesira prointerlevkin-1 β v aktivno obliko. Izločani interlevkin-1 β spodbudi proizvodnjo interlevkina-17 v CD4+ T limfocitih, kar vodi do povišane rasti ožilja in posledičnega relapsa tumorja po kemoterapiji (Bruchard in sod., 2013).

Glavni vir katepsina S v tumorjih so tumorski makrofagi, kjer pride do povišanega izražanja in izločanja po vzbujanju s citokini interlevkin-4, interlevkin-6 in interlevkin-10 (Gocheva in sod., 2010; Yan in sod., 2016). Poleg tega se izražanje katepsina S poviša tudi v številnih transformiranih rakastih celicah. Razlog za to je najverjetneje v lokaciji gena za katepsin S na genomu, saj se ta nahaja na enakem lokusu na kromosomu 1 kot gen za antiapoptotski protein Mcl-2 (Beroukhim in sod., 2010). Ta lokus je v številnih oblikah raka pomnožen, kar je mehanizem rakastih celic za povišano izražanje Mcl-2 za izognitev celični smrti (Beroukhim 2010). Katepsin S ima pomembno vlogo zlasti pri regulaciji rasti ožilja tumorjev, na kar so kazale že raziskave o celjenju ran v odsotnosti gena za katepsin S v mišjih modelih (Shi in sod., 2003). Katepsin S podobno kot katepsin B sodeluje pri razgradnji proteinskih komponent zunajceličnine, ob tem pa inaktivira zaviralce angiogeneze, kot sta laminin-5 in endostatin, ter sprošča proangiogene dejavnike, kot je γ -2 peptid (Veillard in sod., 2011; Wang in sod., 2006). Tudi v tumorjih je izbris gena za katepsin S vodil do znižane tvorbe ožilja, poleg tega pa tudi do znižane rasti tumorjev (Gocheva in sod., 2006; Wilkinson in sod., 2015). Katepsin S prispeva tudi k invazivnosti

rakastih celic preko cepitve ektodomen transmembranskih receptorjev in celičnih adhezijskih proteinov, kot so EGFR, ALCAM, CD44 in semaforinski receptorji (Sobotic in sod., 2015). S tem na eni strani lahko vpliva na znotrajcelične signalizacijske poti, kar lahko vodi do povišane migracije ali angiogeneze, po drugi strani pa neposredno vpliva na povišano migracijo in invazivnost zaradi zrahljanja celičnih stikov. Katepsin S ima tudi pomembno vlogo pri zasevanju rakastih celic v možgane, saj cepi adhezijski protein JAM-B na krvno-možganski pregradi, s čimer prispeva k ekstrasvazaciji rakastih celic preko te pregrade in nastanku zasevkov (Sevenich in sod., 2014).

Podobno kot katepsin B ima tudi katepsin S nekatere specifične vloge pri odzivu na ustaljene protitumorske terapije. Zaradi prisotnosti odzivnega elementa za interferon (angl. interferon-stimulated response element, ISRE) v promotorju gena za katepsin S je izražanje katepsina S povišano ob stimulaciji z interferonom- γ . Ta je pogosto povišan ob kemoterapiji ali terapiji z obsevanjem, zaradi česar se poviša izražanje katepsina S in posledično oslabi zaviranje raka (Seo in sod., 2009).

1.2.1.3 Vloga katepsinov B in S v vnetnih boleznih sklepov

Endolizosomalni katepsini imajo ključno vlogo pri patogenezi številnih avtoimunskih vnetnih obolenj, saj sodelujejo pri nastanku antigenskih peptidov za predstavitev na MHC II. Prav tako so udeleženi pri razgradnji šaperonskega proteina, imenovanega invariantna veriga, ki je povezan v kompleks z MHC II in preprečuje predčasno vezavo antigenskih peptidov (Unanue in sod., 2016). Razgradnja invariantne verige je ključna za uspešno antigensko predstavitev, pri tem pa je katepsin S proteaza, ki je v profesionalnih antigen-predstavitvenih celicah nujno potrebna za zadnji korak razgradnje. Med takšnimi avtoimunskimi boleznimi so tudi revmatoidni artritis, Sjögrenov sindrom ter psoriza, ki lahko vodi do psoriatičnega artritisa (Nakagawa in sod., 1999; Saegusa in sod., 2002; Schönefuss in sod., 2010).

Po nastanku avtoimunskega obolenja in povezanega vnetja katepsini pomembno sodelujejo tudi pri degenerativnih spremembah, ki so posledice vnetnih boleznih sklepov, kot sta revmatoidni artritis in protin, pa tudi ostalih degenerativnih boleznih sklepov, kot sta osteoartritis in osteoporoza. V tem kontekstu so najpomembnejše molekularne tarče katepsinov komponente zunajceličnine, ki tvorijo hrustanec in kosti (Dejica in sod., 2012; Fonović in Turk, 2014). Vir katepsinov B in S so hondrociti in sinovialni fibroblasti, ki jih aktivirajo vnetni citokini (Caglic in sod., 2013; Mandelin in sod., 2005). Poleg teh dveh katepsinov ima predvsem katepsin K, ki ga izločajo aktivirani osteoklasti, ključno vlogo v številnih degenerativnih obolenjih sklepov (Bromme in sod., 2016).

Katepsin S je prav tako pomembno udeležen pri prenosu signala za nevropatsko bolečino, ki je pomemben del vnetnih boleznih sklepov in posebej težavna posledica za bolnike. Katepsin S je namreč udeležen pri cepitvi kemokina fraktalkin iz površine nevronov v centralnem živčnem sistemu, kjer nato cepljena oblika tega kemokina sodeluje pri stimulaciji celic mikroglije in prenosu signala za nevropatsko bolečino, kar vodi do hiperalgezije in alodiniije (Clark in sod., 2012; Clark in sod., 2007).

V številnih živalskih modelih in v biopsijah pacientov je bila pokazana povišana količina katepsinov B in S (Ikeda in sod., 2000; Pozgan in sod., 2010), pri čemer je povišana aktivnost katepsina B v serumu in sinovialni tekočini povezana s stadijem osteoartroze in protina, medtem ko aktivnost katepsina S korelira s stopnjo revmatoidnega artritisa (Ben-Aderet in sod., 2015; Chu in sod., 2010).

1.3 Molekularne diagnostične tehnike Klasične imunohistokemijske metode preverjanja količin biooznačevalcev (angl. biomarkers) v serumu ali biopsijah prizadetih tkiv predstavljajo dodatno breme za paciente, zato se je v preteklih letih začel intenziven razvoj novih neinvazivnih in minimalno invazivnih tehnik diagnostičnega slikanja. Posebno vlogo imajo molekularne diagnostične tehnike, ki temeljijo na spremljanju lokalizacije in količine raznolikih bioloških molekul, ki so diferencialno izražene na področju obolenja in omogočajo detekcijo s kemijskimi ali biološkimi sondami. Tovrstne metode imajo zaradi natančnosti posebno vrednost v okviru personalizirane in stratificirane medicine, kjer so lahko uporabljene za boljše določanje tipa terapije pri posameznikih in merjenje odziva na terapije (Garland in sod., 2016).

Razvoj je posebej dejaven na področju diagnostike raka, kjer številne molekularne tarče, ki so prekomerno izražene v rakastih celicah, predstavljajo možnosti za načrtovanje selektivnih diagnostičnih orodij. Podobno je v primeru vnetnih bolezni sklepov, kjer so molekule povezane s kroničnim vnetjem možne diagnostične tarče (de Jong in sod., 2014; Hilderbrand in Weissleder, 2010).

1.3.1 Afinitetne sonde

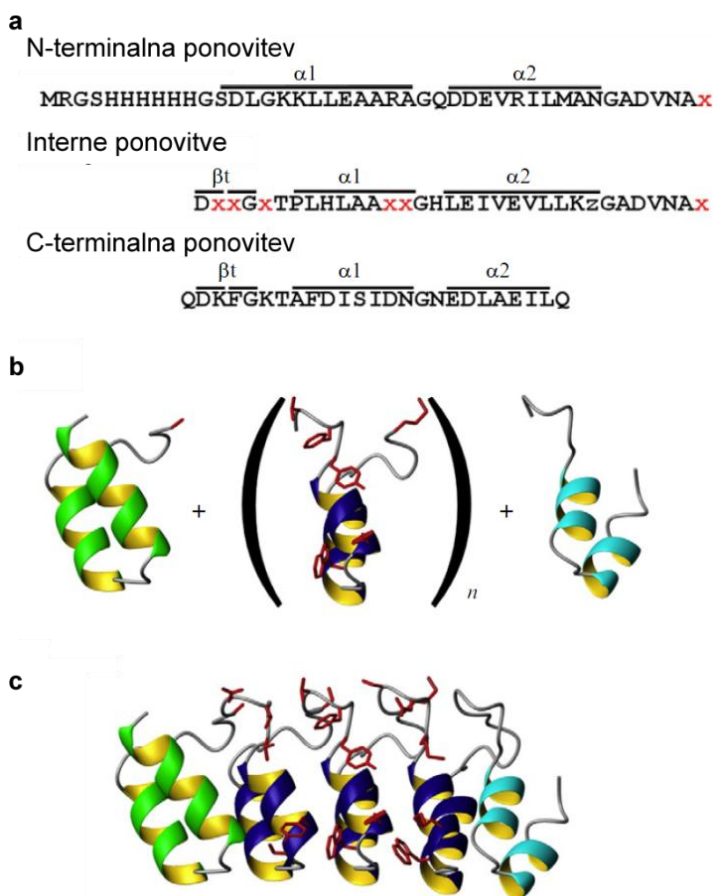
Pomembna skupina sond temelji na visokoafinitetnih ligandih, ki so označeni s fluorescentnimi ali drugimi reporterji (Slika 4). Sem prištevamo označene ligande membranskih receptorjev, kot sta transferin ali folat, ter makromolekularne vezavne reagente, kot so protitelesa, peptidni in DNA aptameri ter alternativni vezavni proteini (npr. DARPin in Affibody) (Boersma in Pluckthun, 2011; Garland in sod., 2016). Imenujemo jih afinitetne sonde, ker se po sistemskem vnosu v krvni obtok z visoko afiniteto vežejo na tarčni protein biooznačevalec, presežne količine se izločijo preko izločil in vezavo sonde lahko kvantitativno ovrednotimo.

Glavna prednost afinitetnih sond je v široki izbiri tarčnih proteinov biooznačevalcev, saj ni potrebe po encimatski pretvorbi kot v primeru aktivnostnih ali substratnih sond, opisanih spodaj. Prednost je tudi v veliki možnosti izbire načina detekcije, saj lahko isti ligand pogosto označimo s fluorescentnim barvilom za optično slikanje, z radioaktivnim izotopom za slikanje s pozitronsko izsevno tomografijo (PET) ali enofotonsko izsevno računalniško tomografijo (SPECT) ali z magnetnoresonančnimi kontrastnimi sredstvi (Louie, 2010; Willmann in sod., 2008). Najpogostejše tarče za ta pristop so rastni faktorji in njihovi receptorji, citokini, celične adhezijske molekule in površinski označevalci pripadnosti limfocitov.

1.3.1.1 DARPini

Predvsem na področju alternativnih vezavnih proteinov, kot so DARPini, so v zadnjem desetletju potekale intenzivne raziskave o ustreznosti tovrstnih reagentov za medicinske aplikacije (Slika 3) (Pluckthun, 2015). Priprava alternativnih vezavnih proteinov temelji na obsežnih DNA knjižnicah, iz katerih z metodami ribosomalne ali fagne predstavitve izberemo selektivne vezavne proteine proti določenemu epitopu na tarči, s čimer se izognemo potrebi po imunizaciji živali in lahko izbiramo tudi vezavne proteine proti tridimenzionalnim epitopom, ki v živalskem serumu niso obstojni ali pa so toksični (Binz in sod., 2004; Binz in sod., 2003). Ena ključnih lastnosti DARPinov je njihova izjemna stabilnost, ki je ključna za učinkovito uporabo *in vivo* ter za potencialne zahtevne kemijske pretvorbe. Ta stabilnost izhaja iz strukture DARPinov, ki so sestavljeni iz štirih ali petih ankirinskih ponovitev, pogostih strukturnih motivov v naravnih adaptorskih proteinih. Vsaka ponovitev (razen N-končne in C-končne, ki sta delno modificirani) sestoji iz β -zavoja in dveh antiparalelnih α -vijačnic, celoten protein pa tvori desnosučno solenoidno strukturo s kompaktnim hidrofobnim jedrom in obsežno interakcijsko površino (Merz in sod., 2008). Vsi DARPini v selekcijskih knjižnicah imajo enako aminokislinsko zaporedje z

izjemo nekaterih randomiziranih mest, ki se nahajajo pretežno na topilu izpostavljenih zankah. Posledica je ohranitev stabilnosti v vseh članih knjižnice, hkrati pa širok spekter možnosti za interakcije s tarčami zaradi raznolikosti, ki jo vnesejo različne kombinacije aminokislin na randomiziranih mestih. To je v preteklosti omogočilo izbiro vezavnih proteinov proti raznolikim tarčam, kot so zunajcelični rastni faktorji (VEGF), membranski receptorji (HER2) in celične adhezijske molekule (EpCAM), pa tudi citoplazemskim encimom, kot so kinaze (ERK, JNK) in proteaze (kaspaze). DARPini se lahko na tarčo vežejo na mesto, ki ne spremeni funkcije receptorja ali encima, ali pa služijo kot inhibitorji/antagonisti oziroma agonisti (Pluckthun, 2015; Tamaskovic in sod., 2012).



Slika 3: Shematski prikaz strukture DARPinov. a) Primarna struktura originalne knjižnice DARPinov. DARPini so sestavljeni iz N-terminalne ponovitve, internih ponovitev in C-terminalne ponovitve. Z x in z so označena randomizirana mesta, ki jih lahko zavzamejo različne aminokisline. b) Shematski prikaz sestave DARPinov. Vsi DARPini vsebujejo N- in C-terminalno ponovitev ter dve ali tri interne ponovitve. c) Tridimenzionalna struktura neselektivnega DARPina *E3_5*. Povzeto po (Tamaskovic in sod., 2012).

1.3.1.1.1 Diagnostične aplikacije DARPinov

Pomembna lastnost DARPinov je njihova relativno majna velikost (15–18 kDa), zaradi katere se po sistemski administraciji zelo hitro izločijo iz telesa, hkrati pa omogočajo

izvrstno prodiranje na mesto bolezni, predvsem v primeru razrahljanega ožilja v tumorjih. To je izvrstna karakteristika predvsem v diagnostičnem slikanju z radioizotopsko ali fluorescentno označenimi DARPini, saj v zelo kratkem času omogočijo dober kontrast med nespecifičnim ozadjem in specifičnim mestom vezave. Pri podrobni analizi diagnostičnega slikanja v modelu raka dojke z DARPinom, ki je selektiven za tumorski označevalec HER2, je bil pokazan vpliv visoke afinitete DARPina do tarče na uspešnost detekcije raka. DARPin s konstanto disociacije 90 pM se je namreč bistveno bolj zadržal v tumorju kot mutante z afinitetami v nanomolarnem območju, kar je omogočilo boljšo detekcijo bolezni (Zahnd in sod., 2010). Nadaljnje raziskave so pokazale tudi veliko raznolikost v detekciji ob uporabi različnih radioizotopov ter različnih načinov konjugacije radioizotopov na DARPine. Med drugim je zelo pomembna tudi N-terminalna heksahistidinska oznaka, ki lahko negativno vpliva na diagnostično slikanje zaradi povišanega zadrževanja DARPina v jetrih. Izboljšavo predstavlja sprememba v histidinsko-glutamatno oznako (His-Glu-His-Glu-His-Glu), ki vodi do znižanih jetrnih signalov, najverjetneje zaradi spremembe v naboju in hidrofobnosti na N-koncu DARPina in znižane asociacije s serumskimi proteini (Goldstein in sod., 2015). Selektivni DARPin za HER2 je bil testiran tudi v klasičnem diagnostičnem postopku za histokemijsko detekcijo tumorskega označevalca v biopsijah tkiv, kjer je izkazal podobno občutljivost in višjo selektivnost kot protitelesa, ki jih uporabljajo v kliniki (Zahnd in sod., 2007b).

1.3.1.1.2 Terapevtske aplikacije DARPinov

DARPini imajo tudi pomembno vrednost v terapevtskih aplikacijah, saj lahko podobno kot protitelesa učinkujejo kot zaviralci encimov, membranskih receptorjev ali rastnih dejavnikov. V predkliničnih raziskavah je bil pokazan njihov terapevtski potencial s tarčenjem raka in virusa HIV (Jost in sod., 2013; Schweizer in sod., 2008), medtem ko je VEGF-specifični DARPin Abicipar v obdobju pisanja te doktorske naloge že v tretji fazi kliničnih raziskav za zdravljenje makularnega edema (identifikacijski številki kliničnih testov: NCT02462928, NCT02462486), medtem ko bispecifični DARPin za VEGF in HGF vstopa v prvo klinično fazo za zdravljenje različnih oblik raka (identifikacijska številka kliničnih testov: NCT02194426). Za razliko od diagnostičnega slikanja je v primeru terapevtske uporabe hitro izločanje iz krvnega obtoka lahko slabost DARPinov v primerjavi s protitelesi ali drugimi zdravili. V primeru potrebe po podaljšani razpolovni dobi v krvnem obtoku so DARPini lahko modificirani s polimeri za večanje hidrodinamskega radija (npr. PEG), kar vodi do znižanega izločanja preko ledvic (Zahnd in sod., 2010). Druga metoda je fuzija s serumskim albuminom ali konstantno regijo protiteles (Fc), ki omogočita vezavo konjugata na neonatalni Fc receptor in recikliranje iz endotelijskih celic nazaj v krvni obtok (Simon in sod., 2013).

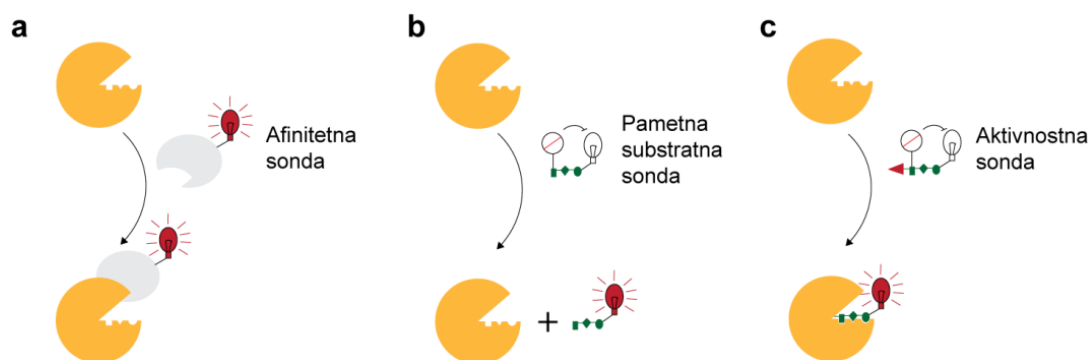
DARPine je moč izkoristiti tudi za pripravo konjugatov z zdravili za tarčno dostavo zdravil na področje bolezni, podobno kot v primeru konjugatov zdravil s protitelesi (angl. antibody-drug conjugates). V primeru terapije raka so uporabljena zdravila najpogostejše toksini, ki imajo sami ob sistemskem vnosu v telo številne hude stranske učinke, medtem ko so v primeru tarčne dostave stranski učinki znižani. Toksini so lahko male molekule, ki jih kemijsko konjugiramo na DARPine, ali pa so proteinski toksini, ki jih lahko izrazimo kot rekombinantne fuzijske proteine (Martin-Killias in sod., 2011; Simon in sod., 2014). Alternativna možnost je konjugacija DARPinov z liposomi ali nanodelci, ki služijo kot nosilci za toksine ali druga zdravila (Oude Blenke in sod., 2015; Winkler in sod., 2009).

1.3.2 Aktivnostne in substratne sonde

Ta skupina fluorescentnih sond za proteaze in druge encime za razliko od afinitetnih sond odda optični signal šele po encimski pretvorbi (prehod sonde iz temnega v svetlo stanje) in tako omogoča boljše kvantitativno ovrednotenje povišanja aktivnosti encima na področju bolezni (Blum in sod., 2007; Edgington in sod., 2011). Prehod iz temnega v svetlo

stanje je mogoč zaradi prenosa energije med donorskim fluoroforjem in akceptorsko skupino na sondi (t. i. dušilcem, angl. quencher), dokler sta ti dve skupini sterično blizu. Ta prenos energije se imenuje Försterjev prenos resonančne energije (FRET) in je vzrok, da je sonda v temnem stanju, čeprav nanjo posvetimo s svetlobo, ki vzbuja fluorofor. FRET je prekinjen, ko tarčni encim cepi sondo in dušilec oddisociira, kar vodi v svetlo stanje. V grobem FRET sonde razdelimo na pametne substratne sonde, ki nudijo večjo ojačitev signala in ne spremenijo funkcionalnosti tarčnega encima (Hu in sod., 2014a), in na aktivnostne sonde (angl. activity-based probe, ABP), ki omogočajo natančnejšo določitev lokalizacije encima (Slika 4) (Blum in sod., 2007). Ključna cilja sta selektivnost in biodostopnost sond, ki ju je moč doseči s presejalnimi testi velikega števila sond ali z racionalnim načrtovanjem, kot je reverzni pristop (Slika 5) (Watzke in sod., 2008). V tem primeru znan selektivni inhibitor z zadovoljivimi farmakološkimi parametri preoblikujemo v substrat na način, da ohrani selektivnost in biodostopnost. Na slednjo lahko vplivamo tudi s kemijskimi modifikacijami sond, tako da nanje vežemo polimere ali lipide, ki spremenijo čas zadrževanja v krvnem obtoku in izločanje preko retikulo-endotelijskega sistema (Hu in sod., 2014b).

Pri optičnem slikanju je zelo pomembna valovna dolžina svetlobe, pri kateri ima uporabljeni fluorofor maksimum emisije. Za predklinično slikanje celotnega telesa malih živali se uporabljajo fluoroforji z emisijskim maksimumom v območju bližnje infrardeče svetlobe (NIR), saj sta pri teh valovnih dolžinah minimalni avtofluorescenca tkiva in absorpcija vode, ki ključno omejujeta uporabnost optičnega slikanja. Kljub uporabi NIR fluoroforjev je penetracija optičnega signala skozi tkiva nizka in v primeru najboljših fluoroforjev znaša le nekaj centimetrov (Hilderbrand in Weissleder, 2010). To onemogoča uporabo v primeru slikanja notranjih človeških organov, kot to omogočajo nekatere ostale diagnostične tehnike, kot so MRI, PET ali rentgenska računalniška tomografija (CT). Največji potencial za uporabnost v medicini imajo fluorescentne aktivnostne in substratne sonde, zato pri endoskopskih tehnikah ter intraoperativni diagnostiki, ker je tkivno področje interesa v neposrednem vidnem polju za analizo (Garland in sod., 2016). Druga možnost, ki omogoča slikanje notranjih organov, pa je konjugacija aktivnostnih sond z radiooznačevalci, pri čemer pa izgubimo možnost za prehod iz temnega v svetlo stanje sonde (Withana in sod., 2016b).



Slika 4: Shematski prikaz afinitetnih, aktivnostnih in substratnih sond. a) Afinitetne sonde so sestavljene iz visokoafinitetnih ligandov in fluorescentnih ali drugačnih reporterjev. b) Pametne substratne sonde so sestavljene iz FRET para fluoroforja in dušilca. Povezuje ju povezovalna regija (angl. linker), ki jo prepozna tarčen encim in hidrolizira cepitev dušilca ter omogoči prehod sonde iz temnega v svetlo stanje. c) Aktivnostne sonde poleg komponent pri substratu vsebujejo še reaktivni center (angl. warhead), ki ob encimski cepitvi dušilca reagira z aktivnim mestom encima in se z njim kovalentno poveže.

1.3.2.1 Aktivnostne in substratne sonde za cisteinske katepsine

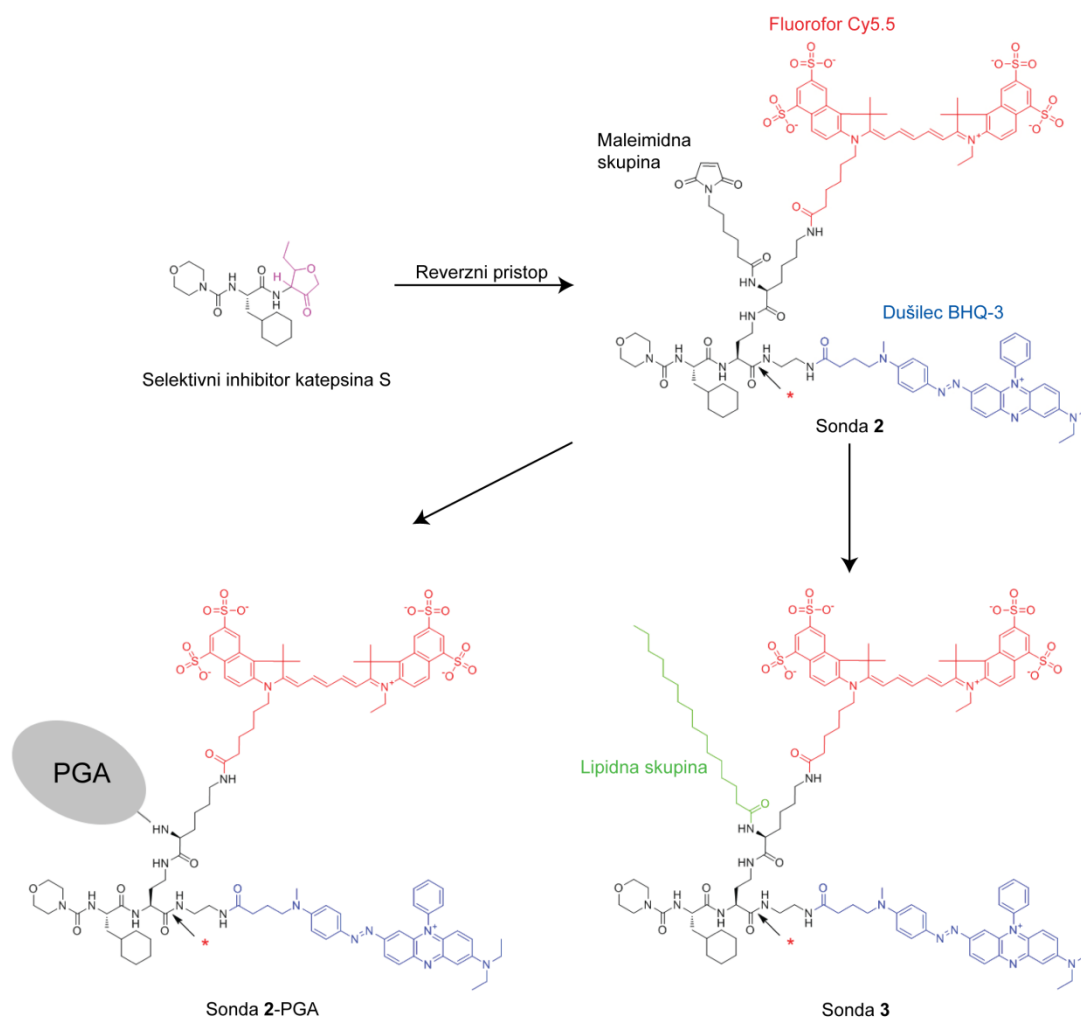
V preteklih dveh desetletjih so bile razvite številne širokospektralne sonde za cisteinske katepsine, ki so bile uspešno uporabljene v predkliničnih diagnostičnih modelih bolezni, kot so rak, ateroskleroza in vnetna obolenja sklepov.

Med prvimi širokospektralnimi substratnimi sondami za *in vivo* uporabo je bila sonda C-PGC, ki je kopolimer metoksipolietilen glikol sukcinata in poli-L-Lys, označenega s fluoroforjem Cy5.5 (Weissleder in sod., 1999). Neselektivne proteaze, kot so katepsini, so lahko razgradile peptidno vez med Lys, kar je vodilo do nastanka fluorescentnega signala. Sonda C-PGC je bila uspešno uporabljena v mišjem modelu raka mlečne žleze, kjer je omogočila detekcijo tumorjev premera manj kot 1 mm. Sonda je bila uporabljena tudi za detekcijo ateroskleroze (Chen in sod., 2002), revmatoidnega artritisisa (Wunder in sod., 2004) in zgodnjo detekcijo osteoartritisisa, kjer je bil predvsem katepsin B v artritičnih lezijah pomemben za nastanek fluorescentnega signala (Lai in sod., 2004). Tovrstna diagnostična tehnika ima v osteoartritisu velik potencial zaradi možnosti zgodnje detekcije bolezni, ki je sicer klinično diagnosticirana s CT in MRI. Te tehnike zaznajo morfološke spremembe tkiv, kar je razvidno šele v kasnejšem stadiju bolezni in zato ne omogoča zdravljenja v zgodnjih fazah bolezni.

Podobne širokospektralne polimerne sonde so bile uporabljene tudi za detekcijo raka požiralnika s fluorescentno endoskopijo (Habibollahi in sod., 2012), za tomografsko detekcijo aterosklerotičnih plakov (Jaffer in sod., 2011) in za ovrednotenje odziva raka jajčnika na kemoterapijo (Hensley in sod., 2012). V prognostični študiji je zmanjšanje volumna tumorja na jajčniku po kemoterapiji zelo dobro koreliralo s fluorescentnim signalom katepsinskih sond. Korelacija je bila boljša od tiste s širokospektralnimi sondami za metaloproteaze matriksa, ki so druga pomembna skupina proteaz v tumorskem mikrookolju s prekomernim izražanjem, kar kaže na visok potencial katepsinov kot diagnostičnih in prognostičnih tarč (Hensley in sod., 2012).

Pri novejših pametnih substratnih sondah so bile dosežene večje selektivnosti za posamezne katepsine. En pristop za to je bil v uporabi specifičnih peptidov v ogrodju sonde, ki jih razgradijo le izbrani katepsini (Ryu in sod., 2011; Ryu in sod., 2014). Ker je substratna specifičnost katepsinov zelo široka in so si v tem aspektu posamezni katepsini med sabo zelo podobni, je s tem pristopom zelo težko pridobiti visokoselektivne sonde. Alternativa peptidnim sondam je reverzni pristop, kjer so bili selektivni inhibitorji katepsinov preoblikovani v substrate (Slika 5). Na ta način so bile izdelane selektivne pametne substratne sonde za katepsin L in S (Caglič in sod., 2011; Watzke in sod., 2008).

Druga pomembna skupina širokospektralnih sond za *in vivo* spremljanje lokalizacije katepsinov so aktivnostne sonde z aciloksimetil ketonsko ali fenoksimetil ketonsko skupino kot reaktivnim centrom za ireverzibilno vezavo v aktivno mesto encima. Sonde na tej osnovi so omogočile *in vivo* spremljanje lokalizacije tumorjev v predkliničnih modelih (Blum in sod., 2007; Verdoes in sod., 2013) ter *ex vivo* diagnostično slikanje tumorskih biopsij tako v predkliničnih kot kliničnih vzorcih (Segal in sod., 2015; Withana in sod., 2016a). Poleg tega so bile v preteklih letih nekatere od širokospektralnih sond prvič testirane tudi v kliničnih testih za humano diagnostiko na primerih intraoperativnega zasledovanja pri operacijah odstranitve tumorjev in diagnostičnega odkrivanja pljučnega emfizema (Whitley in sod., 2016; Withana in sod., 2016b).



Slika 5: Shematski prikaz razvoja selektivnih substratnih sond z reverznim pristopom. Selektivni inhibitor proteaze (npr. katepsina S) smo preoblikovali v substrat, ki smo ga opremili z NIR fluoroforjem Cy5.5 in ustreznim FRET dušilcem BHQ-3. V strukturo sonde 2 smo vnesli tudi maleimidno skupino, ki omogoča potencialne nadaljnje konjugacije, medtem ko je bila sonda 2-PGA konjugirana s polimerom, sonda 3 pa z lipidom. Sonde iz te sheme smo uporabili pri našem raziskovalnem delu. Prirejeno po (Hu in sod., 2014b).

Poglavje 2

Namen dela

Katepsina B in S sta povišano izražena in sodelujeta pri patogenezi vnetnih bolezni, kot so rak in vnetne bolezni sklepov. Namen našega dela je priprava novih selektivnih diagnostičnih orodij za neinvazivno spremljanje količin teh dveh encimov *in vivo*. Takšna orodja bodo lahko v prihodnje uporabljena v medicinskem diagnostičnem slikanju, kjer sta katepsin B ali S povišano izražena.

Orodja bodo pomembno doprinesla tudi k razumevanju molekularnih osnov vnetnih bolezni v predkliničnih raziskavah, saj je neinvazivno spremljanje količin in aktivnosti encimov v eksperimentalnih živalskih modelih ključno za razumevanje njihove vloge ter razvoj novih terapevtskih strategij.

Hipotezi raziskav sta bili:

- katepsin B je povišano izražen v raku mlečne žleze in akutnem vnetju tačke, kar lahko spremljamo *in vivo* z uporabo fluorescentno označenih selektivnih DARPinov proti katepsinu B,
- z uporabo reverznega pristopa lahko razvijemo selektivne in biodostopne pametne substratne sonde za katepsin S.

Glavni cilji raziskav so bili:

- priprava orodij za spremljanje lokalizacije katepsina B:
 - selekcija in biokemijska karakterizacija DARPina, ki selektivno veže in inhibira katepsin B,
 - ovrednotenje biodostopnosti DARPina v celičnih kulturah rakastih in imunskih celic,
 - ovrednotenje biodostopnosti DARPina v mišjem modelu raka mlečne žleze in akutnega vnetja tačke;
- priprava orodij za spremljanje aktivnosti katepsina S:
 - biokemijska karakterizacija pametnih substratnih sond, ki jih selektivno cepi katepsin S,
 - ovrednotenje biodostopnosti sond v celičnih kulturah imunskih celic.

Poglavje 3

Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Laboratorijska oprema

- 0,5 mL in 1,5 mL mikrocentrifugirke (Costar)
- 15 mL, 50 mL centrifugirke (BD Biosciences)
- Aparatura za iztiskanje liposomov Mini Extruder (Avanti Polar)
- Aparatura za PCR 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)
- Aparatura za merjenje proteinskih interakcij ProteOn XPR36 in NLC čip (BioRad)
- Avtomatske pipete (Eppendorf)
- Bralnik mikrotitrskih plošč TECAN Infinite M1000 (Tecan)
- Centrifuge (Eppendorf)
- Fluorescentni skener Typhoon (GE Healthcare)
- Invertni mikroskop Olympus IX81 (Olympus)
- Inkubator za celične linije (Binder)
- Homogenizator Ultrathurrax (IKA)
- Kadička za agarozno elektroforezo Easy Cast Electrophoresis System Model #81A (Owl Scientific Inc.)
- Kadička za poliakrilamidno gelsko elektroforezo BioRad (BioRad)
- Kadička za prenos Western TE22 Mighty Small Transphor Unit (GE Lifesciences)
- Kamera Olympus U-LH100L (Olympus)
- Koncentracijske enote Amicon Ultra-4 in Ultra-15, MWCO 10 kDa (EMC Millipore)
- Koncentrator 5301 (Eppendorf)
- Krovna stekelca (Deck Glaser 24×60 mm, Engel Brecht)
- Laminarij za celične kulture BSB 4A (Gelaire Flow Laboratories)
- Mikroskopska stekelca Nunc Lab-TEK s štirimi luknjicami (Thermo Fisher Scientific)
- Mikrotitrna plošča s 96 luknjicami (Costar)
- Kristalizacijski robot Gryphoon (Art Robbins)
- Kolona za razsoljevanje PD-10 (GE Healthcare)
- Kromatografska kolona HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare)
- Kromatografska kolona HiTrap IMAC Sepharose FF (GE Healthcare)
- Kromatografska kolona MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare)
- Kromatografska kolona Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)
- Kromatografski sistem Akta FPLC (GE Healthcare)
- Kriotom Shandon CITADEL (Shandon)
- Masni spektrometer MALDI-TOF UltrafleXtreme III (Bruker)
- Model za pripravo gelov za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (BioRad)
- Nanodrop ND-1000 (Babtech International)

- Napajalnik za elektroforezo in prenos Western Lightning Volt™ Power Supply OSP-300 (Thermo Scientific)
- Nitrocelulozna membrana
- Nunc Maxisorp prozorne mikrotitrne plošče s 96 luknjicami (Thermo Fisher Scientific)
- Nunc Maxisorp prozorne mikrotitrne plošče s 384 luknjicami (Thermo Fisher Scientific)
- Objektna stekelca Superfrost Plus (Assistant)
- pH-meter MP 220 (Mettler Toledo)
- Polistirenske petrijevke premera 10 cm ali 15 cm (TPP)
- Programsko orodje Cell-F (Olympus)
- Razvijalec fotografskega filma 3RX-101A (Konica-Minolta)
- Sistem za slikanje kristalov RI1000 (Formilatrix)
- Sistem za optično slikanje malih živali IVIS Spectrum (Perkin Elmer)
- Sonikator Ultrasonic 450D (Branson, Thistle Scientific)
- Svetlobotesna kaseta Hypercassette™ (Amersham Biosciences)
- Števna komora po Neubauerju (Carl Roth)
- Teflonski homogenizator Ultra-Turrax (Janke & Kunkel IKA® Laboratechnik)

3.1.2 Kemikalije, komercialni kiti in reagenti

- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kislina (Sigma-Aldrich)
- Aceton (AppliChem)
- CA074 (Bachem)
- CaCl_2 (Serva)
- Cyanine5.5 maleimid (Lumiprobe)
- dNTP (NEB)
- DMSO (Merck)
- DTT (Sigma-Aldrich)
- EDTA (Serva)
- EZ-link maleimid-PEG₂-biotin (Thermo Fisher Scientific)
- EZ-link-LC-LC-NHS-biotin (Thermo Fisher Scientific)
- FBS (Sigma-Aldrich)
- FBS-HI (Sigma-Aldrich)
- BSA (Sigma-Aldrich)
- Glutamax (Gibco-Invitrogen)
- H_2O_2 30 % (Sigma-Aldrich)
- IPTG (Sigma-Aldrich)
- L-Arabinoza (Sigma-Aldrich)
- L-Cys (Sigma-Aldrich)
- Medij za zmrzovanje tkiv (Jung)
- MES (Serva)
- MgCl_2 (Serva)
- Metanol (Merck)
- NaDS (Thermo Fisher Scientific)
- NaCl (Serva)
- NEB2 pufer (NEB)
- Ni_2SO_4 (Sigma-Aldrich)
- 5-nitrosalicilaldehid (Sigma-Aldrich)
- PIPES (Serva)
- Označevalec velikosti proteinov PageRuler Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas)
- Penicilin/Streptomycin (Gibco-Invitrogen)

- PEG₆₀₀₀ (Fluka)
- RNasin ribonukleazni inhibitorji (Promega)
- Reagent za določanje koncentracije proteinov (Bio-Rad)
- Reagent za pripravo bakterijskih lizatov B-PER II (Thermo Fisher Scientific)
- SlowFade Gold antifade reagent z DAPI (Invitrogen)
- TCEP (Thermo Fisher Scientific)
- TrypleSelect tripsin (Gibco, Invitrogen)
- Trypan Blue (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- TRIS (Serva)
- z-Arg-Arg-AMC (Bachem)
- z-Arg-Arg-4MβNA (Bachem)
- z-Phe-Arg-AMC (Bachem)
- Zymosan A (Sigma)
- Komercialni set reagentov za kemiluminiscenco ECL (GE Healthcare)
- Komercialni set reagentov MinElute Columns (Qiagen)
- Komercialni set reagentov QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Komercialni set reagentov RNA Purification Kit (Qiagen)

3.1.3 Pufri in gojišča

- Pufer PBS
6,6 mM Na₂HPO₄
13,4 mM NaH₂PO₄
150 mM NaCl
pH 7,0
- Pufer TBS
50 mM Tris/HCl
500 mM NaCl
pH 7,0
- Pufer PBST
PBS
0,005 % Tween-20
- Pufer TBST
TBS
0,05 % Tween-20
- Pufer PBST-BSA
PBST
0,5 % BSA
- Pufer TBST-BSA
TBST
3 % BSA
- Pufer A za anionsko izmenjevalno kromatografijo
100 mM NaHCO₃
10 mM NaCl

- Pufer B za anionsko izmenjevalno kromatografijo
100 mM NaHCO₃
1 M NaCl
- Pufer BANA
16 mM Na₂HPO₄
88 mM KH₂PO₄
2 mM EDTA
0,1 % PEG
pH 6,0
- Pufer BANA-PEG
BANA
0,1 % BSA
- Pufer za afinitetni test s pH 5
64 mM NaCH₃COO
37 mM CH₃COOH
300 mM NaCl
0,05 % Tween-20
0,5 % BSA
pH 5,0
- Pufer za afinitetni test s pH 6
16 mM Na₂HPO₄
88 mM KH₂PO₄
300 mM NaCl
0,05 % Tween-20
0,5 % BSA
pH 6,0
- Pufer za afinitetni test s pH 7
6,6 mM Na₂HPO₄
13,4 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
0,05 % Tween-20
0,5 % BSA
pH 7,0
- Nanašalna raztopina za agarozno elektroforezo (6x)
0,09 % bromfenol modro
0,09 % ksilencianol FF
60 % glicerol
60 mM EDTA
- Pufer za agarozno elektroforezo
40 mM Tris/acetat
1 mM EDTA
pH 8,0

- Raztopina dNTP
10 mM dATP
10 mM dCTP
10 mM dGTP
10 mM dTTP
- Pufer EB25
20 mM Tris/Acetat
150 mM NaCl
25 mM EDTA
pH 7,5
- Pufer WBT-BSA
50 mM Tris/Acetat
150 mM NaCl
50 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
0,05 % Tween-20
0,5 % BSA
pH 7,5
- Raztopina za pripravo 4 % koncentracijskega gela za NaDS-PAGE
1,33 mL 40 % akrilamid/bisakrilamid
2,5 mL 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
6,4 mL H_2O
0,1 mL 10 % NaDS
0,05 mL 10 % APS
0,025 mL TEMED
- Raztopina za pripravo 15 % ločevalnega gela za NaDS-PAGE
3,75 mL 40 % akrilamid/bisakrilamid
2,5 mL 1 M Tris-HCl (pH 8,8)
3,6 mL H_2O
0,1 mL 10 % NaDS
0,05 mL 10 % APS
0,005 mL TEMED
- Nanašalni pufer za NaDS-PAGE (6x)
375 mM Tris/HCl
6 % NaDS
48 % glicerol
100 mM DTT
0,03 % bromfenol modro
pH 6,8
- Pufer za NaDS-PAGE
25 mM Tris
192 mM L-Gly
0,1 % NaDS
- Raztopina za fiksiranje NaDS-PAGE gela
30 % etanol
10 % očetna kislina

- Pufer za prenos po Westernu
25 mM Tris
192 mM L-Gly
15 mM NaDS
20 % metanol
- Pufer za odstranjevanje endotoksinov
PBS
20 mM imidazol
0,1% Triton X-114
- Pufer PAB
HBSS (Gibco-Invitrogen)
25 mM PIPES, pH 7,0
0,6 mM CaCl_2
0,6 mM MgCl_2
2 mM L-Cys
- Raztopina za razvijanje ELISA
0,1 M Na_2HPO_4
0,1 M citronska kislina, pH 4,5
1 mg · mL⁻¹ 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kislina
0,06 % H_2O_2
- Pufer za zimografijo
PBS
2,7 mM L-Cys
1 mM DTT
0,25 mM EDTA
1 mM nitrosalicilaldehid
- Pufer za tkivne lizate
250 mM Tris/HCl, pH 7,0
5 mM EDTA
1 % Triton X-100
- TB gojišče z ampicilinom
72 mM K_2HPO_4
7 mM KH_2PO_4
1,2 % tripton
2,4 % kvasni ekstrakt
0,4 % glicerol
100 µg · mL⁻¹ ampicilin
- LB gojišče z ampicilinom
1,0 % tripton
0,5 % kvasni ekstrakt
1,0 % NaCl
100 µg · mL⁻¹ ampicilin

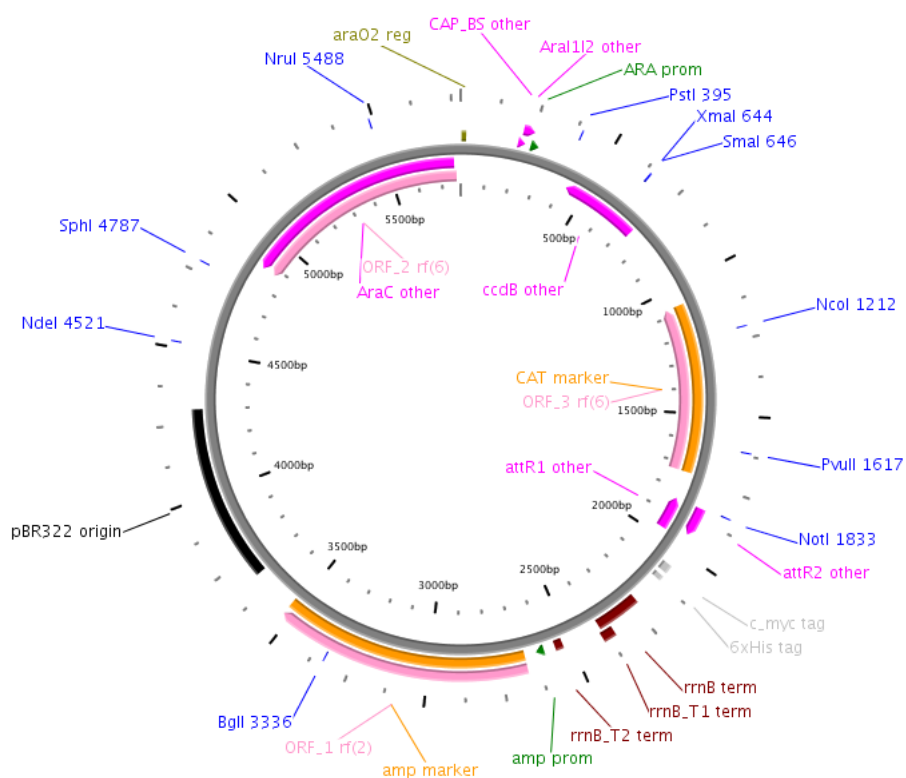
- Nekompletni bogati medij za *E. Coli*
42 mM KH_2PO_4
166 mM K_2HPO_4
1 % kvasni ekstrakt
1,5 % tiamin
1 % glukoza
- Gojišča DMEM, MEM in RPMI-1640 (Gibco-Invitrogen)

3.1.4 Začetni oligonukleotidi

- EWT5: 5' -TTCCTCCATGGGTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCAT
CACGGATCCGACCTGGG-3'
Uporabljen v poglavjih 3.2.1.1 in 3.2.1.7.
- NC4S: 5' -GCATAATTAAGCTTTGCCGCTTTTTGC-3'
Uporabljen v poglavjih 3.2.1.1, 3.2.1.7 in 3.2.2.
- T7B.2: 5' -CTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACG-3'
Uporabljen v poglavju 3.2.1.1.
- TolAk: 5' -CCGCACACCAGTAAGGTGTGCGGTTTCAGTTGCCGCTTCTTTCT-3'
Uporabljen v poglavju 3.2.1.1.
- pBam: 5' -CGCGGATCCGACCTGGGTAAGAA-3'
Uporabljen v poglavjih 3.2.2 in 3.2.3.
- pDPGSC: 5' -CCCAAGCTTTTATTAACAGGACCCCGCCGCTTTTTGC-3'
Uporabljen v poglavju 3.2.3.

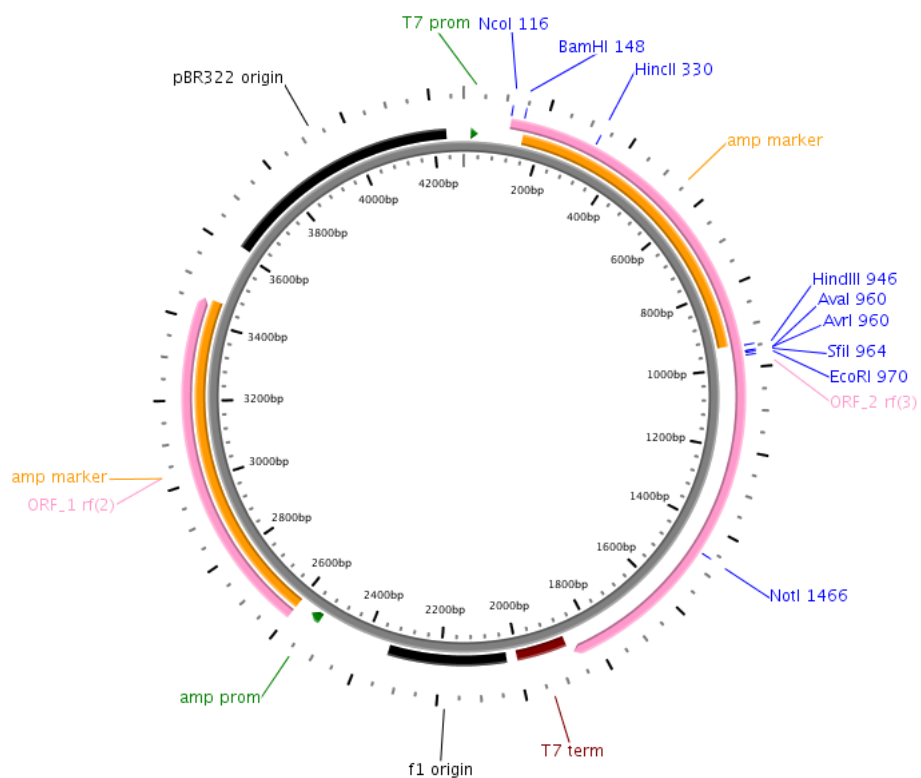
3.1.5 Vektorji

- pBXNH3 (Geertsma in Dutzler, 2011; slika 6):



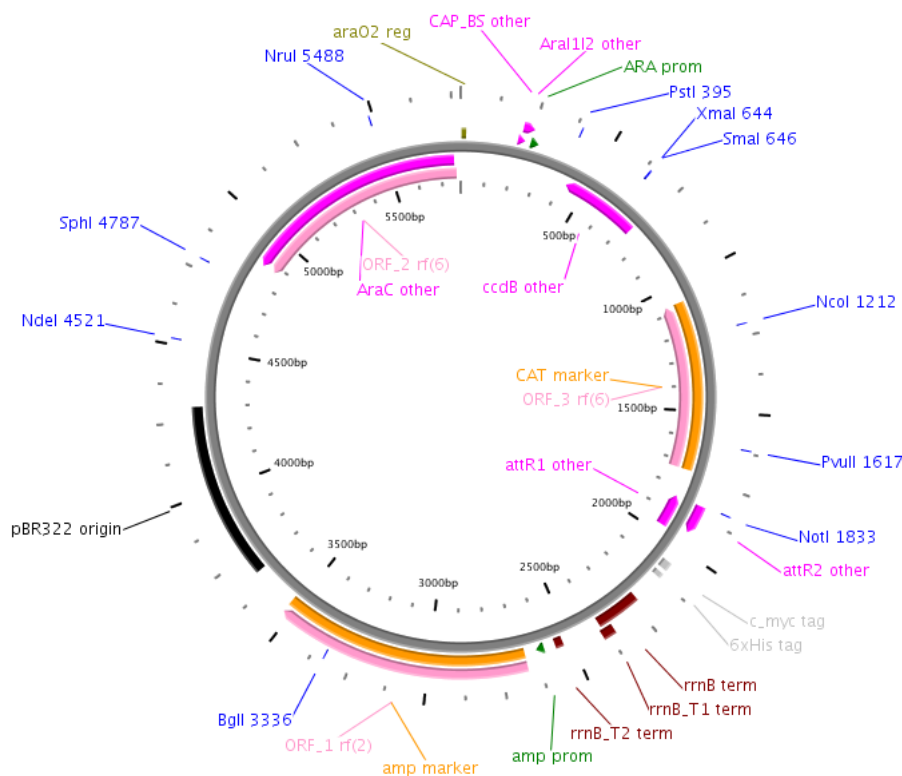
Slika 6: Plazmidna mapa vektorja pBXNH3

- pRDV (Binz in sod., 2004; slika 7):



Slika 7: Plazmidna mapa vektorja pRDV.

- pQE30 (Qiagen; slika 8)



Slika 8: Plazmidna mapa vektorja pQE30.

3.1.6 Protitelesa

- Kozja protitelesa proti katepsin B AF965 (R&D Systems)
- Mišja protitelesa proti heksahistidinski oznaki 11922416001 (Roche)
- Sekundarna kunčja protikozja protitelesa, konjugirana s fluorescentnim barvilom Alexa488 (Thermo Fisher Scientific)
- Sekundarna kunčja protikozja protitelesa, konjugirana s HRP (Thermo Fisher Scientific)

3.1.7 Rekombinantni encimi in ostali proteini

- Rekombinantni človeški in mišji katepsin B smo izrazili v netopni frakciji bakterijskega seva *E. coli* pLysS (Caglic in sod., 2009), človeške katepsine S, L, K in X pa v kvasovki *Pichia pastoris* po že uveljavljenem postopku (Bromme in sod., 2004; Mihelic in sod., 2008; Puzer in sod., 2005). Encime smo očistili s standardnimi kromatografskimi tehnikami v skladu z opisanimi postopki.
- Alkalna fosfataza CIP (NEB)
- DNaza I tipa IV (Roche)

- Lizocim (Thermo Fisher Scientific)
- Neutravidin (Thermo Fisher Scientific)
- Restriksijska endonukleaza *Bam*HI (NEB)
- Restriksijska endonukleaza *Sap*I (NEB)
- Restriksijska endonukleaza *Nco*I (NEB)
- Restriksijska endonukleaza *Hind*III (NEB)
- Reverzna transkriptaza Affinity Script in pripadajoči pufer (Agilent)
- Streptavidin, konjugiran s fluorescentnim barvilom Alexa488 (Thermo Fisher Scientific)
- Streptavidin, konjugiran s HRP (Thermo Fisher Scientific)
- Protein A (Sigma)
- T4 DNA ligaza in pripadajoči LB pufer (NEB)
- T7 polimeraza in pripadajoči pufer (Promega)
- Taq polimeraza in pripadajoči pufer (NEB)
- Vent polimeraza in pripadajoči pufer (NEB)

3.1.8 Bakterijske in sesalske celične kulture

- *E. coli* MRE600 (Lesley, 1995)
- *E. coli* XL-1 Blue (Agilent)
- *E. coli* MC1061 (Thermo Fisher Scientific)
- Mišje celice adenokarcinoma mlečne žleze 4T1 (ATCC)
- Mišji immortalizirani fibroblasti L929 (ECACC)
- Človeški levkemični monociti THP-1 (ECACC)
- Primarne mišje tumorske celice adenokarcinoma mlečne žleze PyMT

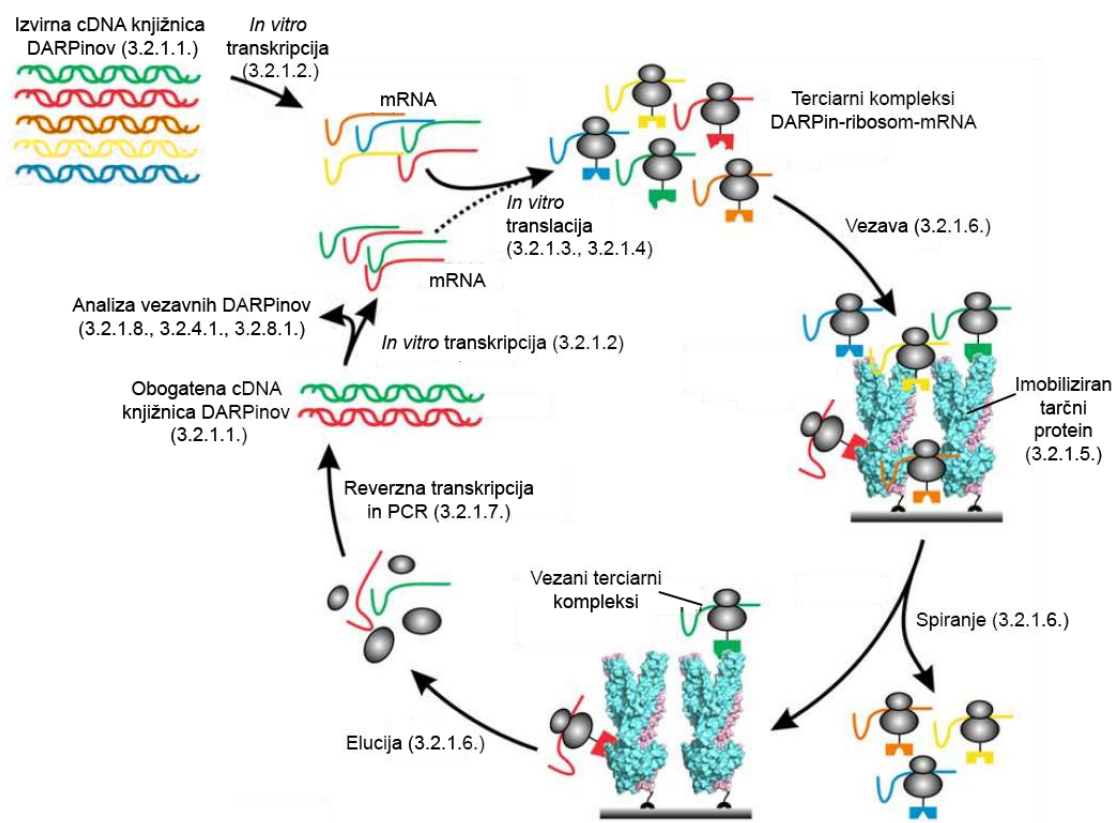
3.1.9 Miši

- Sev miši FVB/N divji tip (vzrejene na IJS)
- Transgeni sev miši FVB/N MMTV-PyMT (vzrejene na IJS)
- Sev miši Balb/c divji tip (Envigo)

3.2 Metode

3.2.1 Ribosomalna predstavitev

Postopek obogatitve knjižnice DARPinov smo izvedli s tehniko ribosomalne predstavitve po že opisani metodi z nekaterimi modifikacijami (Zahnd in sod., 2007a). Uporabili smo površinsko imobilizacijo biotiniliranih tarčnih proteinov v Nunc MaxiSorp imunocevkah ali ploščicah s 96 luknjicami, prevlečenih z NeutrAvidinom. Kot vir DARPinov smo uporabili nedavno opisano in sintetizirano knjižnico druge generacije DARPinov (Seeger in sod., 2013). Za končno obogatitev knjižnice smo izvedli osem krogov ribosomalne predstavitve, kjer smo izmenjevali mišji oziroma humani katepsin B kot tarčo. V vsakem krogu smo izvedli tudi predtarčenje z namenom odstranitve neselektivnih DARPinov, pri čemer smo uporabili vezavni protein za maltozo. Tako smo pridobili obogatene knjižnice DARPinov, ki so vsebovale vezavne DARPine za katepsin B. Te obogatene knjižnice smo na koncu vstavili v bakterijski ekspresijski vektor pBXNH3, kar nam je omogočilo izražanje posameznih DARPinov iz obogatene knjižnice v *E. coli* in nadaljnje presejalne teste, s katerimi smo pridobili visoko selektivne DARPine. Na Slika 9 je shematsko prikazan postopek, sledi pa podrobnejši opis tehnik.



Slika 9: Shematski prikaz obogatitve knjižnice DARPinov z metodo ribosomalne predstavitve, ki smo jo uporabili pri našem delu. Dopisane so številke poglavij, kjer je podrobneje opisan del metode. Prirejeno po (Seeger in sod., 2012).

3.2.1.1 Kloniranje cDNA knjižnice DARPinov v linearne konstrukte z vezavnim mestom za ribosome

DNA knjižnico DARPinov smo pomnožili s PCR po shemi:

DMSO	2,5 µL
Pufer za Vent polimerazo (10x)	5 µL
H ₂ O	34 µL
dNTP (10 mM)	2 µL
Začetni oligonukleotid EWT5 (100 µM)	0,5 µL
Začetni oligonukleotid NC4S (100 µM)	0,5 µL
DNA knjižnica DARPinov	5 µL
<u>Vent polimeraza</u>	<u>0,5 µL</u>
Skupno	50 µL

Uporabili smo sledeči PCR program:

5'	95 °C	
30"	95 °C	} 35x
30"	55 °C	
45"	72 °C	
5'	72 °C	
	4 °C	

Produkte reakcije smo ločili z elektroforezo na 1,2 % agaroznem gelu ter liso pri velikosti okoli 500 bp izrezali ter PCR produkte očistili z uporabo komercialnega seta reagentov QIAquick Gel Extraction Kit po navodilih proizvajalca.

Izolirane produkte PCR smo izpostavili restrikcijskim encimom *Nco*I in *Hind*III za eno uro pri temperaturi 37 °C po sledeči shemi:

NEB2 pufer (10x)	2 µL
H ₂ O	11 µL
PCR produkti	5 µL
<i>Nco</i> I	1 µL
<i>Hind</i> III	1 µL
Skupno	20 µL

PCR produkte po restrikciji smo očistili s komercialnim setom reagentov MinElute Columns.

Klonirni vektor pRDV, ki vsebuje T7 promotor, vezavno mesto za ribosome in distančnik za zadrževanje na ribosomih smo izpostavili restrikcijskim encimom *Nco*I in *Hind*III za eno uro pri temperaturi 37 °C po sledeči shemi:

NEB2 pufer (10x)	5 µL
H ₂ O	40 µL
pRDV	10 µL
<i>Nco</i> I	3 µL
<i>Hind</i> III	2 µL
Skupno	50 µL

V reakcijo smo nato dodali 3 µL alkalne fosfataze CIP in inkubirali na 37 °C še eno uro. Produkte reakcije smo ločili z elektroforezo na 0,8 % agaroznem gelu ter liso pri velikosti 4000 bp izrezali in vektor očistili z uporabo komercialnega seta reagentov QIAquick Gel Extraction Kit po navodilih proizvajalca.

Ligacijo DNA knjižnice DARPinov v vektor pRDV smo izvedli z inkubacijo na sobni temperaturi za eno uro po sledeči shemi:

LB pufer (10x)	1,5 µL
H ₂ O	2,5 µL
pRDV po restrikciji	1 µL
T4-DNA-Ligase	1 µL
PCR produkti po restrikciji	9 µL
Skupno	15 µL

Ligazo smo inaktivirali z 10 min inkubacijo na 70 °C.

Ligirano knjižnico DARPinov v vektorju pRDV smo pomnožili z reakcijo PCR po enakem protokolu kot zgoraj, le da smo tokrat uporabili začetna oligonukleotida T7B.2 in TolAk, s čimer smo v DNA zapis knjižnice DARPinov dodali T7 promotor, vezavno mesto za ribosome in distančnik za zadrževanje na ribosomih.

Nastale produkte smo ločili z elektroforezo na 0,8 % agaroznem gelu in PCR produkt pri velikosti okoli 1000 bp izolirali s komercialnim setom reagentov QIAquick Gel Extraction Kit po navodilih proizvajalca.

Izoliran PCR produkt smo nato ponovno pomnožili z reakcijo PCR po enakem protokolu kot v prejšnjem koraku ter produkt izolirali z uporabo komercialnega seta reagentov MinElute po navodilu proizvajalca, z izjemo elucije iz nosilca, ki smo jo izvedli s H₂O namesto s priloženim elucijskim pufrom. S tem korakom smo pridobili velike količine produkta, potrebnega za *in vitro* transkripcijo. Koncentracije PCR produkta so bile okoli 0,5 µg µL⁻¹.

3.2.1.2 *In vitro* transkripcija mRNA

In vitro transkripcijo v mRNA smo izvedli po sledeči shemi:

Pufer za transkripcijo (5x)	20 μ L
H ₂ O	23,5 μ L
NTP (25 mM)	28 μ L
RNasin ribonukleazni inhibitorji (200 U · μ L ⁻¹)	2 μ L
T7 polimeraza	4 μ L
mRNA (2,5 μ g · μ L ⁻¹)	22,5 μ L
Skupaj	100 μ L

Inkubirali smo 30 min pri 37 °C, nato pa smo v reakcijo dodali 1 U DNaze za dodatnih 15 min.

mRNA smo izolirali s komercialnim setom reagentov RNA Purification Kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca. Količino mRNA smo določili spektrofotometrično s spektrofotometrom NanoDrop ter z vodo razredčili do koncentracije 2,5 μ g μ L⁻¹. Izolirano mRNA smo zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -80 °C do nadaljnje uporabe. Pri vseh korakih dela z mRNA smo uporabili biokemijski laboratorijski pribor (mikrocentrifugirke, nastavke za pipetiranje) s certificirano odsotnostjo encimov RNaz.

3.2.1.3 Priprava *E. coli* S30 ekstrakta

S30 ekstrakt *E. coli* vsebuje vse potrebne molekularne komponente za *in vitro* translacijo, ki smo jo izvedli v naslednjem koraku. Med temi so ključni ribosomi, molekule tRNA in translacijski dejavniki. Pripravili smo jih iz bakterijskega seva *E. coli* MRE600, ki ima mutacijo v genu za ribonukleazo I, tako da ne izraža funkcionalne ribonukleaze I, ki bi onemogočila *in vitro* translacijo iz mRNA.

Prekonočno kulturo *E. coli* MRE600 smo nacepili v 10 L nekompletnega bogatega medija v razmerju 1:100 in gojili bakterije do gostote, ki je ustrezala OD₆₀₀ = 1,1. Nato smo bakterijske celice centrifugirali za 10 min na 5000 g pri 4 °C in pelet resuspendirali v pufru S30 do koncentracije 25 mg · mL⁻¹. Celice smo razbili z uporabo francoske preše pri pritisku 1000 PSI, nato pa smo centrifugirali zmes za 30 min na 20000 g pri 4 °C. Supernatant smo prenesli v svežo centrifugirko in ponovili korak centrifugiranja. Nato smo supernatantu dodali 10 % (V/V) pufru za preinkubacijo zmesi (10x) ter ob počasnem mešanju inkubirali 1 h na sobni temperaturi. Raztopino smo nato dializirali 2 h proti 20x volumnu hladnega pufru S30, nato pa dializni korak ponovili preko noči s svežo raztopino pufru S30. Pri tem smo uporabili membrano s porami velikosti 8000 Da. Naslednji dan smo raztopino centrifugirali pri 4000 g za 10 min na 4 °C in supernatant zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -80 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.1.4 *In vitro* translacija DARPinov v obliki terciarnih kompleksov z ribosomi in mRNA

mRNA knjižnico DARPinov z dodanim T7 promotorjem, vezavnim mestom za ribosome in distančnikom za zadrževanje na ribosomih smo prevedli v pogojih *in vitro* z uporabo S30 ekstrakta *E. coli*. S tem smo dobili translacijsko zmes, ki je vsebovala terciarne komplekse sintetiziranih DARPinov, ki so bili preko ribosomov povezani z ujemajočo mRNA molekulo. To nam je v nadaljnjih korakih omogočilo, da smo izolirali mRNA selektivnih DARPinov.

V prvem krogu smo ribosomalno predstavitev izvedli v imunocevkah, v preostalih krogih pa v mikrotitrskih ploščicah. Temu primerno smo izvedli tudi *in vitro* translacijo DARPinov po sledeči shemi:

Za uporabo v imunocevkah:

Pufer za translacijo PR1	125 μ L
S30 ekstrakt <i>E. coli</i>	150 μ L
mRNA (2,5 μ g · μ L ⁻¹)	20 μ L
Skupaj	295 μ L

Za uporabo v mikrotitrskih ploščah:

Pufer za translacijo PR1	25 μL
S30 ekstrakt <i>E. coli</i>	30 μL
mRNA ($2,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	4 μL
Skupaj	59 μL

Med pipetiranjem smo imeli translacijsko zmes na ledu, nato pa smo jo prestavili na 37 °C za 270 sekund.

Reakcijo smo prekinili s hladnim pufrom WBT-BSA z dodanim heparinom ($2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), nato pa translacijsko zmes centrifugirali 5 min pri 20000 g na 4 °C.

3.2.1.5 Imobilizacija tarč na površini imunocevk in mikrotitrskih plošč

Ribosomalno predstavitev smo izvedli z metodo izpostavitve tarč na površini imunocevk oziroma mikrotitrskih plošč. Naši tarči sta bila biotinitiran človeški in mišji katepsin B, medtem ko smo za predtarčenje uporabili biotinitiran maltozni vezavni protein (MBP) *E. Coli* kot nerelevanten protein (Binz in sod., 2004). Namen predtarčenja je iz zmesi odstraniti del neselektivnih DARPinov, ki se vežejo na nespecifične proteinske površine.

Na površino imunocevk oziroma mikrotitrskih plošč smo najprej imobilizirali neutravidin, tako da smo preko noči na 4 °C inkubirali 66 nM neutravidina v pufru TBS. V imunocevkah smo uporabili 1 mL, v mikrotitrskih ploščah pa 300 μL raztopine. Nezasedeno površino smo nato blokirali na sobni temperaturi z raztopino 0,5 % BSA. Uporabili smo 1 mL raztopine v imunocevkah oziroma 100 μL raztopine v mikrotitrskih ploščah. Po trikratnem spiranju s pufrom TBS smo dodali 1 μM raztopino tarčnega biotinitiranega proteina v pufru TBS ter inkubirali 1 h na 4 °C in pri tem stresali. Nato smo imunocevke oziroma mikrotitrške plošče trikrat sprali s pufrom WBT-BSA in jih uporabili za ribosomalno predstavitev.

3.2.1.6 Ribosomalna predstavitev terciarnih kompleksov

Translacijsko zmes, ki je vsebovala terciarne komplekse DARPin-ribosom-mRNA, smo v prvem krogu ribosomalne predstavitve inkubirali v imunocevkah z ustrezno imobilizirano tarčo, v preostalih krogih pa v mikrotitrskih ploščah z ustrezno imobilizirano tarčo.

V vsakem krogu ribosomalne predstavitve smo najprej izvedli predtarčenje, tako da smo celotno translacijsko zmes prenesli v imunocevke oziroma mikrotitrške plošče z imobiliziranim MBP in inkubirali 1 h pri 4 °C in rahlem stresanju. V tem času so se na imobiliziran MBP med drugim vezali vsi DARPini, ki neselektivno vežejo proteinske površine, tako da smo te DARPine izločili iz selekcije.

Nato smo translacijsko zmes prenesli v imunocevke oziroma mikrotitrške plošče z imobiliziranim katepsinom B ter inkubirali 1 h pri 4 °C in rahlem stresanju. V tem času so se na imobiliziran katepsin B vezali le selektivni DARPini. Preostalo translacijsko zmes smo zavrgli, imobilizirane komplekse DARPinov pa eluirali z dodatkom pufru EB25. Uporabili smo 500 μL pufru v primeru imunocevk oziroma 100 μL pufru v primeru mikrotitrskih plošč. Po 5 min inkubacije na 4 °C in močnem stresanju smo raztopino prenesli v svežo mikrocentrifugirko na 4 °C, nato pa smo korak elucije ponovili in na koncu obe raztopini združili. mRNA smo izolirali z uporabo komercialnega seta reagentov RNA-purification kit po navodilih proizvajalca.

3.2.1.7 Povratni prepis mRNA v cDNA

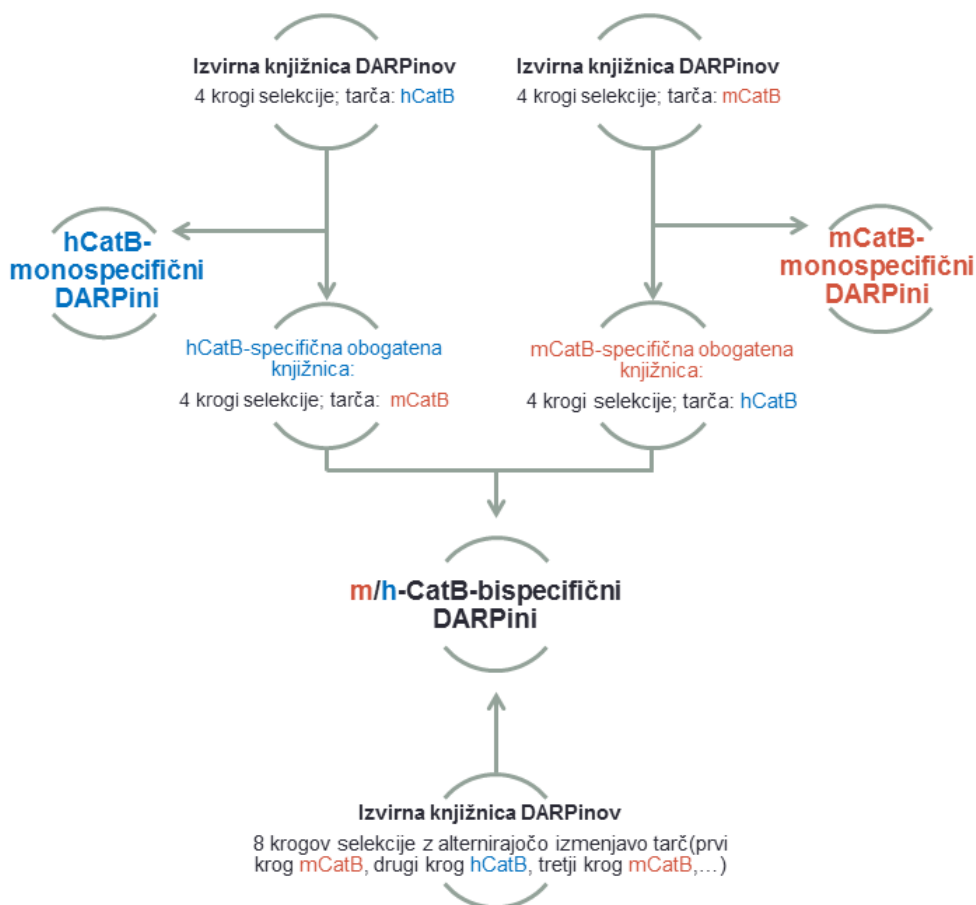
Obogateno knjižnico DARPinov smo iz mRNA prepisali v cDNA, kar nam je kasneje omogočilo njeno pomnoževanje z metodo PCR ter kloniranje v ekspresijske vektorje. mRNA smo najprej denaturirali z inkubacijo na 70 °C za 10 min. Nato smo izvedli povratni prepis po sledeči shemi:

Pufer Affinity script Master mix (2x)	10 μ L
Začetni oligonukleotid NC4S (100 μ M)	0,25 μ L
RNasin ribonukleazni inhibitorji (200 U μ L ⁻¹)	0,5 μ L
Reverzna transkriptaza Affinity Script	1 μ L
mRNA	8,75 μ L
Skupno	20 μ L

Inkubirali smo 1 h na 50 °C, nato pa 5 μ L raztopine uporabili za reakcijo PCR, preostanek pa smo shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

Reakcijo PCR smo izvedli po enakem protokolu, kot je opisano zgoraj, z uporabo začetnih oligonukleotidov EWT5 in NC4S. Po prvem in petem krogu ribosomalne predstavitve smo pri reakciji PCR uporabili 45 termičnih ciklov, po drugem in šestem krogu 35 termičnih ciklov, po tretjem in sedmem krogu 30 termičnih ciklov in po četrtem in osmem krogu 25 termičnih ciklov.

Produkte reakcije smo ločili z elektroforezo na 1,2 % agaroznem gelu ter liso pri velikosti okoli 500 bp izrezali ter PCR produkte očistili z uporabo komercialnega seta reagentov QIAquick Gel Extraction Kit po navodilih proizvajalca. Tako pripravljeno obogateno knjižnico DARPinov v obliki pomnožene cDNA smo nato uporabili kot izhodišče za naslednji cikel ribosomalne predstavitve v skladu s shemo na Slika 10 oziroma za kloniranje v bakterijski ekspresijski vektor pBXNH3.



Slika 10: Shematski prikaz strategije ribosomalne predstavitve za pridobitev selektivnih bispecifičnih vezavnih proteinov za človeški in mišji katepsin B.

3.2.1.8 Kloniranje obogatene cDNA knjižnice DARPinov v vektor pBXNH3

Obogatene knjižnice v obliki cDNA iz četrtega in osmega cikla ribosomalne predstavitve smo klonirali v vektor pBXNH3, ki nosi zapis za N-končni dekahistidinski privesek.

Najprej smo cDNA knjižnico pomnožili z reakcijo PCR, pri čemer smo v vključke dodali mesta za cepitev z restrikcijskim encimom *SapI*. Uporabili smo enake pogoje za reakcijo PCR kot zgoraj, le da smo tokrat uporabili začetna oligonukleotida FXf in FXr. Produkta smo očistili z uporabo komercialnega seta reagentov MinElute po navodilu proizvajalca.

Kloniranje v vektor pBXNH3 smo izvedli s tehniko sočasne restrikcije in ligacije po sledeči shemi:

Vektor pBXNH3 (25 ng μL^{-1})	2 μL
cDNA (11 ng μL^{-1})	9 μL
ATP (10 mM)	1,25 μL
NEB4 pufer (10x)	1,2 μL
<i>SapI</i>	1 μL
T4 ligaza	1,25 μL
Skupno	12 μL

Zmes smo inkubirali 90 min na 37 °C in nato še 20 min na 65 °C ter jo do nadaljnje uporabe shranili na -20 °C.

3.2.2 Kloniranje cDNA izbranih selektivnih DARPinov v vektor pQE30

cDNA izbranih DARPinov iz selekcijskega postopka smo klonirali v vektor pQE30 (Qiagen), ki nosi zapis za N-končni arginil glicil seril heksahistidinski privesek.

Najprej smo cDNA pomnožili z reakcijo PCR, pri čemer smo v vključke dodali mesta za cepitev z restrikcijskima encimoma *BamHI* in *HindIII*. Uporabili smo enake pogoje za reakcijo PCR kot zgoraj, le da smo tokrat uporabili začetna oligonukleotida pBam in NC4S. Produkta smo očistili z uporabo komercialnega seta reagentov MinElute po navodilu proizvajalca.

Vektor smo nato izpostavili restrikcijskim encimom po shemi:

Pufer NEB2 (10x)	4 μL
H ₂ O	5,6 μL
Vektor pQE30 (100 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	20 μL
BSA (10 mg $\cdot \text{mL}^{-1}$)	0,4 μL
<i>BamHI</i>	5 μL
<i>HindIII</i>	5 μL
Skupaj	40 μL

Vključke smo izpostavili restrikcijskim encimom po shemi:

Pufer NEB2 (10x)	2 μL
H ₂ O	5,8 μL
cDNA (20 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	10 μL
BSA (10 mg $\cdot \text{mL}^{-1}$)	0,2 μL
<i>BamHI</i>	1 μL
<i>HindIII</i>	1 μL
Skupaj	20 μL

Inkubirali smo 90 min na 37 °C in nato 10 min na 60 °C.

Restrikcijsko zmes z vektorjem smo nato ločili z elektroforezo na 1,2 % agaroznem gelu ter liso pri velikosti okoli 3500 bp izrezali ter lineariziran vektor očistili z uporabo komercialnega seta reagentov QIAquick Gel Extraction Kit po navodilih proizvajalca.

Restrikcijsko zmes s cDNA smo očistili direktno z uporabo komercialnega seta reagentov QIAquick Gel Extraction Kit po navodilih proizvajalca.

Nato smo izvedli ligacijo po shemi:

Vektor pQE30 po restrikciji (25 ng μL^{-1})	1 μL
cDNA po restrikciji (10 ng μL^{-1})	11,5 μL
NEB Ligase pufer (10x)	1,5 μL
T4 ligaza	1 μL
Skupno	15 μL

Inkubirali smo preko noči na 16 °C in nato 10 min na 65 °C ter raztopino shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.3 Priprava mutantov DARPinov s C-končnim cisteinom z verižno reakcijo s polimerazo

Z uporabo PCR mutageneze smo na 3' konec DNA zapisov za DARPinov dodali nukleotidno zaporedje za tripeptid glicin-serin-cistein. Uporabili smo začetna oligonukleotida pBam in pDPGSC. Produkta PCR reakcije smo ponovno vstavili v vektor pQE30 preko restrikcijskih mest *Bam*HI in *Hind*III, kot je opisano v prejšnjem odstavku.

3.2.4 Izražanje rekombinantnih proteinov

3.2.4.1 Izražanje DARPinov v *E. coli* MC1061 v formatu s 96 luknjicami

Po četrtem in osmem krogu ribosomalne predstavitve smo obogateno knjižnico DARPinov v vektorju pBXNH3 transformirali v bakterijski sev *E. coli* MC1061. Kot kontrolo smo transformirali tudi vektor z neselektivnim DARPinom *E3_5*. Izbrali smo 1140 kolonij in jih inokulirali v posamezne jamice v ploščah s 96 poglobljenimi luknjicami, kamor smo predhodno odpipetirali po 1 mL TB gojišča z dodanim ampicilinom. Kot kontrolo smo na vsako ploščo v eno jamico inokulirali tudi kolonijo, ki je vsebovala vektor z neselektivnim DARPinom *E3_5*. Nato smo stresali na 37 °C preko noči. Naslednji dan smo 200 μL kultur prenesli v 800 μL svežega TB gojišča z ampicilinom na novi plošči, stresali 3 h na 37 °C, nato pa inducirali izražanje proteinov z dodatkom 0,6 % L-arabinoze in nadalje stresali preko noči na 37 °C. Suspenzije smo nato centrifugirali 5 min na 3000 g, zavrgli supernatant in bakterijske pelete raztopili v 50 μL reagenta B-PER II ter bakterije s pomočjo močnega vrtnčenja lizirali. Lizate smo nato 20-krat redčili v pufru TBST in jih nato brez nadaljnega čiščenja uporabili v presejalnih testih ELISA, kot je opisano spodaj.

3.2.4.2 Izražanje DARPinov v *E. coli* XL-1 Blue v velikem obsegu

Vektorje pQE30 z vstavljenimi zapisi za posamezne DARPinov smo transformirali v bakterijski sev *E. coli* XL-1 Blue. Posamezne kolonije smo inokulirali v 100 mL LB gojišča z ampicilinom in stresali preko noči na 37 °C. Naslednji dan smo 1 mL prekonočne kulture inokulirali v 1 L svežega LB gojišča z ampicilinom in stresali na 37 °C, dokler ni gostota bakterijskih celic narasla do $A_{600} = 0,8$. Takrat smo inducirali izražanje DARPinov z 1 mM IPTG ter nadaljnje 3 h stresali na 37 °C. Suspenzijo smo nato centrifugirali 5 min na 6000 g, zavrgli supernatant in bakterijske pelete resuspendirali v vezavnem pufru z dodanim lizocimom (100 mg L^{-1}) ter zmes zamrznili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.5 Izolacija in čiščenje rekombinantnih proteinov

3.2.5.1 Priprava topne proteinske frakcije iz bakterijskih celic

Resuspendirane bakterijske pelete smo odmrznili, nato pa jih izpostavili ultrazvoku, s čimer smo razbili bakterijske membrane. Uporabili smo sonikator W450D ter inkubirali na ledu pri amplitudi 50 %, pri čemer je bil polminutni ultrazvočni pulz prekinjen s polminutnim premorom. Pazili smo, da temperatura zmesi ni prerasla 10 °C. Zmes smo

nato centrifugirali 20 min pri 13000 g in 4 °C ter topno frakcijo uporabili za izolacijo DARPinov z Ni^{2+} -afinitetno kromatografijo.

3.2.5.2 Ni^{2+} -afinitetna kromatografija

Vse kromatografske tehnike smo izvedli s pomočjo sistema Akta FPLC pri sobni temperaturi.

Uporabili smo 1 mL kolono HiTrap IMAC Sepharose FF, na kateri je bil predhodno imobiliziran Ni^{2+} po navodilih proizvajalca. Kolono smo sprali z 20 mL vezavnega pufra, nato pa pri pretoku $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ nanесли topno frakcijo iz bakterijskih celic. Sledilo je spiranje z vezavnim pufrom, dokler ni A_{280} padla do 0,01 AU. Takrat smo eluirali vezane DARPine z elucijskim pufrom ter frakcije z eluiranim proteinom združili. Raztopini z DARPini smo nato odstranili imidazol, tako da smo jih skoncentrirali na 5 % prvotnega volumna z uporabo koncentracijskih enot Amicon Ultra-15, MWCO 10 kDa. Skoncentrirano raztopino smo nato razredčili do 15 mL s pufrom za shranjevanje DARPinov ter postopek koncentriranja dvakrat ponovili. DARPine smo nato skoncentrirali do koncentracije okoli 1 mM in jih shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

V primeru čiščenja DARPinov, ki smo jih kasneje uporabili v eksperimentih s sesalskimi celičnimi kulturami in mišmi, smo med metodo Ni^{2+} -afinitetne kromatografije dodali korak za odstranjevanje bakterijskih endotoksinov. V tem primeru smo po nanosu DARPinov kolono sprali s 100 mL pufra za odstranjevanje endotoksinov na 4 °C, nato pa smo nadaljevali z elucijo.

3.2.5.3 Gelska filtracija

Z gelsko filtracijo smo čistili izolirane DARPine po Ni^{2+} -afinitetni kromatografiji, biotinizirane katepsine in DARPine po kemijskem označevanju z biotinizacijskim reagentom ter komplekse med DARPini in katepsinom B v namen kristalizacije. S to metodo smo prav tako preverili oligomerno stanje DARPinov ter preverili nastanek kompleksa med DARPinom in katepsinom B v raztopini. Uporabili smo kolono Superdex 200 10/300 GL pri pretoku $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ v primeru analitske ločbe in HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR pri pretoku $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ v primeru preparativne ločbe. Koloni smo predhodno ekvilibrirali s pufrom PBS, nato pa smo nanесли proteine in izvedli elucijo s pufrom PBS.

V primeru analitske ločbe smo frakcije po ločbi zavrgli. Izjema je bila analiza stabilnosti biotiniziranega DARPina 8h6 v vzorcu humanega seruma. V tem primeru smo posamezne frakcije po ločbi analizirali z NaDS poliakrilamidno elektroforezo ter prenosu Western in izvedli detekcijo biotiniziranega DARPina s streptavidinom, konjugiranim s HRP.

V primeru preparativne ločbe smo frakcije, ki so vsebovale željene proteinske zvrsti, združili ter jih skoncentrirali z uporabo koncentracijskih enot Amicon Ultra-15, MWCO 10 kDa, do koncentracije okoli 200 μM ter shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.5.4 Ionsko-izmenjevalna kromatografija

Konjugacija barvila Cy5.5 na DARPine povzroči spremembo v celokupnem površinskem naboju DARPina, saj skupina Cy5.5 vsebuje pozitivni naboj. Zaradi tega je možna ločitev konjugiranega DARPina od nekonjugiranega, s čimer izoliramo čisti konjugiran DARPin. Uporabili smo anionsko-izmenjevalno kolono MonoQ 5/50 GL, ki smo jo predhodno ekvilibrirali s pufrom A. Nato smo nanесли vzorec DARPina po konjugaciji z barvilom Cy5.5, ki smo mu predhodno izmenjali pufer s pufrom A. Sledila je gradientna elucija, kjer smo pufru A z gradientom $2,5 \% \cdot \text{mL}^{-1}$ dodajali pufer B. Frakcije, ki so vsebovale kemijsko modificiran DARPin, smo združili in jih skoncentrirali z uporabo koncentracijskih enot Amicon Ultra-15, MWCO 10 kDa, do koncentracije okoli 200 μM ter očiščene DARPine shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.6 Merjenje proteinskih interakcij

3.2.6.1 ELISA celokupnih bakterijskih lizatov

S to metodo smo izvedli prvi presejalni test obogatene knjižnice DARPinov po ribosomalni predstavitvi, da smo identificirali potencialne selektivne vezavne proteine za katepsin B. Analizirali smo 1140 celokupnih bakterijskih lizatov z izraženimi kloni DARPinov po ribosomalni predstavitvi. Uporabili smo prozorne mikrotitrne plošče s 396 luknjicami ter avtomatizirano postajo za spiranje ELISA plošč. Metodo smo izvedli po sledečem protokolu na 4 °C ob konstantnem stresanju plošč:

- Imobilizacija proteina A na površino plošč: inkubacija (preko noči) 20 µL raztopine proteina A ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) v PBS
- Blokiranje nespecifičnih vezavnih mest: inkubacija (1 h) 120 µL pufra TBST-BSA
- Spiranje: trikrat 120 µL pufra TBS
- Vezava protiteles proti histidinskemu privesku: inkubacija (1 h) 20 µL raztopine protiteles ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) v pufru TBST-BSA
- Spiranje: trikrat 120 µL pufra TBS
- Vezava DARPinov iz celokupnih bakterijskih lizatov: inkubacija (1 h) 20 µL raztopine celokupnih bakterijskih lizatov
- Spiranje: trikrat 120 µL pufra TBS
- Vezava biotiniliranih katepsinov: inkubacija (1 h) 20 µL raztopine biotiniliranih katepsinov B ali S (50 nM) v pufru TBST-BSA
- Spiranje: trikrat 120 µL pufra TBS
- Vezava streptavidina, konjugiranega s HRP: inkubacija (1 h) 20 µL raztopine streptavidina, konjugiranega s HRP ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) v pufru TBST-BSA
- Spiranje: štirikrat 120 µL pufra TBS
- Razvijanje: inkubacija (30 min pri 37 °C) 20 µL raztopine za razvijanje ELISA
- Merjenje A₄₀₅ s čitalnikom mikrotitrskih plošč Tecan Infinite M1000

3.2.6.2 Afinitetni pH test

Z afinitetnim pH testom smo preverili ohranjanje vezave DARPinov za katepsin B pri pH 7, pH 6 in pH 5. Uporabili smo prozorne mikrotitrne plošče s 96 luknjicami po sledečem protokolu na 4 °C:

- Imobilizacija DARPinov na površino plošč: inkubacija (preko noči) 100 µL raztopine DARPina (200 nM) v PBS
- Blokiranje nespecifičnih vezavnih mest: inkubacija (1 h) 300 µL pufra TBST-BSA
- Spiranje: trikrat 300 µL pufra za afinitetni pH test z ustreznim pH
- Vezava biotiniliranih katepsinov: inkubacija (1 h) 100 µL raztopine biotiniliranih DARPinov (padajoče koncentracije od 1 µM do 1 pM) v pufru za afinitetni pH test z ustreznim pH
- Spiranje: dvakrat 300 µL pufra za afinitetni pH test z ustreznim pH, nato enkrat 300 µL s pufrom TBST-BSA
- Vezava streptavidina, konjugiranega s HRP: inkubacija (1 h) 100 µL raztopine streptavidina, konjugiranega s HRP ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) v pufru TBST-BSA

- Spiranje: štirikrat 300 μ L pufra TBS
- Razvijanje: inkubacija (30 min pri 37 °C) 100 μ L raztopine za razvijanje ELISA
- Merjenje A_{405} s čitalnikom mikrotitrskih plošč Tecan Infinite M1000

3.2.6.3 Afinitetni test za določanje selektivnosti DARPinov

Z afinitetnim testom smo preverili selektivnost izbranih DARPinov za katepsin B v primerjavi s katepsini S, K, L in X. Uporabili smo prozorne mikrotitrne plošče s 96 luknjicami po sledečem protokolu na 4 °C:

- Imobilizacija katepsinov na površino plošč: inkubacija (preko noči) 100 μ L raztopine katepsina (200 nM) v PBS
- Blokiranje nespecifičnih vezavnih mest: inkubacija (1 h) 300 μ L pufra TBST-BSA
- Spiranje: trikrat 300 μ L pufra TBS
- Vezava biotiniliranih DARPinov: inkubacija (1 h) 100 μ L raztopine biotiniliranih DARPinov (padajoče koncentracije od 1 μ M do 1 pM) v pufu TBST-BSA
- Spiranje: trikrat 300 μ L pufra TBS
- Vezava streptavidina, konjugiranega s HRP: inkubacija (1 h) 100 μ L raztopine streptavidina, konjugiranega s HRP (1 μ g · mL⁻¹) v pufu TBST-BSA
- Spiranje: štirikrat 300 μ L pufra TBS
- Razvijanje: inkubacija (30 min pri 37 °C) 100 μ L raztopine za razvijanje ELISA
- Merjenje A_{405} s čitalnikom mikrotitrskih plošč Tecan Infinite M1000

3.2.6.4 Površinska plazmonska resonanca (SPR)

Izbrane DARPine smo analizirali s površinsko plazmonsko resonanco, da smo določili kinetične parametre vezave na humani in mišji katepsin B. Uporabili smo aparaturo ProteOn XPR36 in čip za merjenje interakcij NLC, ki je prevlečen z neutravidinom. Meritve smo izvedli pri 15 °C v pufu PBST.

Na čip smo najprej pri pretoku 30 μ L · min⁻¹ imobilizirali biotiniliran katepsin B (100 nM) do odziva 700 RU. Po spiranju do ustaljene bazne linije smo preko čipa spustili pet raztopin s padajočimi koncentracijami DARPinov v pufu PBST. Nanesli smo 250 μ L vsake raztopine pri pretoku 100 μ L · min⁻¹, nato pa spirali s pufom PBST vsaj eno uro in vseskozi spremljali odziv. S programom ProteOn Manager Software smo ovrednotili kinetične parametre interakcije med DARPini in katepsinom B, pri čemer smo uporabili prileganje modelu heterogenega liganda (Bravman in sod., 2006).

3.2.7 Kemijsko označevanje proteinov

3.2.7.1 Biotinilacija katepsinov z EZ-link-LC-LC-NHS-biotin

Rekombinantne katepsine smo razredčili v 15 mL pufra PBS na 4 °C ter jih skoncentrirali do koncentracije 100 μ M z uporabo 15 mL koncentracijskih enot Amicon 10K. Nato smo jih inkubirali 2 h na 4 °C z dvanajstkratnim molarnim prebitkom reagenta EZ-link-LC-LC-NHS-biotin. N-hidroksi sukcinimid estrska skupina biotinilacijskega reagenta lahko reagira s številnimi nukleofilnimi skupinami, vendar v nevtralnem pH le s primarnimi aminskimi skupinami tvori stabilne amidne vezi, medtem ko hidroksilne in sulfhidrilne skupine tvorijo nestabilne vezi, ki v vodnem mediju hitro hidrolizirajo. V našem primeru je potekla reakcija s primarnimi aminskimi skupinami na N-terminu in lizinskih

aminokislinskih ostankih katepsinov. Vzorce biotiniliranih katepsinov smo nato očistili na gelski izključitveni kromatografiji, kot je opisano zgoraj.

3.2.7.2 Označevanje DARPinov z maleimid-Cy5.5 ali maleimid-PEG2-biotin

Za označevanje DARPinov, modificiranih s cisteinom na C-terminu, smo uporabili različici fluorofora Cy5.5 ali biotin-PEG2, ki imata konjugirano maleimidno skupino. Dvojna vez maleimida v nevtralnem pH reagira z nukleofilnimi skupinami, kot sta sulfhidrilna ali aminska, a je hitrost reakcije s sulfhidrilno skupino približno tisočkrat večja, zato lahko v proteinih kvantitativno označimo cisteine.

DARPin (500 μM) smo najprej inkubirali s 50 mM TCEP, ki smo ga predhodno nevtralizirali s KOH za 30 min na sobni temperaturi, da smo reducirali potencialne intermolekularne disulfidne vezi. Nato smo odstranili presežek reagenta TCEP z uporabo kolone za razsoljevanje PD-10 po navodilih proizvajalca. Pri tem smo uporabili pufer PBS, ki smo ga predhodno prepicali z dušikom.

Nato smo DARPinom (500 μM) dodali dvakratni molarni prebitek maleimid-Cy5.5 oziroma dvajsetkratni molarni prebitek maleimid-PEG2-biotin ter inkubirali na sobni temperaturi 90 min. Preostanek maleimidnega reagenta smo reagirali z dodatkom 5 mM DTT in nadaljnjo inkubacijo za 30 min. Vse korake konjugacije s Cy5.5 smo izvedli v temi.

Vzorce po konjugaciji s Cy5.5 smo nato razsolili z uporabo kolone za razsoljevanje PD-10, pri čemer smo kolono ekvilibrirali s pufrom A. Zaradi prisotnosti manjše koncentracije nekonjugiranih DARPinov smo te ločili od konjugiranih DARPinov z uporabo anionske izmenjevalne kromatografije, kot je opisano zgoraj.

Vzorce po konjugaciji s PEG2-biotin smo očistili z uporabo gelske filtracije, kot je opisano zgoraj.

3.2.8 Analiza proteinov

3.2.8.1 Določanje proteinske koncentracije

Koncentracijo izoliranih proteinov smo določili z merjenjem A_{280} z aparaturo NanoDrop in upoštevanjem molarnega ekstinkcijskega koeficienta ϵ_{280} za merjeni protein po formuli $c = A_{280} \cdot \epsilon_{280} \cdot l$, pri čemer je l dolžina optične poti.

Koncentracijo proteinske zmesi smo določali po prilagojeni metodi po Bradfordu, kjer barvilo Coomassie Brilliant Blue G-250 po vezavi na bazične in aromatske aminokislinske ostanke spremeni absorpcijski maksimum iz 465 nm na 595 nm. Kot eksterni standard smo uporabili raztopino govejega serumskega albumina v območju 1–10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. V jamice v mikrotitrski plošči s 96 luknjicami smo odpipetirali ustrezne volumne založne raztopine BSA in redčenih vzorcev, dopolnili z dH_2O do 160 μL ter dodali 40 μL 5 $\times$ raztopine BioRad Reagent ter premešali s pipetiranjem. A_{595} smo izmerili z bralnikom mikrotitrskih plošč Tecan Infinite M1000 ter iz umeritvene premice eksterne standarda izračunali proteinsko koncentracijo vzorcev.

3.2.8.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

V model za pripravo gelov smo vlili raztopino ločevalnega gela do višine približno 2 cm pod robom in dodali 0,5 mL 2-propanola, ki izravna površino. Po 30 min smo n-butanol sprali s H_2O , na strjeni ločevalni gel pa smo nanесли raztopino koncentracijskega gela in dodali glavniček, ki izoblikuje žepke. Po 30 min smo glavničke odstranili.

Gele v steklenih modelih smo predstavili v kadičke za elektroforezo ter kadičke napolnili s pufrom za NaDS-PAGE. V jamice smo nanесли vzorce, poleg njih pa še 6 μL raztopine velikostnih standardov za NaDS-PAGE. Elektroforeza je tekla do ločitve standardov pri konstantnem toku 0,8 $\text{mA} \cdot \text{cm}^2$ gela.

3.2.8.3 Prenos Western in imunološka detekcija proteinov

Nitrocelulozno membrano in filter papirje velikosti poliakrilamidnega gela smo za nekaj sekund namočili v pufer za prenos Western, nato pa sestavili enoto za prenos Western. Na tri filter papirje smo položili membrano, nanjo gel in dodali še tri filter papirje. Pazljivo smo odstranili morebitne zračne mehurčke, ki bi motili prenos. Sestavljen model smo vstavili v kadičko za prenos Western, tako da je bila membrana na strani pozitivne anode in gel na strani negativne katode. Prenos je tekel 2 h pri toku 250 mA.

Membrano smo nato inkubirali 30 min pri sobni temperaturi v raztopini pufra TBST-BSA, da smo blokirali nespecifična vezavna mesta za proteine. Nato smo jo preko noči inkubirali na 4 °C v raztopini primarnih protiteles ali streptavidin, konjugiran s HRP, v TBST-BSA. Sledilo je enourno spiranje s pufrom TBST, ki smo ga večkrat zamenjali. V primeru detekcije s protitelesi smo membrano nato inkubirali 1 h v raztopini sekundarnih protiteles, ki so bila konjugirana s HRP, in ponovno 1 h spirali s pufrom TBST. Detekcijo smo izvedli z metodo ojačane kemiluminiscence s komercialnim kompletom Amersham ELC Western Blotting Detection Reagents po navodilih proizvajalca. Kemiluminiscenca se razvije le na področjih, kjer je konjugiran encim HRP. Membrano smo položili v petrijevko in nanjo nanesli 1 mL sveže pripravljene raztopine za kemiluminiscenco ter inkubirali 2 min. Nato smo membrano položili v svetlobotesno enoto Hypercassette™, jo prekrili s prozorno plastično folijo ter v temnici nanjo položili fotografski film in kaseto zaprli. Po 1–20 min smo film vložili v avtomatiziran razvijalec, kjer film potuje preko raztopine vode, utrjevalca in še ene raztopine vode.

3.2.8.4 Detekcija proteinov s fluorescentnim skenerjem Typhoon

NaDS-PAGE gel po elektroforezi smo stresali 30 min z raztopino za fiksiranje, nato pa smo izvedli fluorescentno skeniranje gela z uporabo vzbujevalnega laserja z valovno dolžino 650 nm in emisijskega filtra R670, ki prepušča svetlobo z višjimi valovnimi dolžinami od 670 nm.

3.2.8.5 Analiza proteinov z masno spektrometrijo

Uspešnost biotinilacije katepsinov smo preverili tudi z masno spektrometrijo, kar je izvedel dr. Robert Vidmar. Vzorce po biotinilaciji smo analizirali z masnim spektrometrom MALDI-TOF, kjer smo izmerili razmerja molekulskih mas in nabojev (m/z) proteinov. Raztopino matrice smo pripravili iz 7,6 mg 2',4'-dihidroksiacetofenona v 375 μ L etanola in 125 μ L (10 μ mol) diamonijevega hidrogena citrata. Vzorce smo pripravili z mešanjem enakih volumnov proteinskih vzorcev, 2 % trifluoroocetne kisline in raztopine matrice, nato pa smo 1 μ L zmesi nanesli na jekleno površino. Zmes smo posušili na sobni temperaturi in analizirali z masnim spektrometrom. Meritve mase smo izvedli na masnem spektrometru UltrafleXtreme III MALDI-TOF/TOF (Bruker) in jih procesirali ter kalibrirali v programu FlexControl 3.0 in FlexAnalysis (Bruker). Parametre za meritve pozitivnih ionov v območju 10 - 50 kDa so bili:

- ionski izvor 1: 25 kV
- ionski izvor 2: 23 kV
- reflektor 1: 26,4 kV
- reflektor 2: 13,3 kV
- ekstrakcija nabitega iona: 380 ns
- napetost na linearnem detektorju: 2500 V.

Eksterno kalibracijo smo izvedli s proteinom A in tripsinogenom.

3.2.9 Encimska kinetika

3.2.9.1 Test selektivnosti pametnih substratnih sond

Katepsine B, K, L, S in V smo v črni mikrotitrski plošči razredčili v pufru BANA do koncentracije 50 nM in inkubirali na 37 °C 15 min. Nato smo dodali pametno substratno sondo do končne koncentracije 10 µM in zasledovali naraščanje fluorescence ob vzbujujanju pri 670±5 nm in emisiji 690±5 nm.

3.2.9.2 Določanje kinetičnih parametrov za encimsko pretvorbo fluorescentnih substratov in pametnih substratnih sond

Kinetične parametre (K_M , k_{cat}) encimske hidrolize fluorescentnega substrata z-Arg-Arg-AMC s katepsinom B ali pametnih substratnih sond s katepsinom S smo določili s standardnimi protokoli za meritev encimske kinetike. Katepsin smo najprej inkubirali v pufru BANA 15 min na 37 °C, nato pa smo dodali substrat v osmih različnih koncentracijah, ki so bile v rangi velikosti med $0,1 \cdot K_M$ in $10 \cdot K_M$. Nato smo spremljali naraščanje fluorescence na čitalniku mikrotitrskih plošč Tecan Infinite M1000. Meritve smo izvedli z vzbujujanjem pri 370±5 nm in emisiji pri 460±5 nm za fluorofor AMC ter z vzbujujanjem pri 670±5 nm in emisiji pri 690±5 nm za fluorofor Cy5.5. Začetne hitrosti encimske reakcije (v_0) smo določili iz naklona naraščanja fluorescentnega signala po času. Z uporabo programa Prism (Graphpad) smo z metodo nelinearne regresije analizirali odvisnost v_0 od koncentracije substrata po formuli:

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad 3.1$$

kjer je v_{max} maksimalna hitrost, K_M Mihaelis-Mentenina konstanta, $[S]$ pa koncentracija substrata.

3.2.9.3 Določanje vpliva liposomov na kinetične parametre pametnih substratnih sond

Liposome smo pripravili z metodo iztiskanja preko membrane (Mikhaylov in sod., 2011). V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 µL L-α-fosfatidilholina v kloroformu (začetna koncentracija 30 mM). Nato smo v koncentradorju 5301 (Eppendorf) odparili topilo ter pelet resuspendirali v 1 mL pufru PBS, tako da je bila končna koncentracija lipidov 3 mM. Zmes smo inkubirali 30 min pri sobni temperaturi, nato pa smo izvedli filtracijo preko membrane s porami 100 nm z aparaturo za iztiskanje Mini Extruder (Avanti Polar Lipids). Zmes smo preko membrane iztisnili enajstkrat, nato pa shranili pripravljene liposome na 4 °C do nadaljnje uporabe. Določili smo vpliv dodatka različnih koncentracij liposomov na začetno intenziteto signalov substratnih sond, tako da smo sonde inkubirali v prisotnosti različnih koncentracij liposomov 15 min in izmerili fluorescentni signal. Poleg tega smo določili vpliv dodatka liposomov na kinetične parametre (K_M in k_{cat}) procesiranja sonde s katepsinom S. V tem primeru smo poskus izvedli enako kot v poglavju 3.2.9.3, le da smo v pufer dodali 0,1 % liposomov.

3.2.9.4 Test katepsinske inhibicije DARPinov

Katepsine B (1 nM), L (1 nM), K (1 nM), S (10 nM) ali X (250 nM) smo inkubirali s presežnimi koncentracijami DARPinov (10 µM) v 90 µL pufru BANA-BSA 15 min pri 37 °C. Nato smo dodali 10 µL raztopine s substratom (z-Arg-Arg-AMC za katepsin B, z-Arg-Arg-AMC za ostale katepsine) do končne koncentracije 20 µM in takoj začeli z meritvijo fluorescence na čitalniku mikrotitrskih plošč Tecan Infinite M1000. Merili smo z vzbujujanjem pri 370±5 nm in emisiji pri 460±5 nm. Začetne hitrosti encimske reakcije smo določili iz naklona naraščanja fluorescentnega signala po času in s tem dobili začetne

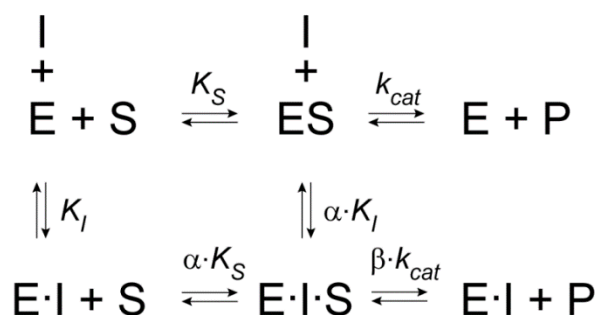
hitrosti v odsotnosti inhibitorja (v_0) in v prisotnosti inhibitorja (v_i). Rezidualno aktivnost smo definirali kot:

$$v_{rez} = \frac{v_i}{v_0} \cdot 100\% \quad 3.2$$

3.2.9.5 Določanje kinetičnih parametrov inhibicije katepsina B z DARPini

Za DARPina *8h6* in *81* smo določili kinetične parametre inhibicije za katepsin B v skladu z opisanimi metodami iz literature (Baici, 1981; Szedlacsek in sod., 1988). Meritve smo izvedli v črnih mikrotitrskih ploščah s 96 luknjicami na čitalniku mikrotitrskih plošč Tecan Infinite M1000 pri 37 °C.

Tip inhibicije smo določili v skladu z metodo splošnega modifikatorja (Slika 11), ki upošteva možnost tako inhibicije kot aktivacije encima, pa tudi hiperboličnosti same modifikacije. Zaradi preglednosti bo uporabljen izraz inhibitor (in okrajšava I) namesto modifikator, čeprav metoda velja splošno za vse vrste modifikatorje. K_I označuje konstanto inhibicije, α parameter kompetitivnosti inhibicije, β pa parameter hiperboličnosti inhibicije.



Slika 11: Shematski prikaz encimske inhibicije v skladu z metodo splošnega modifikatorja. Zaradi preglednosti je uporabljen znak I za inhibitor, čeprav shema in kinetična karakterizacija velja tudi v primeru aktivatorjev encimske aktivnosti.

Za to smo najprej določili K_M za substrat z-Arg-Arg-AMC za katepsin B, kot je opisano zgoraj. Nato smo inkubirali 1 nM katepsin B s padajočimi koncentracijami DARPina (400 nM do 25 nM) ali brez DARPina v 90 μL pufra BANA za 15 min. Temu smo dodali padajoče koncentracije substrata z-Arg-Arg-AMC (600 μM do 75 μM) in merili fluorescenco. Začetne hitrosti encimske reakcije smo določili iz naklona naraščanja fluorescentnega signala po času. Definirali smo

$$\sigma = \frac{[S]}{K_M} \quad 3.3$$

in načrtali grafe odvisnosti

$$\frac{v_0}{v_i} = f\left(\frac{\sigma}{1 + \sigma}\right) \quad 3.4$$

za posamezne koncentracije inhibitorjev in z metodo linearne regresije prilegali točke na premico. Ta graf, ki ga imenujemo tudi primarni graf specifične hitrosti (Baici, 1981), okarakterizira splošna enačba za vse tipe inhibitorjev encimske aktivnosti

$$\frac{v_0}{v_i} = \frac{[I] \cdot \left(\frac{1}{\alpha \cdot K_I}\right)}{1 + \beta \cdot \frac{[I]}{\alpha \cdot K_I}} \cdot \frac{\sigma}{1 + \sigma} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{1 + \beta \cdot \frac{[I]}{\alpha \cdot K_I}} \quad 3.5$$

Nato smo poiskali presečišče nastalih premic na tem grafu z ordinato pri $\frac{\sigma}{1 + \sigma} = 0$ in vrednost $\frac{v_0}{v_i}$ tega presečišča poimenovali a. Podobno smo naredili z ordinato pri $\frac{\sigma}{1 + \sigma} = 1$ in $\frac{v_0}{v_i}$ vrednost tega presečišča poimenovali b.

Sledi, da je

$$a = \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{1 + \frac{\beta \cdot [I]}{\alpha \cdot K_I}} \quad 3.6$$

in

$$b = \frac{1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_I}}{1 + \frac{\beta \cdot [I]}{\alpha \cdot K_I}} \quad 3.7$$

Preurejanje enačbe 3.5 vodi do odvisnosti

$$\frac{a}{a - 1} = \frac{\alpha \cdot K_I}{\alpha - \beta} \cdot \frac{1}{[I]} + \frac{\alpha}{\alpha - \beta} \quad 3.8$$

in

$$\frac{b}{b - 1} = \frac{\alpha \cdot K_I}{1 - \beta} \cdot \frac{1}{[I]} + \frac{1}{1 - \beta} \quad 3.9$$

kjer je $\frac{1}{[I]}$ neodvisna spremenljivka. Z metodo linearne regresije smo prilegali točke na premico in določili parametra α in β s pomočjo presečišč z ordinato.

K_I na ta način nismo mogli določiti zaradi tesne vezave inhibitorja na encim v meritvenem območju, zaradi česar ne moremo predpostaviti konstantne koncentracije inhibitorja, ki je potrebna predpostavka za natančno veljavnost zgornjih enačb. Za določitev K_I inhibitorja s tesno vezavo smo zato ponovno izvedli meritve inhibicije pri konstantni koncentraciji substrata in 15 različnih koncentracijah inhibitorja v rangi velikosti $[I] = 2 \cdot [E]$ do $[I] = 100 \cdot [E]$. Nato smo načrtali graf odvisnosti v_{rez} od $[I]$ in točke z metodo nelinearne regresije prilegali enačbi

$$v_{rez} = \frac{1}{2} \cdot \left[\frac{\alpha + \sigma - \beta \cdot (1 + \sigma)}{\alpha + \sigma} \right] \cdot \left\{ \sqrt{\left(\frac{1 + \sigma}{\alpha + \sigma} \cdot \frac{\alpha \cdot K_I}{[E]} + \frac{[I]}{[E]} - 1 \right)^2 + 4 \cdot \frac{1 + \sigma}{\alpha + \sigma} \cdot \frac{\alpha \cdot K_I}{[E]} + \frac{\alpha + \sigma + \beta \cdot (1 + \sigma)}{\alpha + \sigma - \beta \cdot (1 + \sigma)} - \frac{1 + \sigma}{\alpha + \sigma} \cdot \frac{\alpha \cdot K_I}{[E]} - \frac{[I]}{[E]} } \right\} \quad 3.10$$

pri čemer smo uporabili parametre α in β , pridobljene iz sekundarnega grafa specifične hitrosti, parameter K_I pa smo iterativno prilagajali do najboljšega ujemanja krivulje (Szedlacsek in sod., 1988).

3.2.10 Določanje tridimenzionalne strukture kompleksov Katepsina B z DARPin

3.2.10.1 Gojenje kristalov

Katepsin B ter DARPin *81* oziroma DARPin *8h6* smo zmešali v molarjem razmerju 1:2 v pufru PBS ter inkubirali na sobni temperaturi 10 min. Komplekse smo očistili z gelsko filtracijo, kot je opisano zgoraj, ter jih skoncentrirali do koncentracije $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ z uporabo 15 mL koncentracijskih enot Amicon 10K. Kristalizacijske pogoje smo določili s presejalnimi testi v 96-luknjičnem formatu s 100 nL kapljicami, nanesenimi s pomočjo kristalizacijskega robota Gryphoon za kristaliziranje ter Qiagenovih presejalnih testov v ploščah s 96 luknjicami. Rast kristalov smo spremljali na sistemu za slikanje kristalov RI1000. Pogoje, v katerih so kristali rastle uspešno, smo ponovili v večjih volumnih. Za kompleks Katepsina B in DARPina *8h6* so bili to pogoji 0,1 M natrijev citrat, pH = 4,0, 15 % PEG6000, za kompleks Katepsina B in DARPina *81* pa 0,1 M MES, 1,8 M amonijev sulfat. Kristale smo prepojili s pufrom z dodanim 25 % glicerolom ter do uporabe shranili v tekočem dušiku.

3.2.10.2 Snemanje rentgenske difrakcije in določitev kristalne strukture z metodo molekulske zamenjave

Snemanje rentgenske difrakcije in molekulsko zamenjavo je opravil dr. Miha Renko na postaji za makromolekularno kristalografijo MX-14.1 (Sinhrotron Desy, Berlin). Difrakcijske podatke smo obdelali s programom XDSAPP/XDS. Molekulsko zamenjavo za določitev strukture smo opravili na osnovi poznane tridimenzionalne strukture Katepsina B v kompleksu z nitroksolinom (PDB ID: 3A18) ter strukture DARPina *E3_5* (PDB ID: 4J7W). Optimizacijo geometrije in kristalografskih parametrov (angl. refinement) je opravil prof. dr. Dušan Turk s programi REFMAC in MAIN (Turk, 2013). Vse slike smo pripravili s programom PyMOL.

3.2.11 Metode dela s sesalskimi celicami

3.2.11.1 Gojenje in pasažiranje celic

Vse celice smo gojili v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂. Celice MDA-MB-231, MCF-7 in PyMT smo gojili v mediju DMEM z dodatkom 10 % FBS (fetal bovine serum), 1 % penicilin/streptamicin in 2 mM L-Gln. Celice 4T1 smo gojili v mediju RPMI z dodatkom 10 % FBS, 1 % penicilin/streptamicin in 2 mM L-Gln. Celice THP-1 in L929 smo gojili v mediju RPMI-1640 z dodatkom 10 % FBS-HI (fetal bovine serum), 1 % penicilin/streptamicin in 2 mM L-Gln.

3.2.11.2 Spremljanje vezave protiteles in DARPinov s Katepsinom B na površini celic

Na črno mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami s prozornim dnom smo nasadili $4 \cdot 10^4$ celic in jih gojili preko noči. Nato smo celice inkubirali 1 h na 4 °C, da smo blokirali aktivno endocitozo, in vse nadaljnje korake izvedli pri 4 °C. Celicam smo nato dodali raztopino

primarnih protiteles proti katepsinu B ali biotiniliran DARPin (100 nM) v pufru PBS-BSA ter inkubirali 1 h. Celice smo nato trikrat sprali s PBS, nato pa inkubirali z raztopino fluorescentnih sekundarnih protiteles ali fluorescentnega streptavidina v pufru PBS-BSA za 1 h. Po ponovnem spiranju s pufrom PBS smo izmerili fluorescenco s čitalnikom mikrotitrskih plošč pri valovni dolžini vzbujanja 488 ± 5 nm in emisiji 520 ± 5 nm. Fluorescenco smo izmerili na devetih lokacijah v vsaki luknjici. Pri analizi rezultatov smo odšteli fluorescenco ozadja, ki je ustrezala povprečni fluorescenci v luknjicah, kjer smo inkubirali le fluorescentna sekundarna protitelesa ali le fluorescentni streptavidin. Izvedli smo tudi poskuse kompeticije, kjer smo katepsin B na površini celic predhodno povezali v kompleks z neoznačenim DARPinom, tako da se biotiniliran DARPin nato ni več mogel vezati. Inkubacijo z neoznačenim DARPinom (1 μ M) smo izvedli v zadnjih 30 min blokiranja endocitoze.

Spremljali smo tudi vezavo fluorescentno označenih DARPinov s katepsinom B na površini celic. V tem primeru smo celice gojili na mikroskopskih stekelcih Nunc Lab-TEK s štirimi luknjicami preko noči, nato smo blokirali aktivno endocitozo z inkubacijo na 4 °C 1 h, čemur je sledila inkubacija s fluorescentno označenim DARPinom (100 nM) na 4 °C za 15 min. Po trikratnem spiranju s PBS smo jedra celic označili z raztopino DAPI in analizirali vezavo na fluorescentnem mikroskopu.

3.2.11.3 Zasledovanje pericelularne aktivnosti katepsina B s fluorescentnim substratom z-RR-AMC

Postopek smo izvedli v skladu s (Hulkower in sod., 2000). Celice smo gojili na črnih mikrotitrskih ploščah s 96 luknjicami s prozornim dnom preko noči, da so zrastle do 80 % konfluentnosti. Celice smo nato sprali s PBS in dodali pufer PAB za 30 min. Nato smo jim dodali DARPin do končne koncentracije 100 nM ter substrat z-Arg-Arg-AMC (50 μ M) v pufru PAB in spremljali naraščajočo fluorescenco na čitalniku mikrotitrskih plošč Tecan Infinite M1000.

3.2.11.4 Diferenciacija celic THP-1 s PMA

Suspenzijske celice THP-1 ($4 \cdot 10^5$) smo nasadili na mikroskopska stekelca Nunc Lab-TEK s štirimi luknjicami. Mediju smo dodali PMA do končne koncentracije 30 ng $\cdot$ mL⁻¹ in jih gojili 48 h. V tem času so se celice diferencirale v makrofage in pri tem pritrdile na stekelca. Nato smo dodali svež medij in gojili nadaljnjih 24 h pred uporabo.

3.2.11.5 Zasledovanje aktivnosti katepsina S s pametnimi substratnimi sondami

Diferencirane celice THP-1 na mikroskopskih stekelcih Nunc Lab-TEK s štirimi luknjicami smo eno uro inkubirali v prisotnosti ali odsotnosti 10 μ M inhibitorjev cisteinskih katepsinov E64 ali E64d. Celicam smo dodali sonde v koncentraciji 5 μ M in spremljali nastanek fluorescentnega signala na fluorescentnem mikroskopu IX81, opremljenim s komoro za gojenje celic (37 °C in 5 % CO₂). Za slikanje fluorescentnega signala smo uporabili ekscitacijski (635–675 nm) in emisijski (696–736 nm) filter.

3.2.11.6 Spremljanje asociacije pametnih substratnih sond s celično membrano

Diferencirane celice THP-1 na mikroskopskih stekelcih Nunc Lab-TEK s štirimi luknjicami (Thermo Fisher Scientific) smo inkubirali 1 h na 4 °C, nato pa dodali hladen medij (RPMI-1640 z dodatkom 10 % FBS-HI (fetal bovine serum), 1 % penicilin/streptamicin in 2 mM L-Gln) s 5 μ M substratno sondo. Celice smo tako inkubirali pri 4 °C eno uro, nato pa jih sprali s PBS in dodali svež medij in jih inkubirali na 37 °C ter spremljali fluorescenčni signal z mikroskopom IX81.

3.2.12 Metode dela z mišmi

3.2.12.1 Dovoljenje etične komisije za delo z mišmi

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

3.2.12.2 Priprava primarnih tumorskih celic PyMT

Primarne PyMT tumorske celice smo izolirali iz tumorjev mlečnih žlez, kot opisano (Vasiljeva in sod., 2006). Celice smo gojili v mediju DMEM z dodatkom 10 % FBS, 1 % penicilin/streptamicin in 2 mM L-Gln. Za nadaljnje eksperimente smo uporabili le celice do 8. pasaže.

3.2.12.3 Priprava primarnih makrofagov

Predhodno smo si pripravili M-CSF, komponento za diferenciacijo makrofagov. V ta namen smo nasadili $4,7 \cdot 10^5$ celic L929 v 55 mL gojišča DMEM z 10 % FBS-HI, 1 % penicilin/streptamicin in 2 mM L-Gln v posodo T-75 za gojenje celic. Celice smo tako gojili 7 dni brez menjave gojišča, nato pa odvzeli gojišče in ga prefiltrirali skozi filter z velikostjo por $0,45 \mu\text{m}$ in shranili do uporabe na -80°C . L929 gojišče je vsebovalo M-CSF, saj celice L929 med rastjo izločajo ta rastni dejavnik.

Za pridobitev makrofagov smo uporabili 8–12 tednov stare miši seva FVB/N. Miš smo žrtvovali, nato pa smo sterilno odvzeli stegnenico in golenico ter odrezali sklepe. Kostni mozeg smo sprali iz kosti z ogretim gojiščem v sterilno 50 mL centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 200 g. Celice smo nato resuspendirali v 10 mL svežega gojišča DMEM z 20 % FBS-HI, 10 % L929 gojišča, 1 % penicilin/streptamicin in 2 mM L-Gln. Vsak drugi dan smo zamenjali gojišče s svežim, po 7 dneh pa je potekla diferenciacija iz monocitov v makrofage.

3.2.12.4 Priprava ortotopičnih modelov PyMT in 4T1

Priprava mišjih modelov PyMT in 4T1 je potekala v skladu s postopki iz literature (Mikhaylov in sod., 2011). Primarne PyMT celice oziroma celice 4T1 smo gojili do 70 % konfluentnosti, jih tripsinizirali in resuspendirali v mediju brez seruma ter $5 \cdot 10^5$ celic inokulirali v levo inguinalno mlečno žlezo miši recipientke. Za celice PyMT smo uporabili miši seva FVB, za celice 4T1 pa miši seva Balb/c. Ko so tumorji zrasli do 100–125 mm³, smo miši uporabili za neinvazivno slikanje tumorjev.

3.2.12.5 Priprava modela akutnega vnetja tačke

Za pripravo modela smo uporabili samce seva FVB/N, stare med 8 in 12 tednov. Mišji model vnetja stopala smo inducirali z intraplantarno aplikacijo 10 μL 10 mg $\cdot$ mL⁻¹ zymosan A v fiziološki raztopini, kot je bilo opisano predhodno (Caglič in sod., 2011). V kontralateralno tačko smo vbrizgali 10 μL fiziološke raztopine. Naslednji dan smo miši uporabili za neinvazivno slikanje vnetja.

3.2.12.6 Spremljanje biodistribucije fluorescentno označenih DARPinov s sistemom IVIS Spectrum

Uporabili smo miši z ortotopičnim tumorjem PyMT ali 4T1 oziroma miši z induciranim akutnim vnetjem tačke.

Mišim smo administrirali 1 nmol fluorescentno označenega DARPina in spremljali biodistribucijo nadaljnjih 72 h, nakar smo živali žrtvovali. Za spremljanje biodistribucije smo uporabili sistem IVIS Spectrum, kjer smo miši slikali v epi-fluorescentnem načinu z uporabo ekscitacijskega filtra 675 nm in emisijskega filtra 720 nm. Analizo smo izvedli v

programu Living Image Software 4.3.1 (Perkin Elmer). Za kvantifikacijo fluorescentnega signala smo izbrali enako velike regije na področju tumorja in kontralateralne mlečne žleze (model PyMT in 4T1) oziroma obeh zadnjih tačk (model vnetja). Pred vsako časovno točko in tekom slikanja smo miši uspavali z 2 % izofluoranom.

Poleg *in vivo* spremljanja biodistribucije smo analizirali tudi izolirane organe (tumor, jetra, pljuča, srce, ledvice, vranica, intra-abdominalne bezgavke) *ex vivo* ob časovnih točkah 3 h in 72 h. Pri tem poskusu smo mišim administrirali 1 nmol fluorescentno označenega DARPina in jih po ustreznem času usmrtili. Izolirali smo organe ter jih položili na petrijevko, nato pa jih slikali v sistemu IVIS Spectrum ter analizirali kot opisano zgoraj. Organe smo nato zamrznili v tekočem dušiku in jih hranili zmrznjene do nadaljnje uporabe.

3.2.12.7 Imunohistokemija tkiv

Zamrznjene tumorje miši, ki smo jim aplicirali fluorescentno označen DARPIn, smo narezali na 5 μm rezine z aparaturom kriotom, jih dehidrirali z 20 min inkubacijo na zraku, nato pa fiksirali z inkubacijo v metanolu za 5 min na 4 °C in nato v acetonu za 2 min na -20 °C. Nato smo rezine tkiv rehidrirali z inkubacijo v PBS za 15 min. Sledilo je označevanje s protitelesi proti manoznemu receptorju F4/80, ki je označevalec makrofagov. Raztopino protiteles v PBS z dodanim 12 % BSA smo inkubirali preko noči na 4 °C. Po spiranju s PBS (1 h) smo rezine inkubirali z raztopino fluorescentnih sekundarnih protiteles. Po ponovnem spiranju s PBS smo na vzorce nanесли 2 kapljici medija AntiFade in objektna stekelca prekrili s krovnim stekelcem.

Dodatno smo označili tudi jedra celic z barvilom DAPI, kar nam je omogočilo sočasno ovrednotenje lokalizacije jeder celic, makrofagov ter DARPinov s fluorescentno mikroskopijo.

3.2.12.8 *In situ* zimografija tkiv

Inhibitorni potencial DARPina *8h6* smo ovrednotili tudi z *in situ* zimografijo, kjer smo delno priredili opisan protokol iz literature (Ruettger in Wiederanders, 2007). Zamrznjene primarne tumorje PyMT smo narezali na 5 μm rezine z aparaturom kriotom, nato pa jih inkubirali z raztopino DARPina (1 μM) ali inhibitorja CA074 (1 μM) v pufru za zimografijo. V raztopini je bil sočasno še substrat za katepsin B, z-Arg-Arg-4M β NA (1 mg · mL⁻¹). Razgradni produkt 4M β NA reagira s 5-nitrosalicilaldehidom iz pufru in tvori fluorescentni produkt, ki ga lahko spremljamo s fluorescentno mikroskopijo z uporabo ekscitacijskega (470–490 nm) in emisijskega (520–560 nm) filtra.

3.2.12.9 Ovrednotenje interakcije med DARPini in katepsinom B *in vivo*

S tem poskusom smo preverili, ali DARPina *8h6* in *81* tvorita interakcijo s katepsinom B tudi *in vivo* v tumorjih. V ta namen smo uporabili 14 tednov stare transgene miši FVB/N-TgN(MMTV-PyMT), ki spontano razvijejo tumorje mlečnih žlez. Miši smo uspavali z 2 % izofluoranom, nato pa jim intratumoralno administrirali 5 nmol biotiniliranega DARPina. Po 30 min smo živali usmrtili in izolirali tumor. Vse nadaljnje korake smo izvedli pri 4 °C. Tkivne lizate smo pripravili s homogenizatorjem Ultrathurrax v 200 μL pufru za tkivne lizate. Netopni del smo ločili s centrifugiranjem pri 14000 g za 10 min, nato pa smo supernatant 30 min inkubirali z 10 μL agaroze, konjugirane s streptavidinom. Po tem smo vzorec centrifugirali 1 min pri 1000 g, pri čemer se je agarozna v mikrocentrifugirki posedla. Supernatant smo odstranili, agarozo pa resuspendirali v pufru PBS. Postopek smo ponovili še dvakrat. Zadnjič smo pelet agaroze resuspendirali v nanašalnem pufru za NaDS-PAGE ter vzorec inkubirali 5 min pri 95 °C in ga nato analizirali z NaDS-PAGE ter prenosom Western. Detekcijo smo izvedli s protitelesi proti katepsinu B oziroma s streptavidinom, konjugiranim s HRP.

3.2.13 Statistična obdelava podatkov

Vsi kvantitativni rezultati so predstavljeni kot srednje vrednosti s standardno napako. Statistične razlike smo ovrednotili s t-testom v primeru dveh skupin oziroma z enosmernim testom ANOVA v primeru več skupin. Kot statistično značilno razliko smo upoštevali, če je bila vrednost $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) in $p < 0,001$ (**).

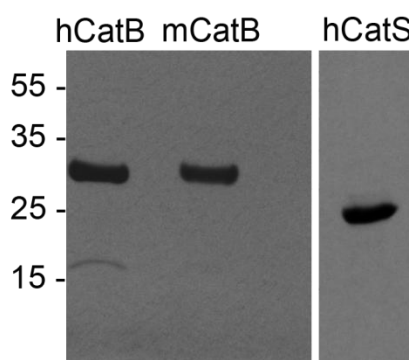
Poglavje 4

Rezultati

4.1 Priprava, karakterizacija in aplikacija selektivnih DARPinov za katepsin B

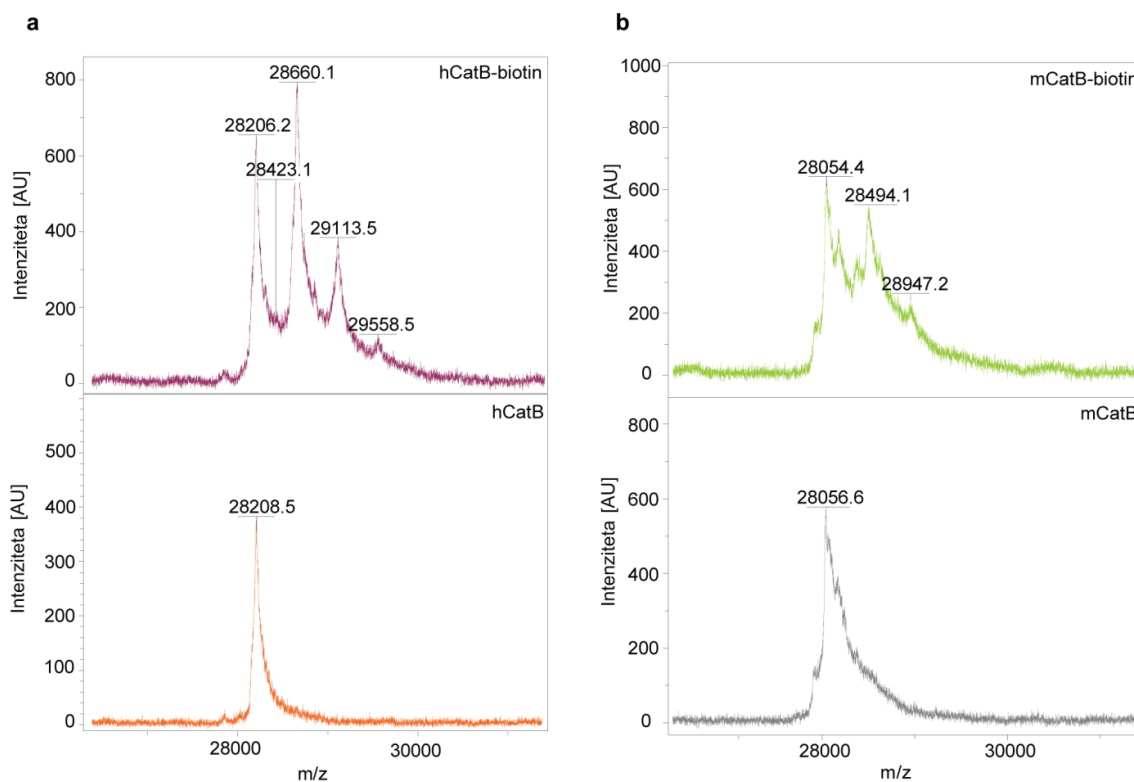
4.1.1 Biotinilacija katepsinov

Človeški in mišji katepsin B ter človeški katepsin S smo po biotinilaciji in čiščenju z gelsko filtracijo analizirali z ločevanjem na NaDS-PAGE in prenosom Western, nakar smo izvedli detekcijo s streptavidinom, konjugiranim s HRP (Slika 12). Vsi trije proteini so bili uspešno konjugirani z biotinom, na kar kažejo lise pri ustrezni velikosti (28 kDa za katepsin B, 24 kDa za katepsin S).



Slika 12: Detekcija biotiniliranih katepsinov po ločitvi na NaDS-PAGE in prenosu Western. Detekcijo smo izvedli s streptavidinom, konjugiranim s HRP.

Vzorca človeškega in mišjega katepsina B smo podrobneje analizirali z masno spektrometrijo, da smo natančneje ugotovili, koliko molekul biotina je bilo konjugiranih v postopku. Analiza z masnim spektrometrom MALDI-TOF je pokazala, da je bil v vzorcu človeškega katepsina B pred konjugacijo prisoten protein z m/z 28208, kar ustreza molekulski masi zrelega katepsina B. Po konjugaciji smo poleg nekonjugiranega katepsina (m/z 28206) opazili dodatne vrhove v masnem spektru, ki so bili po vrednosti m/z večji za 454, 908 in 1353, kar ustreza enkrat, dvakrat in trikrat biotiniliranemu katepsinu B (Slika 13a). Podobno je bil v vzorcu mišjega katepsina B pred konjugacijo prisoten le protein z m/z 28057, kar ustreza molekulski masi mišjega katepsina B. Po konjugaciji smo izmerili dodatna vrhova, ki sta bila po vrednosti m/z večja za 440 in 893, kar ustreza enkrat in dvakrat konjugiranemu mišjemu katepsinu B (Slika 13b).

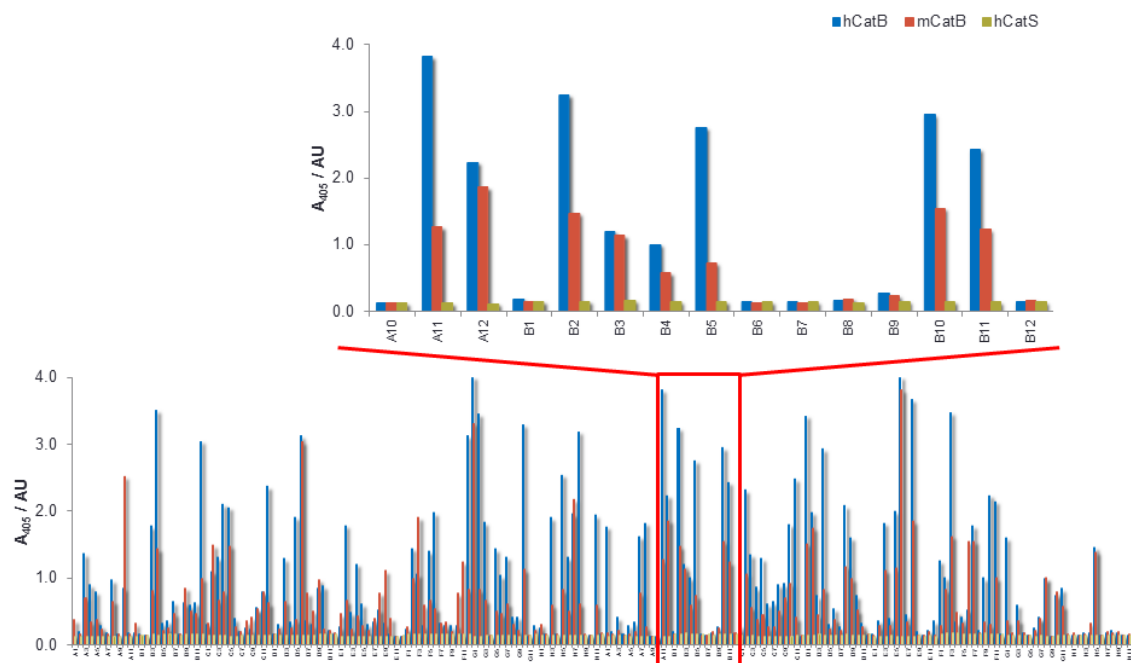


Slika 13: Masni spektri po analizi z MALDI-TOF masnim spektrometrom a) človeškega in b) miškega katepsina B pred (spodaj) in po biotinilaciji (zgoraj).

4.1.2 Selekcija selektivnih DARPinov za katepsin B

4.1.2.1 ELISA celokupnih bakterijskih lizatov

Ribosomalno predstavitev smo izvedli v skladu s shemo na Slika 10. Po četrtem in osmem krogu smo obogatene knjižnice preklonirali v ekspresijski bakterijski vektor pBXNH3 in jih transformirali v celice *E. coli* XL-1 Blue. Posamezne kolonije smo gojili v gojišču TB z ampicilinom, nato pa inducirali ekspresijo DARPinov in pripravili celokupne bakterijske lizate. S presejalnim testom ELISA smo nato preverili, kateri DARPini se vežejo na človeški ali mišji katepsin B, ne da bi se hkrati vezali na strukturno sorodni katepsin S (Slika 14).



Slika 14: Primer spektrofotometrične analize po testu ELISA celokupnih bakterijskih lizatov. DARPine v celokupnih bakterijskih lizatih smo preko proteina A in protiteles proti histidinskemu privesku imobilizirali na površino mikrotitrskih plošč. Vezane biotinizirane katepsine (človeški in mišji katepsin B, človeški katepsin S) smo detektirali s streptavidinom, konjugiranim s HRP in kolorimetrično detekcijo.

Vse DARPine, ki so v testu ELISA pokazali signal absorbance višji od 1 AU za človeški ali mišji katepsin B in hkrati signal za katepsin S manjši od 0,2 AU, smo okarakterizirali kot zadetke in rezultate zbrali v Tabela 1.

Tabela 1: Zadetki po testu ELISA celokupnih bakterijskih lizatov.

Tarča pri RD	Število krogov RD	Zaporedje tarč v krogih RD	Število analiziranih klonov	Število zadetkov za hCatB	% zadetkov za hCatB	Število zadetkov za mCatB	% zadetkov za mCatB
hCatB	4	4x hCatB	192	94	49	5	2,6
mCatB	4	4x mCatB	192	9	4,7	93	48,4
hCatB & mCatB	4	Izmenjava tarč	192	93	48	70	36,5
hCatB & mCatB	8	4x hCatB, nato 4x mCatB	192	29	15	16	8,3
hCatB & mCatB	8	4x mCatB, nato 4x hCatB	192	8	4,2	7	3,6
hCatB & mCatB	8	Izmenjava tarč	192	59	31	48	25

Nato smo izbrali 50 klonov DARPinov, ki so v testu ELISA pokazali najvišje signale, in preverili njihova zaporedja. Med njimi je bilo 43 unikatnih sekvenc brez neželenih insercij ali delecij. Te DARPine smo nato preklonirali v vektor pQE30 in jih izrazili v večji količini. Po čiščenju na Ni-afinitetni kromatografiji smo z gelsko filtracijo preverili oligomerno stanje DARPinov. Od 43 DARPinov jih je 27 v manjši meri tvorilo dimere ali višje oligomere, preostali pa so potovali v monomerni obliki. V nadaljnjem delu smo se osredotočili na delo z devetimi DARPini (Slika 15), ki so zastopali različne sklope ribosomalne predstavitve (Slika 10), v testu ELISA pokazali najvišje signale in so na gelski filtraciji potovali kot monomeri. DARPin *4m3* je bil v postopku selekcije izpostavljen štirim krogom ribosomalne predstavitve proti mišjemu Katepsinu B. DARPina *4h1* in *4h7* sta bila izpostavljena štirim krogom ribosomalne predstavitve proti človeškemu Katepsinu B. DARPin *410* je bil izpostavljen štirim krogom ribosomalne predstavitve, kjer smo kot tarči izmenjevali človeški in mišji Katepsin B. DARPini *8h1*, *8h2*, *8h4* in *8h6* so bili izpostavljeni štirim krogom selekcije proti mišjemu Katepsinu B, ki so jim sledili štirje krogi selekcije proti človeškemu Katepsinu B. DARPin *81* pa je bil izpostavljen osmim krogom ribosomalne predstavitve, kjer smo kot tarči izmenjevali človeški in mišji Katepsin B. DARPin *E3_5* je neselektivni DARPin, naključno izbran iz izvirne knjižnice DARPinov, in je pogosto uporabljen kot negativna kontrola (Kohl in sod., 2003).

Izvirna knjižnica	MRGSHHHHHGSDLGKKLLDAASAGQDDEVIRLMANGADVNASXXXGXTPLHXAAXXGHLEIVDV	65
DARPin_E3_5	E..R.....TDND..Y....L..SN.....E..	65
DARPin_4m3	DAH..R.....A..WS.....	65
DARPin_4h1	R.....NTY..R.....V..YE.....	65
DARPin_4h7	TTY..S.....V..YH.....	65
DARPin_410	V.....NRY..R.....V..N.....	64
DARPin_8h1	G.....NRY..R.....A..TS.....	65
DARPin_8h2	M.....NRY..R.....A..AW.....	65
DARPin_8h4	NRY..R.....A..TS.....N..	65
DARPin_8h6	I.....DTY..R.....A..W.....	64
DARPin_81	NSY..R.....A..N.....	64
<i>N-terminalna ponovitev</i>		<i>IP1</i>
Izvirna knjižnica	LLAXGADVNASXXXGXTPLHXAAXXGHLEIVDVLLAXGADVNASXXXGXTPLHXAAXXGHLEIVD	130
DARPin_E3_5	..KN.....DLT..I.....L..AT.....E..KH.....YDND..H....L..KY.....E	130
DARPin_4m3	..H.....DKY..Y.....L..SY.....N.....SKY..N.....V..TS.....	130
DARPin_4h1	..Y.....DKW..W.....L..EY.....N.....STS..N.....V..KN.....	130
DARPin_4h7	..H.....TDQ..W.....A..TE.....N.....DTH..Q.....A..EY.....	130
DARPin_410	..PY.....DYW..Y.....L..AE.....V.....N.....SKR..N.....V..QS.....	129
DARPin_8h1	..Y.....DSW..Y.....L..DA.....N.....G.....SER..R.....V..SA.....	130
DARPin_8h2	..H.....DSW..Y.....L..SE.....H..T.....DAH..Q.....V..NE.....	130
DARPin_8h4	..H.....DTW..Y.....L..DT.....M..HD.....SQR..N.....V..DA.....	130
DARPin_8h6	..Y.....DKW..Y.....L..NE.....E.....N.....SQR..Q.....V..TW.....	129
DARPin_81	..Y.....DQW..Y.....L..AE.....V.....N.....SKR..N.....V..QS.....A	129
<i>IP1</i>		<i>IP2</i>
<i>IP3</i>		
Izvirna knjižnica	VLLAXGADVNASXXXGKTPFDLAIDNGNEDIAEVLQKAAKLN	172
DARPin_E3_5	...KH.....QDKF...A..IS.....L..I...LN---	169
DARPin_4m3	...H.....TAA.....	172
DARPin_4h1	...H.....TEY.....	172
DARPin_4h7	...H.....DHN.....	172
DARPin_410	...H.....NHE.....	171
DARPin_8h1	...H.....NSD.....	172
DARPin_8h2	...H.....TNT.....	172
DARPin_8h4	...H.....DAH.....T.....	172
DARPin_8h6	...N.....DRQ.....	171
DARPin_81	...H.....I.....DYN.....A.....	171
<i>IP3</i>		<i>C-terminalna ponovitev</i>

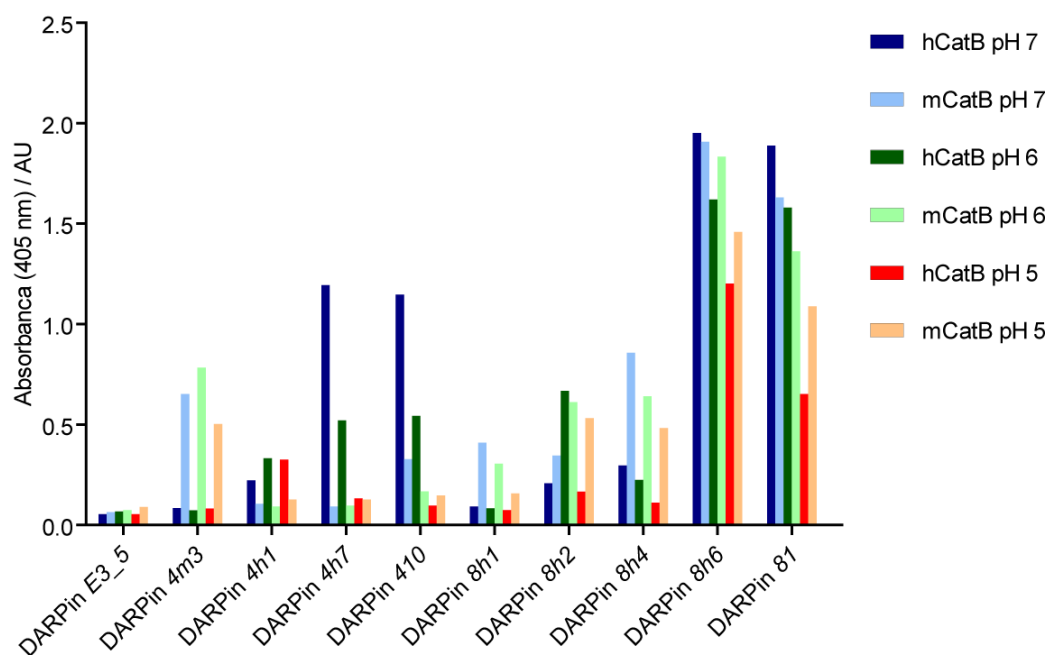
Slika 15: Aminokislinska zaporedja DARPinov, ki smo jih uporabili v presejalnih testih.

4.1.2.2 Presejalni testi DARPinov

Z izbranimi DARPini smo izvedli tri presejalne teste, s katerimi smo želeli izbrati DARPin, ki ohrani interakcijo v kislem pH, ima zelo visoko afiniteto tako za človeški kot mišji katepsin B in je inhibitor aktivnosti katepsina B. Na ta način bi lahko izbrani DARPin kasneje uporabili tudi v terapevtski aplikaciji, kjer bi inhibirali aktivnost katepsina B. Prav tako bi imel tak DARPin visoko translacijsko vrednost, saj bi ga lahko uporabili tako v mišjih predkliničnih modelih kot potencialno v kasnejši klinični aplikaciji pri ljudeh.

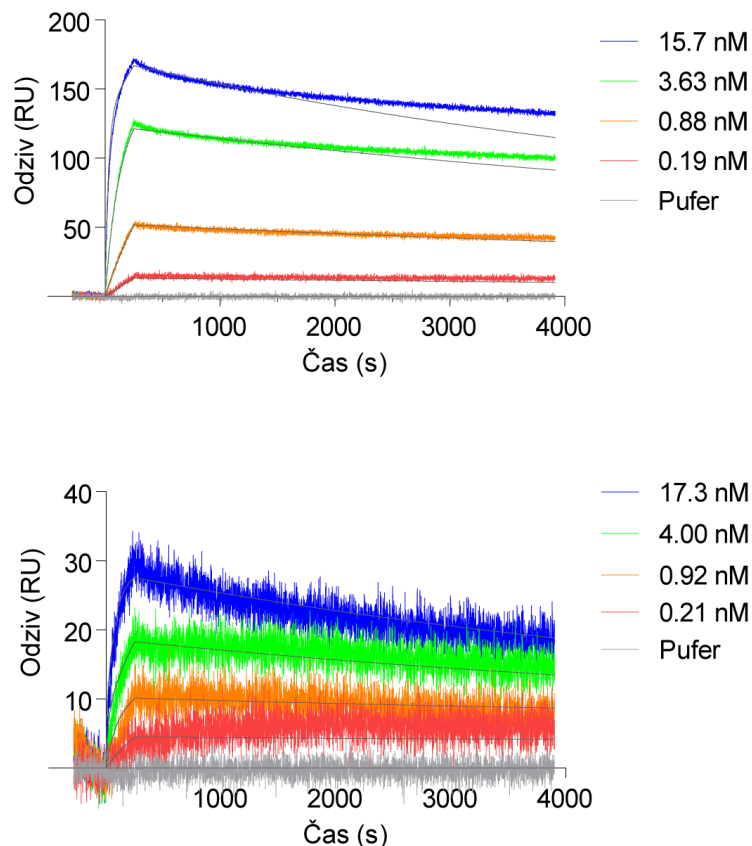
Afinitetni pH test je potrdil, da se večina DARPinov v nevtralnem pH veže na ustrezne tarče v skladu z ribosomalno predstavitvijo, medtem ko se neselektivni DARPin *E3_5* ne veže na katepsin B (Slika 16). DARPin *4m3* se je vezal le na mišji katepsin B, DARPina *4h1* in *4h7* pa le na človeški katepsin B. Preostali DARPini so bili v procesu ribosomalne predstavitve izpostavljeni tako človeškemu kot mišjemu katepsinu B in so z izjemo DARPina *8h1* tudi vsi pokazali vezavo na oba homologa. DARPin *8h1* se je vezal le na mišji katepsin B, podobno pa sta DARPina *8h2* in *8h4* kazala preferenco za vezavo na mišji katepsin B. Na drugi strani je DARPin *410* kazal preferenco za vezavo na človeški katepsin B, medtem ko DARPina *8h6* in *81* nista bistveno razlikovala med človeškim in mišjim katepsinom B.

Pri DARPinih *4h7*, *410*, *8h1*, *8h4* in *81* smo opazili tudi trend znižanja vezavne sposobnosti s kisanjem pH, kar lahko kaže na možno prisotnost aminokisline His v vezavnem mestu, ki bi pri nižanju pH spremenila naboj in preprečila vezavo. Druga možnost je znižanje stabilnosti DARPina v kislem pH ali v izbranih pufrih.



Slika 16: Afinitetni pH test DARPinov. DARPine smo imobilizirali na površino mikrotitrskih plošč, nato pa preverili vezavo katepsinov pri različnih pH in izvedli detekcijo s streptavidinom, konjugiranim s HRP in kolorimetrično detekcijo.

Nato smo preverili afinitete izbranih DARPinov do človeškega in mišjega katepsina B z metodo SPR, kot je prikazano na primeru DARPina *8h6* (Slika 17).



Slika 17: SPR senzogram za interakcije DARPina *8h6* z imobiliziranim človeškim (zgoraj) in mišjim (spodaj) katepsinom B. Podatke (barvne krivulje) smo prilegali modelu heterogenega liganda (sive krivulje).

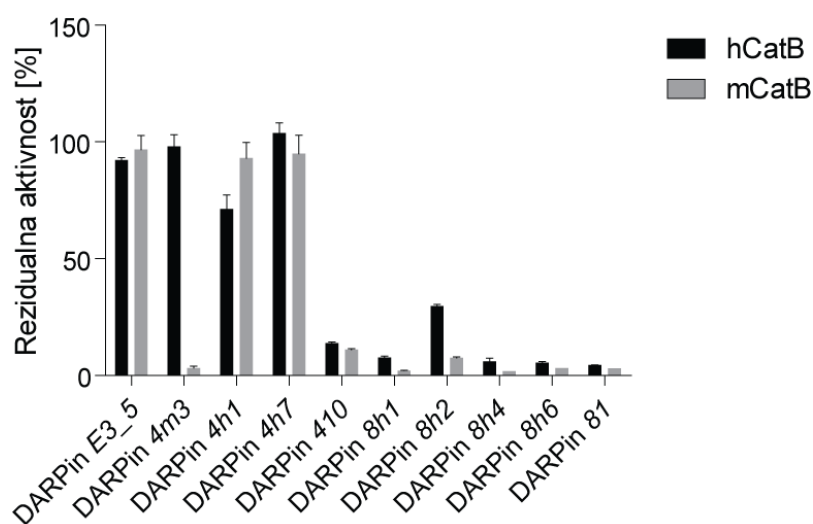
V primerih, ko slabša kvaliteta podatkov ni omogočila kvalitetnega prileganja teoretičnim modelom, smo rezultate zabeležili le kot velikostni razred K_D (Tabela 2). Meritve so ponovno pokazale, da vsi DARPini interagirajo z ustreznimi tarčami (ligand) v skladu z ribosomalno predstavitevjo. Konstante disociacije so bile v nizkem nanomolarnem oziroma v pikomolarnem območju in so kazale trend nižanja z večjim številom krogov ribosomalne predstavitve. V primeru DARPinov, ki se vežejo na oba homologa, smo izmerili nekatere razlike med vezavo na človeški ali mišji katepsin B, vendar te niso presegale reda velikosti. Vzroki za razlike v afiniteti so lahko raznoliki. Izvirajo lahko v različnih vezavnih mestih DARPina na mišjem in človeškem katepsin B, v kolikor pa je vezavno mesto enako, pa je lahko vzrok v različni strukturi katepsina B v vezavnem mestu. Možen je tudi tehničen vzrok za razliko, saj je analiza biotinilacije katepsinov z masno spektrometrijo pokazala manjše razlike v stopnji biotinilacije, ki bi lahko vplivale na vezavo, v kolikor so v okolici vezavnega mesta kateri od označenih lizinov ali N-konec proteina.

Posebno pozornost smo posvetili rezultatom za disociacijo kompleksa (k_d), ki je zelo pomembna za uspešno aplikacijo DARPinov v kasnejših poskusih. Za DARPina *8h6* in *81* smo izmerili zelo počasne disociacije, kar kaže na potencialno primernost teh DARPinov za nadaljnjo uporabo.

Tabela 2: Zbrani SPR podatki o interakcijah med DARPini in katepsinom B.

Ligand:	Človeški katepsin B				Mišji katepsin B			
	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_d [M]	χ^2 [% RU max]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_d [M]	χ^2 [% RU max]
DARPin <i>4m3</i>	Ni interakcije						$\sim 10^{-10} - 10^{-9}$	
DARPin <i>4h1</i>			$\sim 10^{-9} - 10^{-8}$		Ni interakcije			
DARPin <i>4h7</i>	$3,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-9}$	10,8	Ni interakcije			
DARPin <i>410</i>			$\sim 10^{-10} - 10^{-9}$				$\sim 10^{-10} - 10^{-9}$	
DARPin <i>8h1</i>	$2,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-10}$	10,0	$1,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-11}$	6,5
DARPin <i>8h2</i>	$9,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-8}$	3,9			$\sim 10^{-10} - 10^{-9}$	
DARPin <i>8h4</i>	$1,1 \times 10^6$	$8,5 \times 10^{-4}$	$7,8 \times 10^{-10}$	11,5			$\sim 10^{-10} - 10^{-9}$	
DARPin <i>8h6</i>	$2,1 \times 10^6$	$6,6 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^{-11}$	2,2	$7,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-10}$	12,5
DARPin <i>81</i>	$9,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^{-5}$	$3,5 \times 10^{-11}$	2,0	$1,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-10}$	16,0

Naslednji presejalni test je bil test inhibicije encimske aktivnosti katepsina B, kjer smo za vse DARPine razen za DARPine *4h1* in *4h7* izmerili znatno inhibicijo (Slika 18). DARPin *4m3* ni inhibiral aktivnosti človeškega katepsina B, kar je skladno z rezultati vezave le na mišji homolog. DARPin *8h2* je slabše inhibiral človeški katepsin B, kar je skladno s šibkejšo vezavo tega DARPina na človeški katepsin B v primerjavi z mišjim.



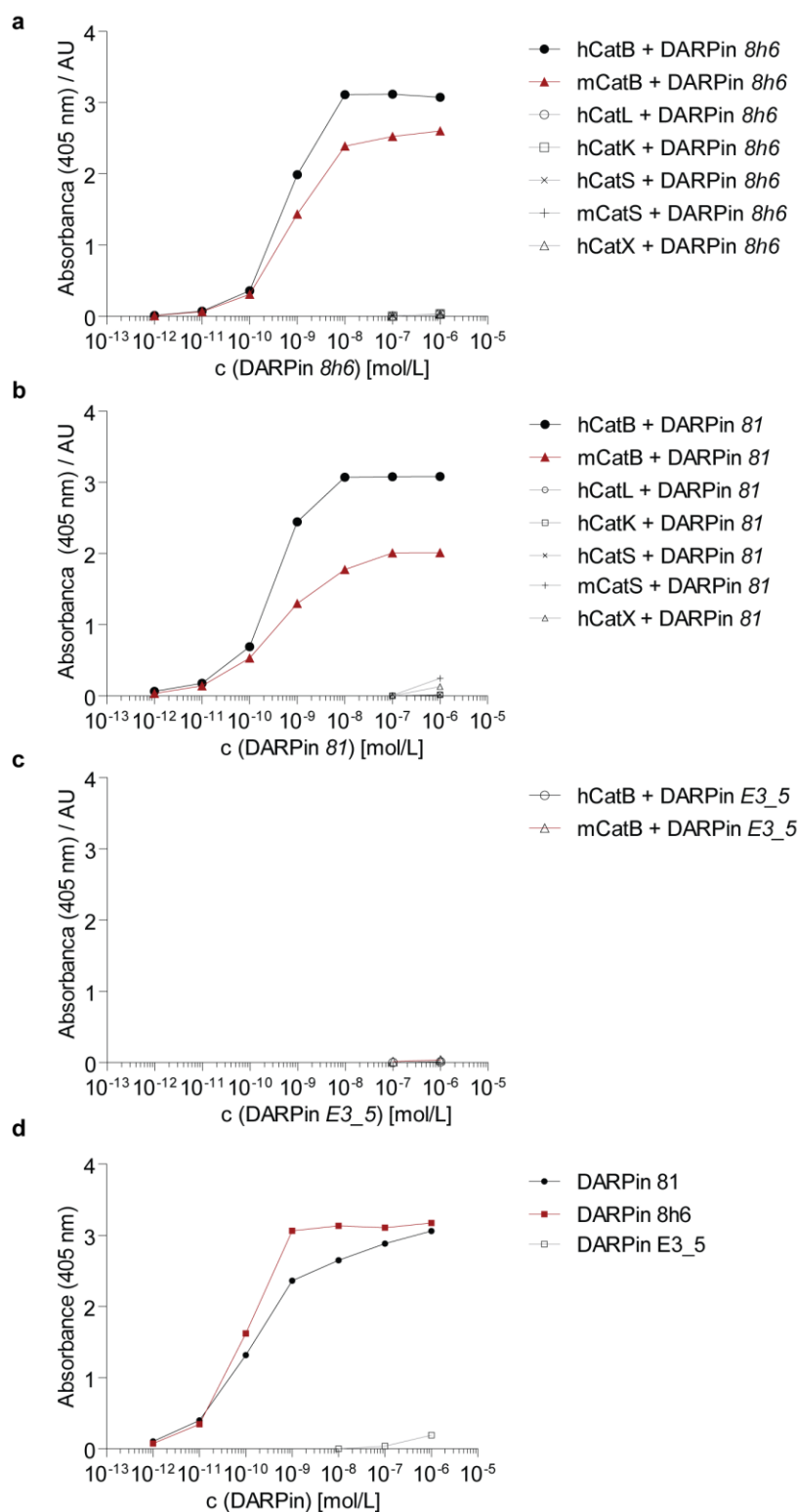
Slika 18: Test inhibicije encimske aktivnosti človeškega (hCatB) in mišjega (mCatB) katepsina B z DARPini. Aktivnost smo merili s substratom z-Arg-Arg-AMC.

4.1.3 Biokemijska karakterizacija DARPinov *81* in *8h6*

4.1.3.1 Testi za določanje selektivnosti DARPinov *81* in *8h6*

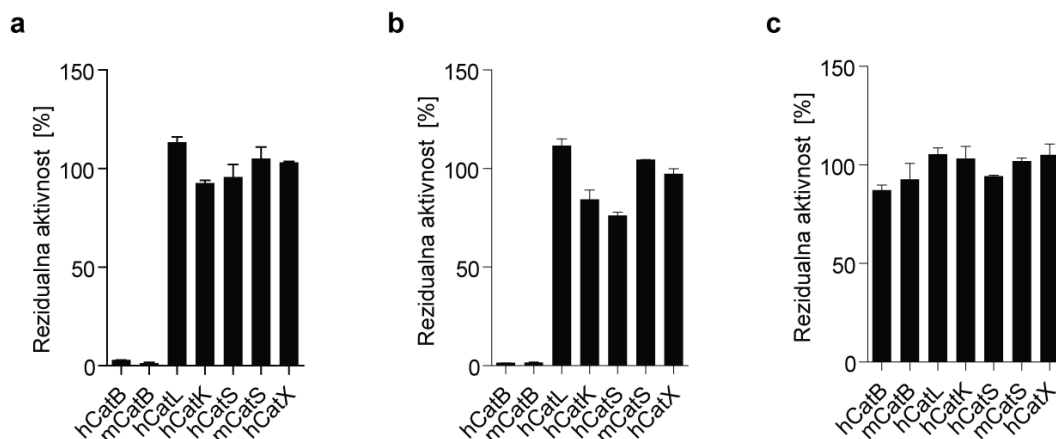
Presejalni testi so pokazali, da se DARPina *8h6* in *81* z visoko afiniteto vežeta na človeški in mišji katepsin B, da sta inhibitorja katepsina B ter da pH ne vpliva kritično na njuno vezavo. Zato smo ju izbrali za podrobnejšo biokemijsko karakterizacijo, s katero smo želeli ovrednotiti, če sta DARPina primerna za spremljanje lokalizacije katepsina B v celičnih in mišjih modelih.

Z afinitetnim testom smo preverili selektivnost DARPinov *81* in *8h6*. Oba DARPina sta se vezala tako z mišjim kot človeškim katepsinom B (Slika 19a, b) in prokatepsinom B (Slika 19d), pri čemer je bil signal odvisen od koncentracije DARPinov. DARPina se nista vezala na katepsine L, K, S in X, kar kaže na selektivnost interakcije. Neselektivni DARPin *E3_5* se v merjenem koncentracijskem območju ni vezal na imobilizirane katepsine (Slika 19c).



Slika 19: Afinitetni testi za preverjanje selektivnosti DARPinov 81 in 8h6. a) Katepsine smo imobilizirali na površino mikrotitrskih plošč, nato pa inkubirali biotiniliran DARPin 8h6, b) DARPin 81 ali c) DARPin E3_5 v različnih koncentracijah. Detekcijo smo izvedli s streptavidinom, konjugiranim s HRP in kolorimetrično detekcijo. d) Človeški prokatepsin B smo imobilizirali na površino mikrotitrskih plošč, nato pa izvedli poskus enako kot zgoraj.

Preverili smo tudi selektivnost inhibicije encimske aktivnosti Katepsina B z DARPinoma *81* in *8h6*. Skladno z rezultati iz merjenja interakcij sta oba DARPina inhibirala le človeški in mišji Katepsin B, ne pa Katepsinov L, K S ali X (Slika 20a, b). Neselektivni DARPin *E3_5* ni signifikantno vplival na encimsko aktivnost Katepsinov (Slika 20c)

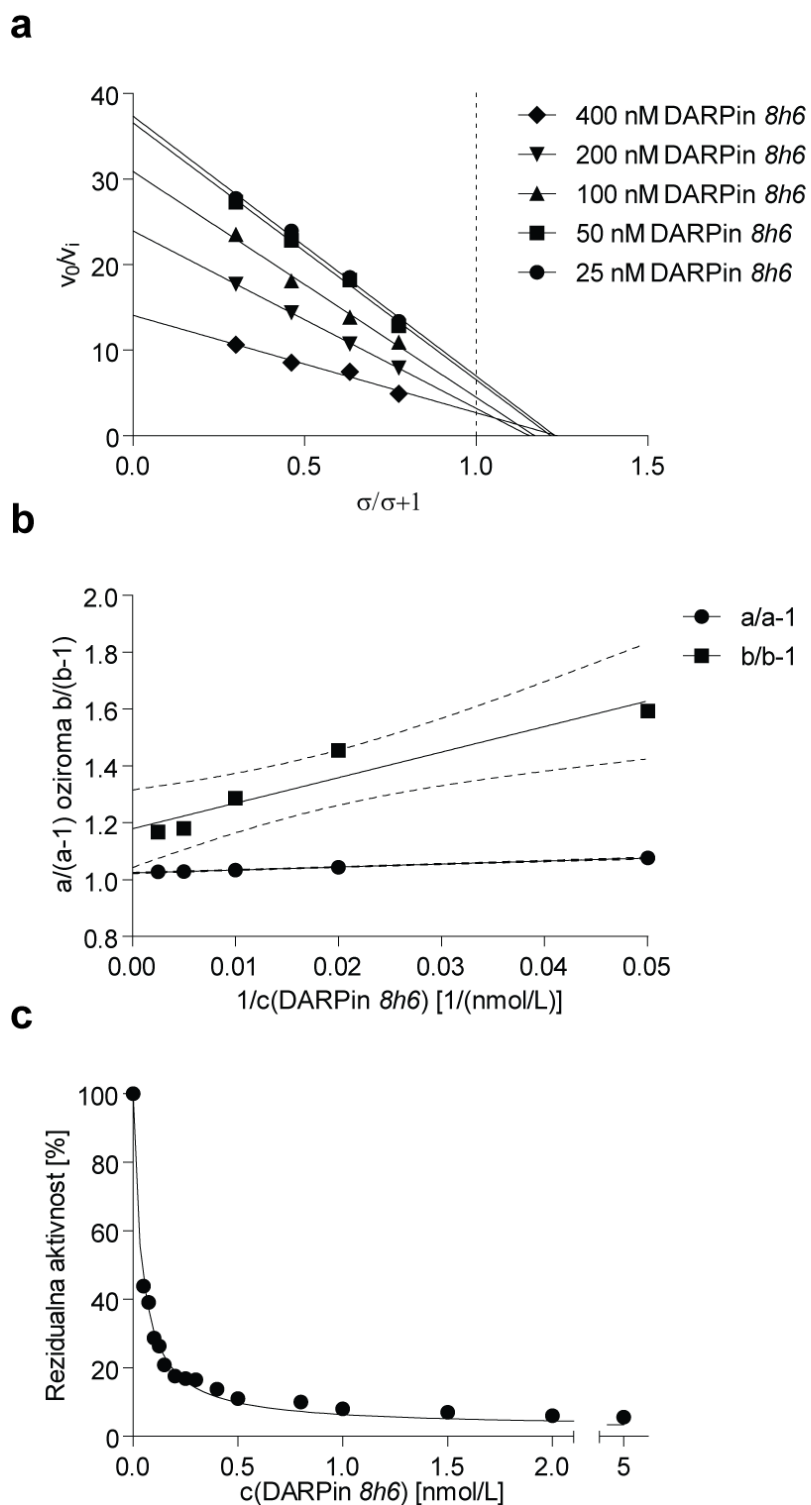


Slika 20: Test selektivnosti inhibicije Katepsinske aktivnosti. a) DARPin *8h6*, b) DARPin *81* oziroma c) DARPin *E3_5* smo inkubirali s Katepsini in izmerili rezidualno aktivnost s substratom z-Arg-Arg-AMC v primeru Katepsina B oziroma z-Phe-Arg-AMC v primeru ostalih Katepsinov.

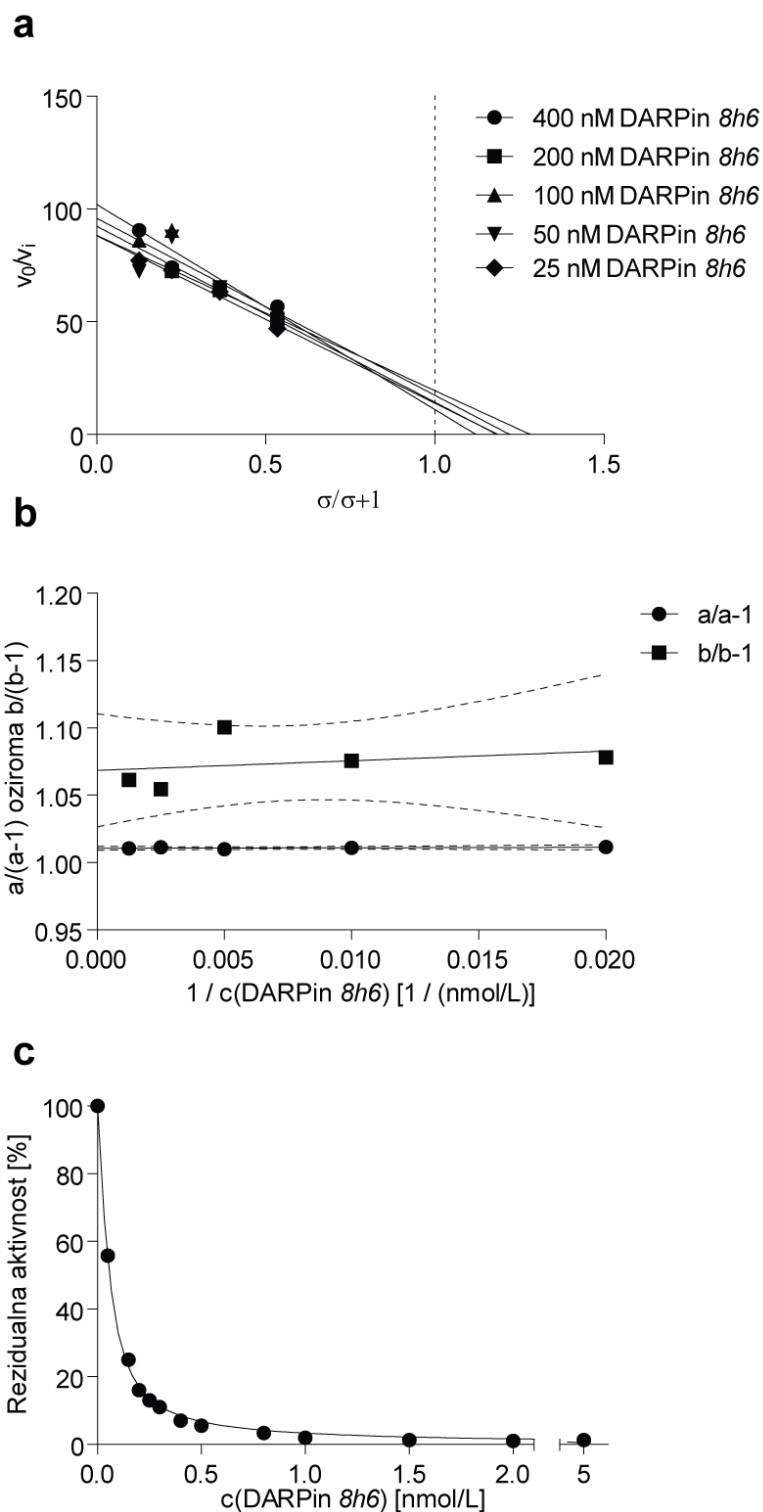
4.1.3.2 Kinetika inhibicije DARPinov *81* in *8h6*

DARPina *81* in *8h6* sta pokazala selektivno inhibicijo človeškega in mišjega Katepsina B, zato smo podrobneje okarakterizirali mehanizem inhibicije. Preliminarni test je pokazal, da je inhibicija hitrega tipa, zaradi česar smo za karakterizacijo izbrali metodo splošnega modifikatorja, ki nam omogoča kvantitativno določanje tipa mehanizma in konstante inhibicije.

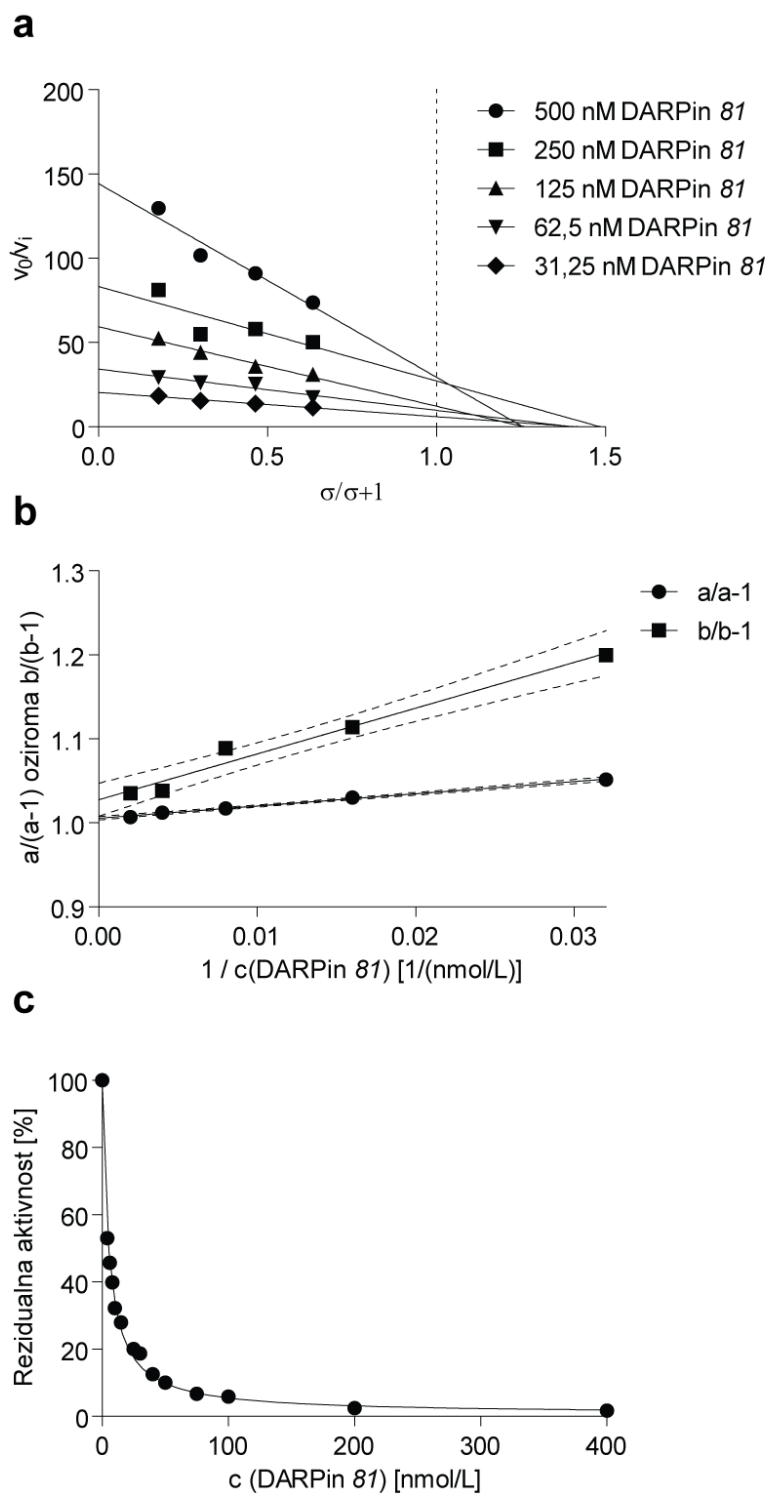
Karakterizacija je pokazala, da sta oba DARPina inhibitorja mešanega tipa s pretežno kompetitivnim karakterjem ($1 < \alpha < \infty$) (Slika 21a, Slika 22a, Slika 23a, Slika 24a, Tabela 3). Takšen mehanizem je značilen za inhibitorje, ki se ne vežejo direktno v aktivno mesto encima, ampak na drug način ovirajo vezavo substrata. Kot je razvidno iz sheme inhibicijskega mehanizma (Slika 11), je nekompetitivna konstanta inhibicije $\alpha \cdot K_i$ v primeru obeh DARPinov višja od kompetitivne konstante inhibicije K_i . To kaže na dejstvo, da se terciarni kompleks med Katepsinom B, DARPinom in substratom sicer lahko tvori, vendar je vezava šibkejša kot v primeru interakcije le med Katepsinom B in DARPinom ali le med Katepsinom B in substratom. Pri tem je pomembno omeniti, da smo za karakterizacijo uporabili majhen dipeptidilni substrat z-Arg-Arg-AMC, ki ob vezavi na Katepsin B zasede le mesta S2, S1 in S1', za razliko od proteinskih substratov, ki se vežejo skozi celotno aktivno mesto.



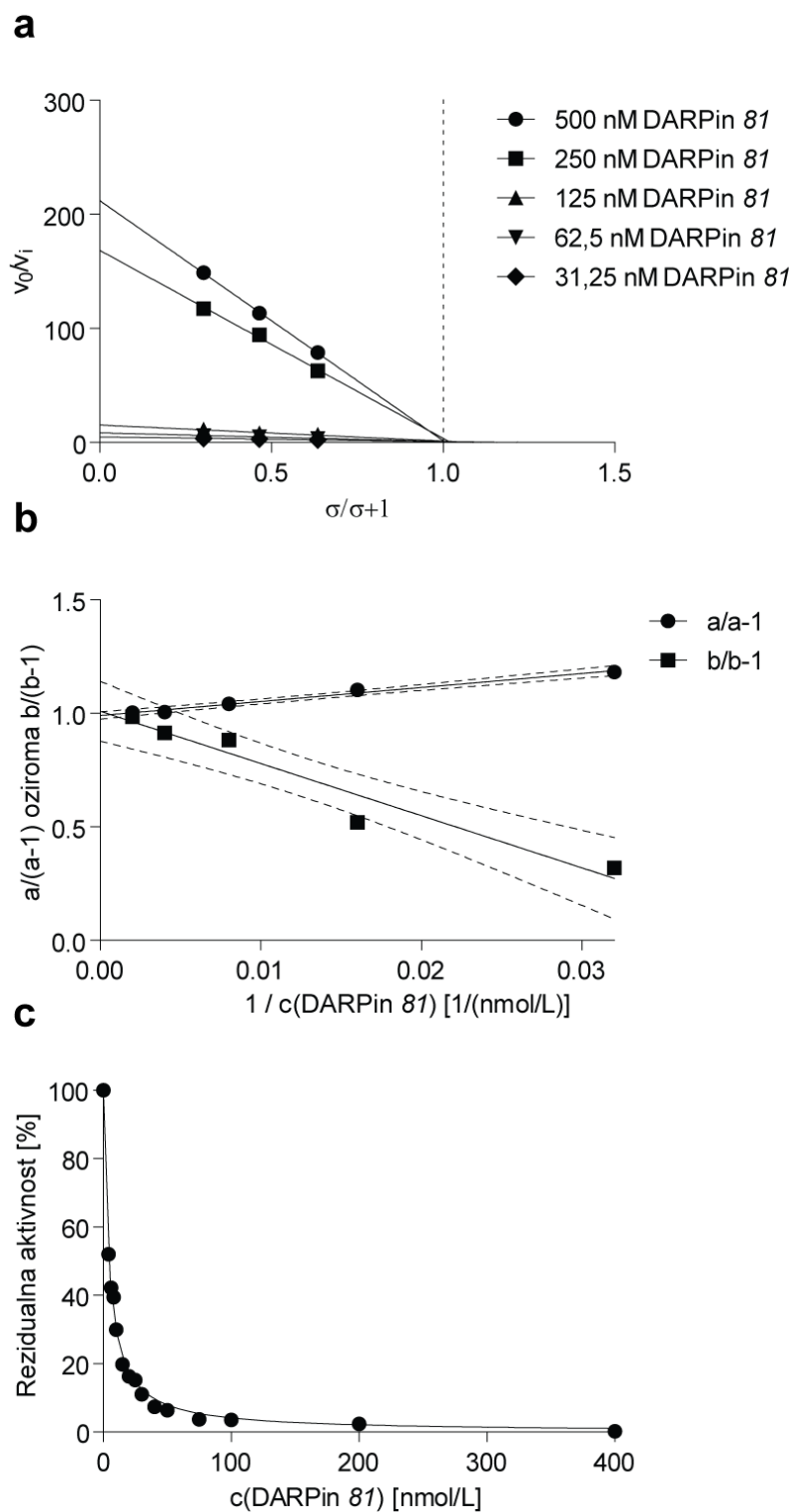
Slika 21: Karakterizacija inhibicijskega mehanizma DARPina *8h6* za človeški katepsin B. a) Primarni graf specifične hitrosti. B) Sekundarni graf specifične hitrosti. C) Graf za določanje konstante inhibicije tesnega inhibitorja.



Slika 22: Karakterizacija inhibicijskega mehanizma DARPina *8h6* za mišji katepsin B. a) Primarni graf specifične hitrosti. b) Sekundarni graf specifične hitrosti. c) Graf za določanje konstante inhibicije tesnega inhibitorja.



Slika 23: Karakterizacija inhibicijskega mehanizma DARPina *81* za človeški katepsin B. a) Primarni graf specifične hitrosti. b) Sekundarni graf specifične hitrosti. c) Graf za določanje konstante inhibicije tesnega inhibitorja.



Slika 24: Karakterizacija inhibicijskega mehanizma DARPina *81* za mišji Katepsin B. a) Primarni graf specifične hitrosti. b) Sekundarni graf specifične hitrosti. c) Graf za določanje konstante inhibicije tesnega inhibitorja.

Parameter hiperboličnosti β je bil v primeru DARPina *8h6* večji od nič za inhibicijo tako mišjega kot človeškega katepsina B (Slika 21b, Slika 22b, Tabela 3). To kaže na zmožnost katalize katepsina B tudi ob vezavi DARPina *8h6*, kar potrjuje, da je aktivno mesto v kompleksu prosto. Ker pa je $\beta < 1$, je zmožnost katalize po vezavi DARPina *8h6* bistveno ošibljena v primerjavi s samim katepsinom B, kar kaže velikost katalitične konstante za hitrost cepitve substrata $\beta \cdot k_{cat}$. V primeru kompleksa med mišjim katepsinom B in DARPinom *81* je $\beta = 0$ (Slika 24b, Tabela 3), kar kaže na linearnost inhibicije, medtem ko je bil $\beta > 0$ v primeru kompleksa s človeškim katepsinom B (Slika 23b, Tabela 3).

Določili smo tudi konstanto inhibicije (Slika 21c, Slika 22c, Slika 23c, Slika 24c, Tabela 3). V primeru DARPina *8h6* je bila 35 pM v primeru človeškega katepsina B in 34 pM v primeru mišjega katepsina B, medtem ko je bila 4,2 nM v primeru DARPina *81* za oba homologa katepsina B.

Tabela 3: Parametri inhibicije človeškega in mišjega katepsina B z DARPinom *8h6* oziroma *81*.

	α	β	K_i
hCatB + DARPin <i>8h6</i>	6,6	0,15	$0,034 \pm 0,001$
mCatB + DARPin <i>8h6</i>	6,1	0,064	$0,035 \pm 0,003$
hCatB + DARPin <i>81</i>	4,9	0,027	$4,2 \pm 0,1$
mCatB + DARPin <i>81</i>	1,19	0	$4,2 \pm 0,1$

4.1.3.3 Kristalna struktura kompleksov DARPinov *81* in *8h6* s katepsinom B

Kinetična karakterizacija, afinitetni testi ter meritve SPR so nam pokazale, da je vezava DARPinov *8h6* in *81* zelo selektivna za katepsin B ter da je afiniteta zelo visoka. Prav tako so testi pokazali, da se nobeden od DARPinov ne veže direktno v aktivno mesto encima, čeprav inhibira aktivnost. V naslednjem koraku smo kristalizirali kompleksa DARPina *8h6* s človeškim katepsinom B ter DARPina *81* s človeškim katepsinom B.

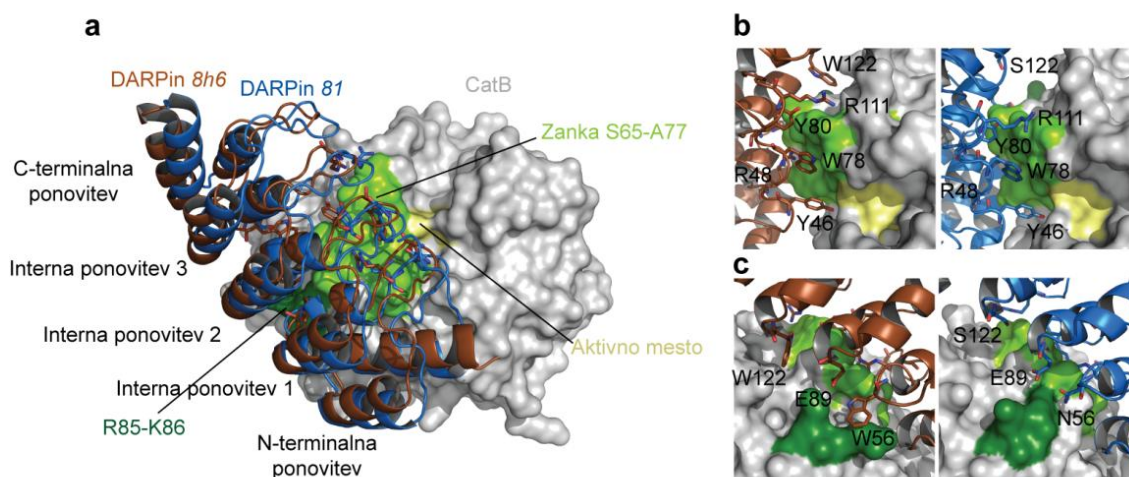
Kompleks DARPina *8h6* in katepsina B je kristaliziral z dvema paroma molekul v asimetrični enoti, medtem ko je kompleks DARPina *81* in katepsina B z eno. Pri slednjem smo zaradi zelo dobrih kristalografskih podatkov lahko zgradili dober model strukture, medtem ko je bil ta pri kompleksu DARPina *8h6* nekoliko slabši (tabela 4), vseeno pa nam je omogočil identifikacijo vezavnega mesta in aminokislin, udeleženih pri vezavi.

Tabela 4: Kristalografski podatki za kristalne strukture kompleksov Katepsina B in DARPina *8h6* oziroma *8l*.

Kristal	DARPin <i>8h6</i> – Katepsin B	DARPin <i>8l</i> – Katepsin B
Prostorska skupina	P2 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2
Kristalni sistem		
a, b, c (Å)	101.4, 201.5, 46.8	105.7, 105.7, 92.6
α, β, γ (stopinje)	90, 90, 90	90, 90, 90
Št. kompleksov v asimetrični enoti	2	1
Valovna dolžina (Å)	0.91807	0.91807
Resolucija (Å)	46.8-2.76(2.93)	29.1-1.81(1.92)
Št. unikatnih reflektov	25129	48460
Celovitost (%) (zadnja lupina)	0.98(93)	100(99.7)
CC ½	0.98(0.46)	1.0(0.96)
R-izmerjen (zadnja lupina)	0.169(1.01)	0.066(0.067)
Povprečni I/σ (zadnja lupina)	8.5(1.5)	26.7(4.0)
Optimizacija prilaganja modela in eksperimentalnih podatkov	DARPin <i>8h6</i> – Katepsin B	DARPin <i>8l</i> – Katepsin B
PDB ID	5MBM	5MBL
Območje resolucije (Å)	46.8-2.76(2.81)	29.1-1.81(1.84)
Št. reflektov v delovnem setu	25126(953)	48409(2370)
Št. reflektov v testnem setu	25126(953)	48409(2370)
R-vrednost (%)	25.57(44.24)	16.97(25.66)
R-kick vrednost (%)	28.05(46.73)	19.31(28.87)
RMSD od idealne geometrije dolžina vezi (Å) koti vezi (stopinje)	0.024 2.7	0.021 2.08
Število atomov v asimetrični enoti atomi proteinov molekule vode SO ₄ ²⁻	6356 143 /	3174 541 1
Povprečna B vrednost (Å ²)	63	31.8
Statistika Ramachandranovega diagrama Preferenčni Dovoljeni Odstopajoči	657 135 34	410 12 3

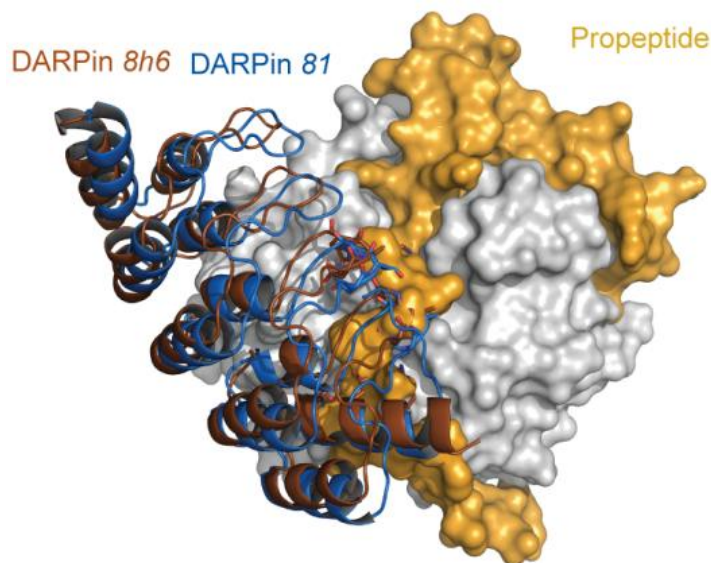
Oba DARPina se na Katepsin B vežeta na skoraj enakem področju in v enaki orientaciji. S konkavno površino, ki vključuje β-zavoje na internih ponovitvah in C-terminalni ponovitvi, DARPina interagirata z delom L-domene in interdomenske površine Katepsina B (Slika 25a). Ključne interakcije oba DARPina tvorita z zavojem Ser65 – Ala77 Katepsina B, ki gradi levo stran površine S2 in S3 vezavnih mest za substrate (Slika 25b). Oba DARPina interagirata z aminokislinami Tyr46, Arg48, Trp78, Tyr80, Glu89 in Arg11, ki so jima skupne in pripadajo variabilnim mestom v DARPinski knjižnici. Ker je ta predel Katepsina B slabše ohranjen v družini cisteinskih Katepsinov, to podaja razlago za specifičnost obeh DARPinov.

Kljub temu pa smo pri interpretaciji struktur opazili nekatere razlike med obema kompleksoma. DARPin *8h6* namreč tvori dodatne interakcije z zavojem Ser65 – Ala77 preko Trp122, medtem ko ima DARPin *81* na tem mestu Ser122, ki ne prispeva bistveno k vezavi. Nadalje DARPin *8h6* tvori interakcije s koncem tretje α -vijačnice katepsina B (Arg85-Lys86) preko Trp56, medtem ko ima DARPin *81* na tem mestu Asn56, ki prav tako ne prispeva k vezavi (Slika 25c). Te razlike vodijo do zasuka (RMSD) DARPina *81* v desno za okoli 3 Å v primerjavi z DARPinom *8h6*, če izvedemo superimpozicijo kompleksov na osnovi strukture katepsina B. Ta razlika je signifikantno večja, kot je RMSD obeh struktur DARPina *8h6* iz asimetrične enote ob enakih pogojih superimpozicije. Druga posledica je bistveno večja interakcijska površina med DARPinom *8h6* in katepsinom B (povprečje za oba kompleksa v asimetrični enoti 973 Å²) v primerjavi z DARPinom *81* in katepsinom B (860 Å²), kar razlaga signifikantno višjo afiniteto DARPina *8h6* v primerjavi z DARPinom *81*. Interakcijsko površino smo določili s programom PDBePISA (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa>).



Slika 25: Struktura kompleksov med DARPinom *8h6* in človeškim katepsinom B ter DARPinom *81* in človeškim katepsinom B. a) Superimpozicija obeh kristalnih struktur kompleksov. Za superimpozicijo smo uporabili parametre strukture katepsina B. Na sliki je zaradi jasnosti prikazana le struktura katepsina B (siva) iz kompleksa z DARPinom *81*. Z rumeno je pobarvano aktivno mesto katepsina B, s svetlo zeleno zanka Ser65 – Ala77, s temno zeleno konec tretje α -vijačnice katepsina B Arg86 – Lys86, z rdečo DARPin *8h6* in z modro DARPin *81*. b) Povečava iz (a), pogled od zgoraj. c) Povečava iz (a), pogled od zadaj.

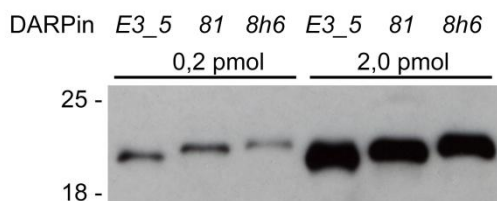
Naredili smo tudi primerjavo kompleksov z znano strukturo človeškega prokatepsina B. Naredili smo superimpozicijo, pri čemer smo upoštevali parametre strukture zrelega katepsina B iz obeh kompleksov in prokatepsina B. V strukturah katepsina B ni bilo nobenih večjih razlik, z izjemo zaporne zanke, ki je v strukturi prokatepsina B zamaknjena zaradi vezave propeptida. Ker se propeptid veže skozi celotno aktivno mesto katepsina B, se vezavno mesto obeh DARPinov deloma prekriva s strukturo propeptida (Slika 26). Ker smo v afinitetnih testih izmerili vezavo tudi na prokatepsin B, to nakazuje na fleksibilnost vezave propeptida z zreлим delom katepsina B in na ravnotežje med strukturo, kjer je propeptid vezan v aktivno mesto katepsina B, ter strukturo, kjer je odmaknjen od aktivnega mesta.



Slika 26: Primerjava struktur kompleksov DARPina *8h6* in katepsina B, DARPina *81* in katepsina B ter prokatepsina B (PDB ID: 3PBH).

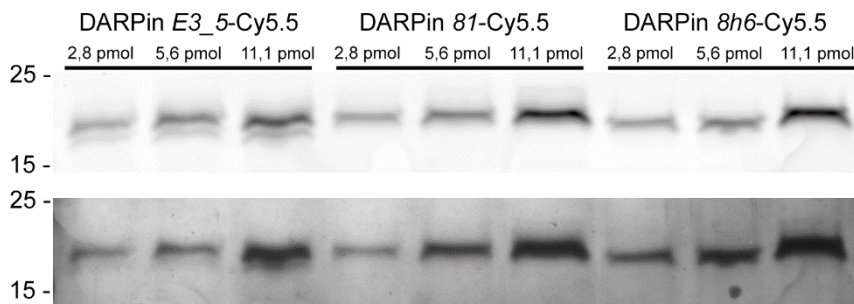
4.1.3.4 Označevanje DARPinov z biotinom in fluorescentnim barvilom Cy5.5

Za detekcijo v celičnih testih smo DARPine *E3_5*, *8h6* in *81* s C-terminalnim cisteinom konjugirali z biotiniziranim reagentom, ki selektivno reagira le s sulfhidrilno skupino na cisteinu. Po čiščenju z gelsko filtracijo smo proteine analizirali z ločevanjem na NaDS-PAGE in prenosu Western, nakar smo izvedli detekcijo s streptavidinom, konjugiranim s HRP (Slika 27). Vsi trije proteini so bili uspešno konjugirani z biotinom, na kar kažejo lise pri velikosti okoli 18 kDa.



Slika 27: Uspešnost biotinizacije DARPinov.

DARPine *E3_5*, *8h6* in *81* s C-terminalnim cisteinom smo konjugirali tudi s fluorescentnim barvilom Cy5.5 za zasledovanje *in vivo*, ki prav tako selektivno reagira le s sulfhidrilno skupino na cisteinu. Po čiščenju z gelsko filtracijo in ionsko-izmenjevalno kromatografijo smo proteine analizirali z ločevanjem na NaDS-PAGE in analizo s fluorescentnim skenerjem (Slika 28). Vsi trije proteini so bili uspešno konjugirani z barvilom Cy5.5, na kar kažejo lise pri velikosti okoli 18 kDa.



Slika 28: Uspešnost označevanja DARPinov s fluorescentnim barvilom Cy5.5.

Pri metodi direktne konjugacije DARPinov s fluorescentnim barvilom je še posebej pomembno, da je stopnja konjugacije primerljiva med različnimi proteini, saj bo v celičnih ali *in vivo* testih merjeni signal neposredna meritev količine tega barvila, za razliko od metod, kjer uporabimo sekundarne označevalce, kot je streptavidin, konjugiran s fluorescentnim barvilom. Uspešnost konjugacije smo zato ovrednotili tudi kvantitativno z denziometrično analizo, ki je pokazala, da med DARPini ni bilo significantnih razlik (Tabela 5).

Tabela 5: Uspešnost označevanja DARPinov s fluorescentnim barvilom Cy5.5.

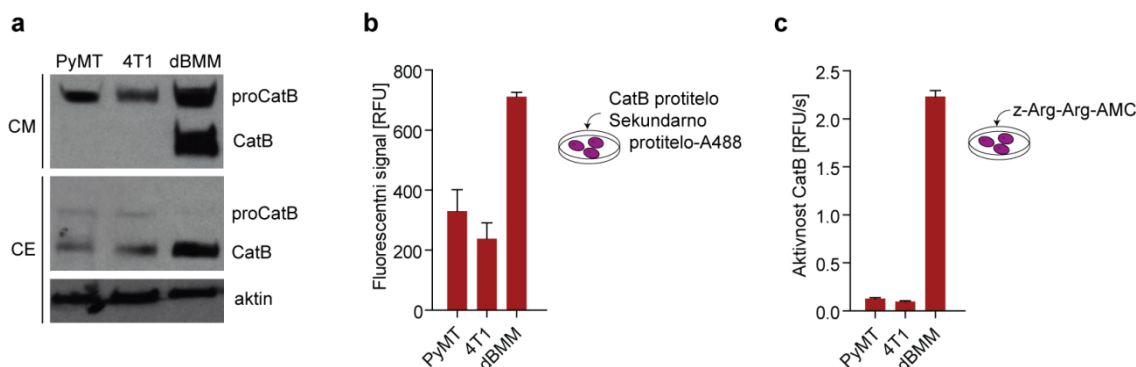
	Specifična intenziteta signala [AU mol ⁻¹]
DARPin <i>E3_5</i> -Cy5.5	82,7 ± 2,7
DARPin <i>81</i> -Cy5.5	84,7 ± 5,3
DARPin <i>8h6</i> -Cy5.5	80,3 ± 7,8

4.1.4 Označevanje katepsina B z DARPinom *8h6* v celicah in tkivih

4.1.4.1 Analiza izločanja katepsina B iz celic

Čeprav so številne predhodne študije pokazale, da je katepsin B v tumorskih celicah PyMT in 4T1 ter v makrofagih udeležen pri pericelularni proteolizi, smo želeli potrditi te rezultate v naših celičnih modelih. Najprej smo analizirali sekretom (celični medij, CM) gojenih celic po 24 h gojenja v mediju brez seruma in to primerjali s celičnim lizatom (CE) (Slika 29a). Ugotovili smo, da vsi trije tipi celic izločajo katepsin B v obliki proencima (proCatB), le makrofagi deloma tudi v obliki zrelega encima. Količina katepsina B je bila bistveno višja v sekretomu makrofagov kot tumorskih celic. V celičnih lizatih je bil skoraj ves katepsin B v zreli obliki. Tudi v tem primeru ga je bilo več v makrofagih kot v tumorskih celicah.

V naslednjem koraku smo preverili količino katepsina B, ki je vezan na površino celic (Slika 29b). Po inkubaciji primarnih in sekundarnih protiteles z gojenimi celicami smo izmerili bistveno višje signale v primeru makrofagov kot tumorskih celic, kar korelira s količino izločanega katepsina B. Izmerili smo tudi pericelularno aktivnost katepsina B in ponovno ugotovili, da je ta significantno višja v primeru makrofagov kot tumorskih celic (Slika 29c).



Slika 29: Analiza pericelularnega katepsina B v tumorskih celicah PyMT in 4T1 ter makrofagih. a) Analiza sekretoma in celičnega lizata za katepsin B po ločevanju na NaDS-PAGE in prenosu Western. b) Spremljanje vezave protiteles proti katepsinu B na površini celic. c) Meritev pericelularne aktivnosti katepsina B.

4.1.4.2 Interakcija DARPinov s katepsinom B na površini celic

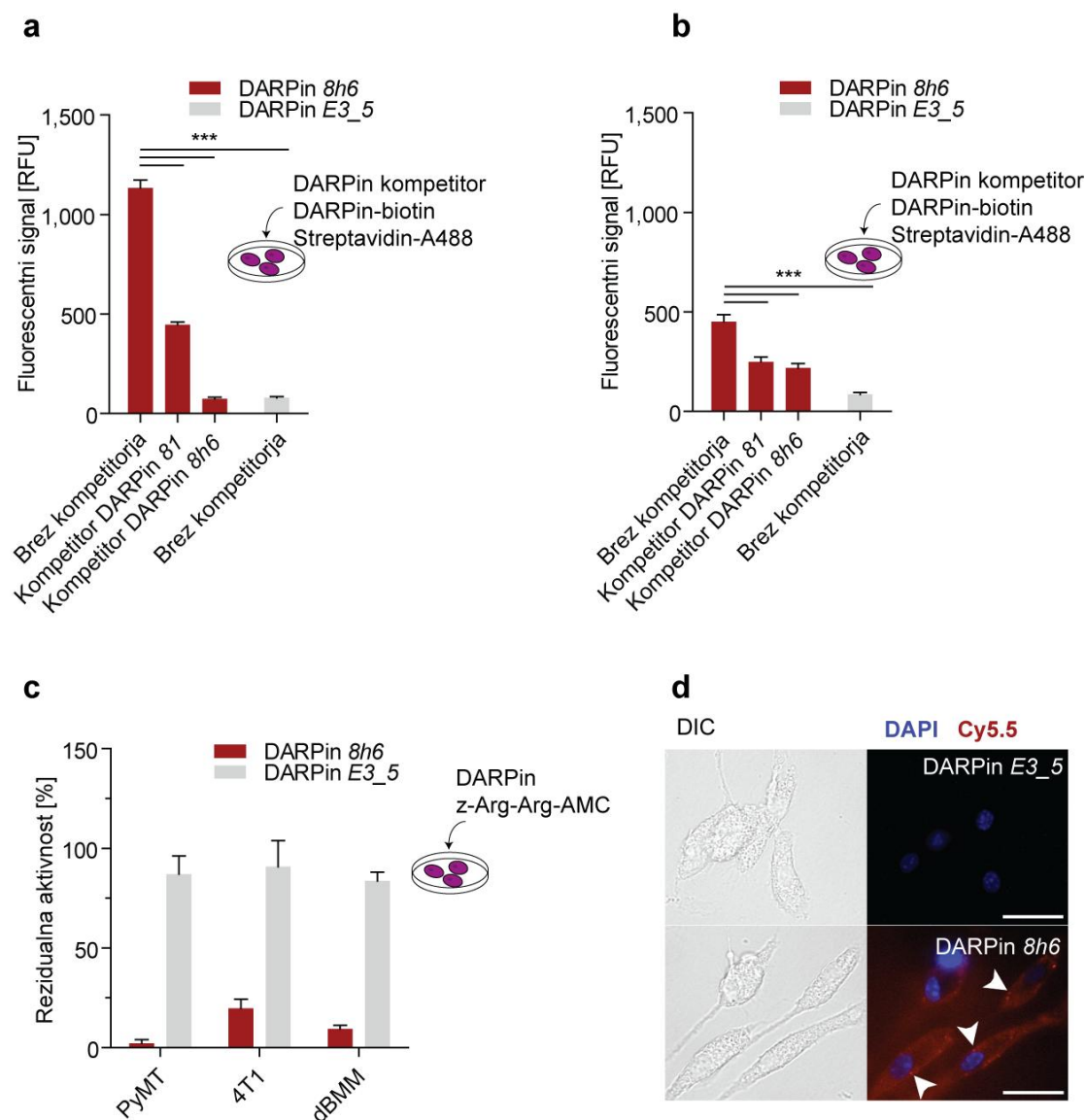
Po selekciji DARPinov in podrobni biokemijski karakterizaciji DARPinov *8h6* in *81* smo ugotovili, da je DARPin *8h6* najprimernejši kandidat za ovrednotenje v aplikaciji zasledovanja lokalizacije katepsina B, saj je zelo selektiven vezavni protein z visoko afiniteto. DARPin *81* smo uporabili v nekaterih testih kot kompetitivni vezavni protein DARPina *8h6*, saj se njuno vezavno mesto na katepsinu B v zelo veliki meri prekriva.

Prav tako smo ugotovili, da so naši celični modeli ustrezni za ovrednotenje vezave DARPina s pericelularnim katepsinom B, saj tako rakaste celice kot makrofagi vsebujejo pericelularni katepsin B, pri čemer ga imajo makrofagi signifikantno več, kar je ugodno za zaznavanje razlik z DARPinom *8h6*.

Najprej smo naredili afinitetni test na celični membrani, kjer smo detektirali katepsin B na gojenih celicah z dodatkom biotiniliranega DARPina *8h6* in detekcijo s streptavidinom, konjugiranim s fluorescentnim barvilom. Ugotovili smo, da zaznamo bistveno višji signal v primeru makrofagov (Slika 30a) kot tumorskih celic PyMT (Slika 30b), kar je skladno z višjo koncentracijo katepsina B na površini makrofagov. Naredili smo tudi test kompeticije z neoznačenim DARPinom *8h6* ali *81*. V tem primeru smo tako pri makrofagih kot tumorskih celicah PyMT izmerili signifikantno nižje signale (Slika 30a, b), kar kaže na preprečevanje vezave biotiniliranega DARPina *8h6* zaradi predhodne zasedenosti epitopa z DARPinom kompetitorjem. V primeru obeh tipov celic se neselektivni DARPin *E3_5* ni vezal v znatni količini na površino celic.

Ker je DARPin *8h6* inhibitor katepsina B, smo izmerili tudi inhibicijo pericelularne aktivnosti katepsina B v tumorskih celicah PyMT in 4T1 ter makrofagih. Ugotovili smo, da v vseh treh primerih DARPin *8h6* inhibira pericelularno aktivnost, medtem ko neselektivni DARPin *E3_5* ni imel signifikantnega vpliva (Slika 30c).

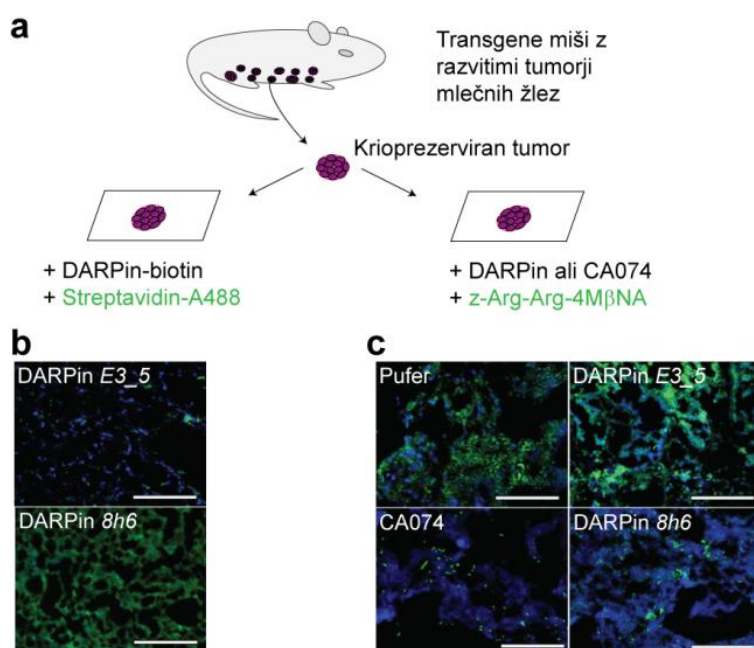
Vezavo DARPina *8h6* na celični površini makrofagov smo potrdili tudi s fluorescentno mikroskopijo, kjer smo fluorescentno označeni DARPin *8h6* opazili na več področjih na celični membrani, ponekod v večjih skupkih (Slika 30d, bele puščice). Neselektivni DARPin *E3_5*, označen s fluorescentnim barvilom, se ni vezal na površino celic.



Slika 30: Vezava DARPina *8h6* s pericelularnim katepsinom B. a) Spremljanje vezave biotiniziranega DARPina s katepsinom B na celični površini makrofagov in b) PyMT tumorskih celic. Detekcijo smo izvedli s streptavidinom, konjugiranim s fluorescentnim barvilom Alexa 488. V primeru uporabe kompetitorja smo celice predhodno inkubirali z neoznačenim DARPinom kompetitorjem *** $p < 0,001$. c) Inhibicija pericelularne aktivnosti katepsina B z DARPinom *8h6*. Aktivnost smo merili s substratom z-Arg-Arg-AMC. d) Spremljanje vezave DARPina *8h6* s katepsinom B na celični površini makrofagov s fluorescentno mikroskopijo. DARPina *E3_5* in *8h6* sta bila označena s fluorescentnim barvilom Cy5.5 (rdeča). Celična jedra smo pobarvali z barvilom DAPI (modra). Celice smo slikali tudi z diferencialno interferenčno kontrastno mikroskopijo (DIC). Skala = 5 μm .

4.1.4.3 Zimografija tumorskih tkiv

V naslednjem koraku nas je zanimalo, če DARPin *8h6* ohrani sposobnost vezave katepsina B tudi v tkivnem vzorcu krioprezerviranega tumorja PyMT (Slika 31a). V ta namen smo izolirali tumorje iz transgenih miši, ki jim spontano zrastejo tumorji mlečnih žlez PyMT. Rezone tumorja smo nato inkubirali z biotiniliranim DARPinom in streptavidinom, konjugiranim s fluorescentnim barvilom Alexa488 (Slika 31b). Vezavo smo detektirali le v primeru DARPina *8h6*, medtem ko se neselektivni DARPin *E3_5* ni vezal. Ovrednotili smo tudi vpliv DARPinov *E3_5* in *8h6* na aktivnost katepsina B v tumorskih rezinah, ki smo jo določili s fluorescentnim substratom z-RR-4MβNA (Slika 31c). Ugotovili smo, da neselektivni DARPin *E3_5* ponovno ni imel signifikantnega vpliva na aktivnost, medtem ko je DARPin *8h6* skoraj v celoti inhibiral aktivnost, podobno kot selektivni ireverzibilni kovalentni inhibitor katepsina B CA074. Kombinacija poskusov vezave biotiniliranega DARPina *8h6* in inhibicije aktivnosti katepsina B z DARPinom *8h6* je pokazala, da tudi v tkivnih vzorcih DARPin *8h6* interagira s katepsinom B.

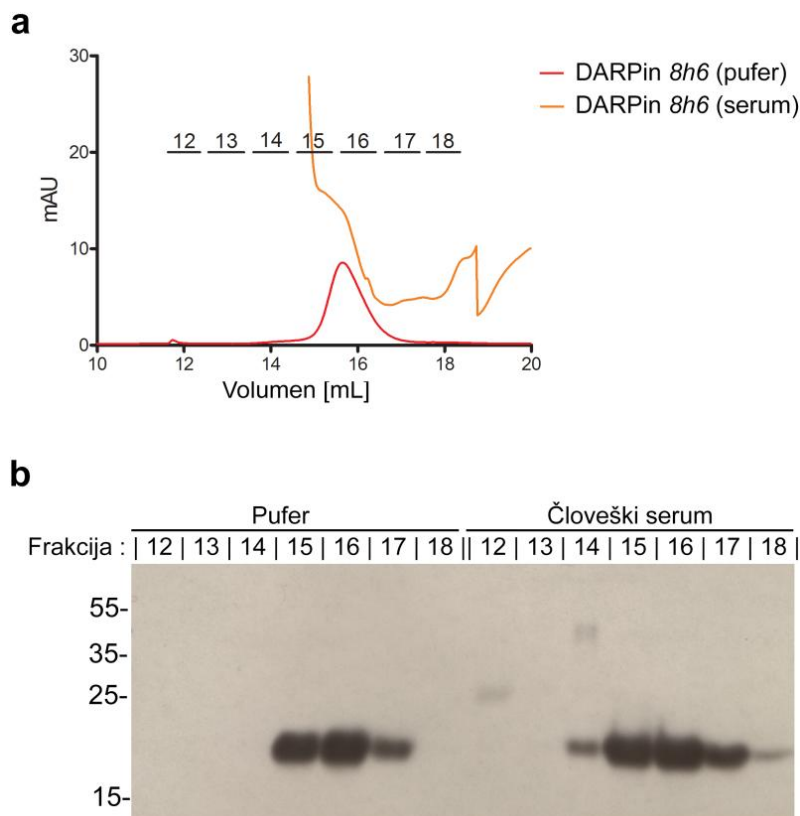


Slika 31: Vezave DARPina *8h6* s katepsinom B v tkivnem vzorcu tumorja. a) Shematski prikaz poteka poskusa. b) Vezava biotiniliranih DARPinov *E3_5* oziroma *8h6* ter detekcija s streptavidinom, konjugiranim s fluorescentnim barvilom Alexa488 (zelena). c) Vpliv DARPinov *E3_5*, *8h6* ali inhibitorja CA074 na razgradnjo substrata katepsina B z-RR-4MβNA (zelena). V vseh primerih smo celična jedra v tkivih pobarvali z barvilom DAPI (modra). Skala = 50 μm.

4.1.5 Označevanje katepsina B z DARPinom *8h6* v miših

4.1.5.1 Serumska stabilnost *8h6*

DARPin *8h6* se je izkazal kot zelo selektivni visokoafinitetni inhibitor katepsina B, s katerim smo uspešno detektirali katepsin B v celičnih in tkivnih poskusih. Pred uporabo za zasledovanje lokalizacije katepsina B *in vivo* pa smo se želeli prepričati, če je DARPin stabilen v vzorcu krvnega seruma, kjer je visoka koncentracija številnih proteinov, ki lahko neselektivno interagirajo z DARPinom in na ta način signifikantno vplivajo na njegovo stabilnost. DARPin *8h6* smo inkubirali 24 h v vzorcu seruma, nato pa zmes ločili z gelsko filtracijo (Slika 32a) ter analizirali frakcije z ločevanjem na NaDS-PAGE in prenosom po Westernu (Slika 32b). Ugotovili smo, da se je DARPin nahajal v frakcijah 15, 16 in 17, le majhen delež pa v frakcijah 12, 14 in 18. Pod enakimi pogoji smo ločili tudi izoliran DARPin *8h6* v pufru PBS in smo prav tako detektirali DARPin v frakcijah 15, 16 in 17, kar kaže na to, da DARPin *8h6* ne asociira s serumskimi proteini.



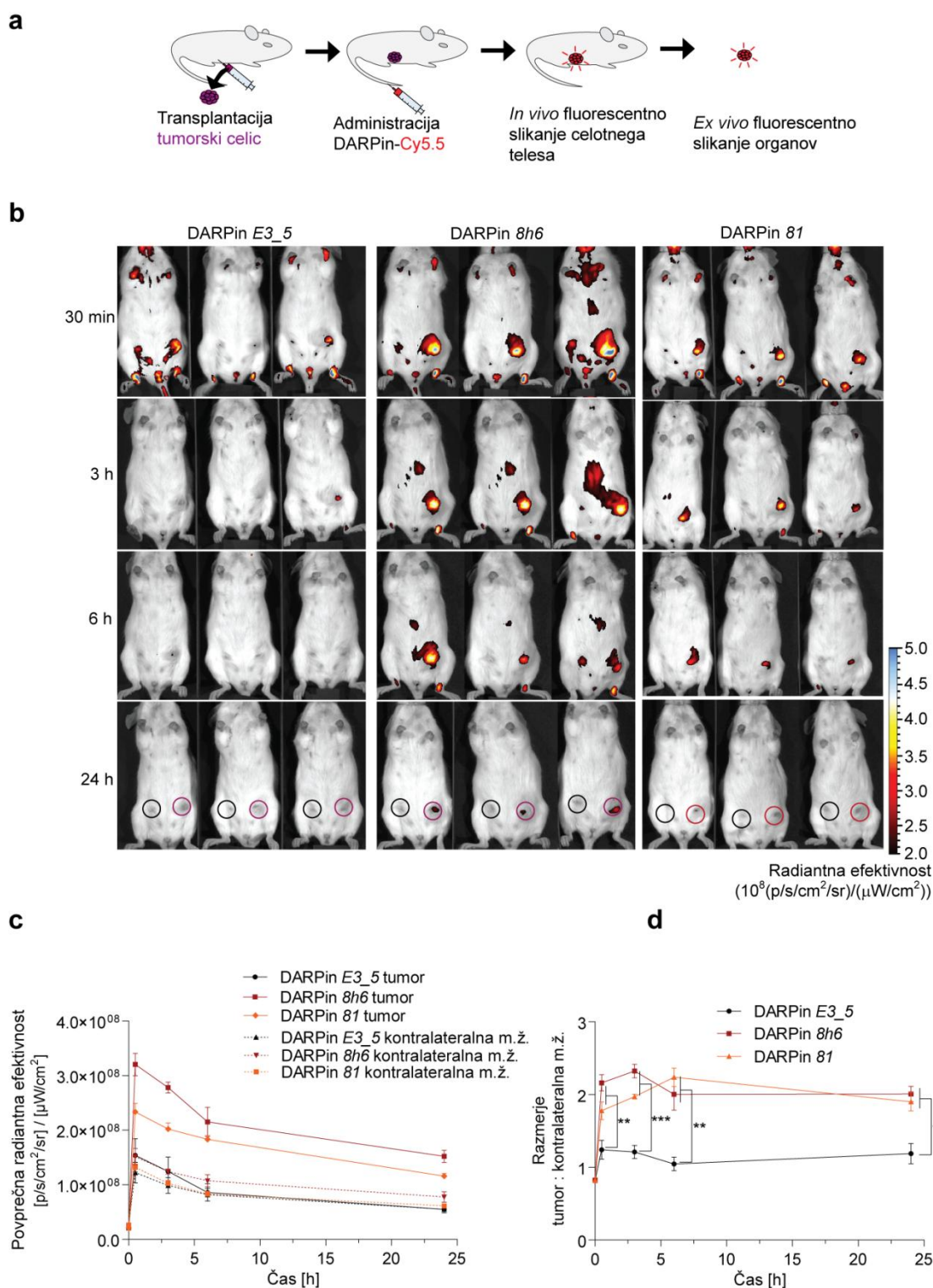
Slika 32: Serumska stabilnost DARPina *8h6*. a) Biotiniliran DARPin *8h6* smo inkubirali 24 h v človeškem serumu, nato pa zmes ločili z gelsko filtracijo (oranžna). To smo primerjali izoliranim DARPinom v pufru PBS (rdeča). b) Izbrane frakcije smo analizirali z ločbo na NaDS-PAGE in Western prenosu. Detekcijo smo izvedli s streptavidinom, konjugiranim s HRP.

4.1.5.2 Spremljanje biodistribucije DARPinov v modelu mlečne žleze PyMT

V naslednjem koraku smo ovrednotili biodostopnost DARPina *8h6* v mišjem modelu raka mlečne žleze PyMT in ocenili, ali bi bil ta DARPin primeren za neinvazivno diagnostično slikanje tumorjev.

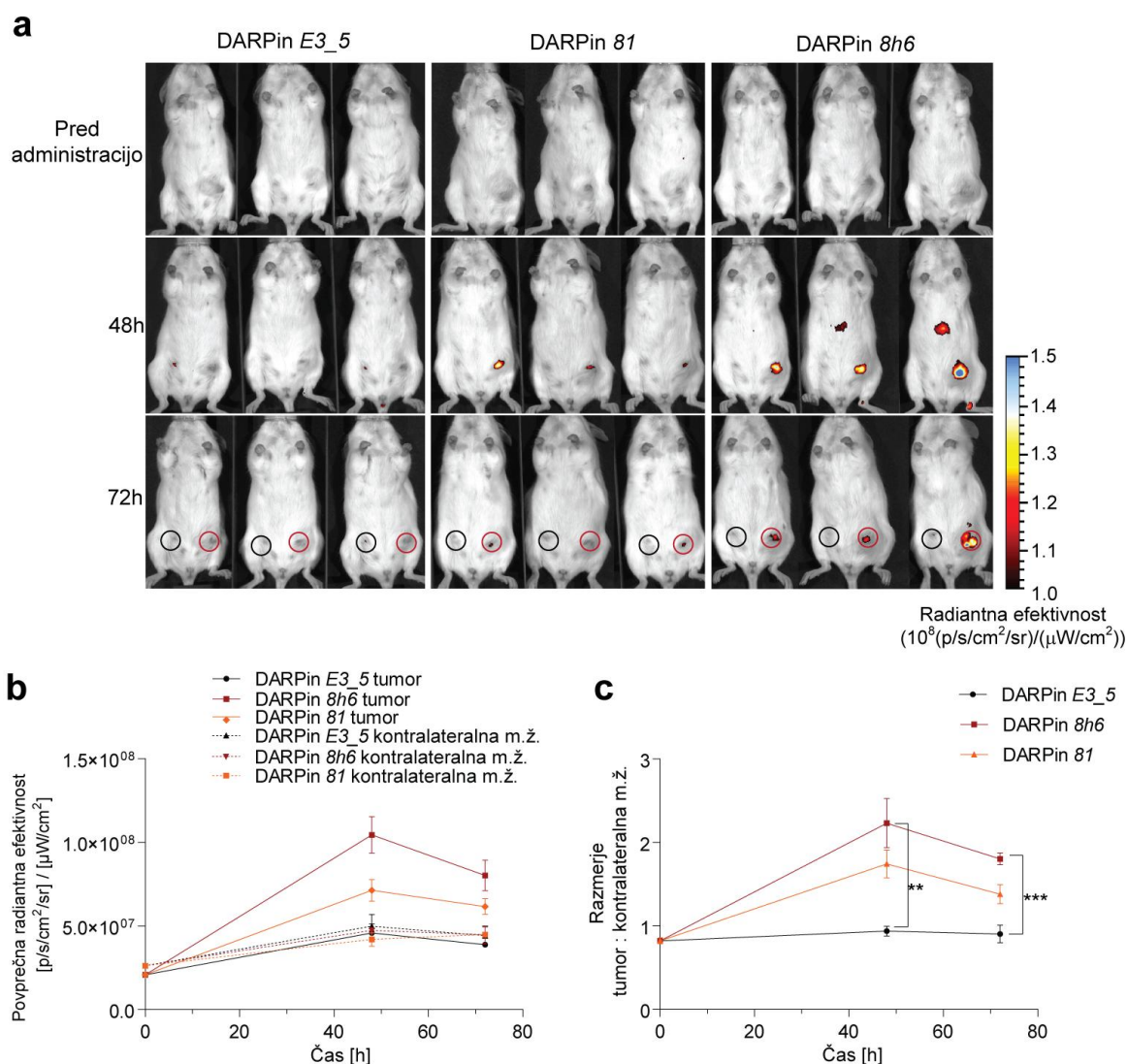
Po transplantaciji tumorskih celic v levo ingvinalno mlečno žlezo miši recipientk so po približno 2–3 tednih zrasli tumorji, nakar smo mišim intravenozno administrirali DARPine, označene s fluorescentnim barvilom Cy5.5, in spremljali lokalizacijo z optičnim slikanjem (Slika 33a). Pri tem smo uporabili DARPin *8h6* in DARPin *81*, ker smo želeli primerjati vpliv nižje afinitete DARPina do katepsina B na zadrževanju v tumorskem tkivu. Prav tako smo uporabili neselektivni DARPin *E3_5*, da smo ovrednotili vpliv neselektivnega zadrževanja DARPinov v tkivih. Po slikanju smo izmerili količino signala na območju tumorjev (rdeč krog, Slika 33b spodaj) in to primerjali s količino signala na območju kontralateralne mlečne žleze (črn krog, Slika 33b spodaj).

Ugotovili smo, da se tako DARPin *8h6* kot DARPin *81* že po 30 min v znatni meri lokalizirata v območje tumorja in da je povprečni signal na območju tumorja signifikantno višji od tistega na območju kontralateralne mlečne žleze. Tumorski signal pri DARPinu *8h6* je bil že po 30 min višji od signala pri DARPinu *81* in je ostal zelo visok do 3 h po administraciji, medtem ko je pri DARPinu *81* moč signala hitreje upadala. Po 24 h se je moč tumorskega signala pri obeh DARPinih znižala, vendar je bila še vedno signifikantno višja pri DARPinu *8h6*. Neselektivni DARPin *E3_5* se je po 30 min v manjši meri lokaliziral v območje tumorja, nato pa je signal upadel in bil pri vseh časovnih točkah signifikantno nižji od signala ostalih dveh DARPinov. Primerjali smo tudi razmerje signala v tumorju proti signalu v kontralateralni mlečni žlezi in ugotovili, da je razmerje pri DARPinu *8h6* v začetnih točkah višje od 2, v nadaljnjih časovnih točkah pa okoli 2. Pri DARPinu *81* je bilo razmerje v začetnih časovnih točkah nekoliko nižje kot pri DARPinu *8h6*, nato pa je bilo primerljivo. Razmerje pri neselektivnem DARPinu *E3_5* je bilo signifikantno nižje v vseh časovnih točkah.



Slika 33: Neinvazivno optično slikanje z DARPini v tumorskem modelu PyMT v zgodnjih časovnih točkah. a) Shematski prikaz poskusa. b) Optično slikanje ob izbranih časovnih točkah do 24 h po intravenozni administraciji DARPinov. Na spodnjem delu slike so označena področja tumorjev (rdeč krog) in kontralateralnih mlečnih žlez (črn krog). c) Kvantifikacija signalov iz označenih področij na sliki (b). d) Razmerje signalov iz označenih področij tumorjev in označenih področij kontralateralnih mlečnih žlez ob izbranih časovnih točkah. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

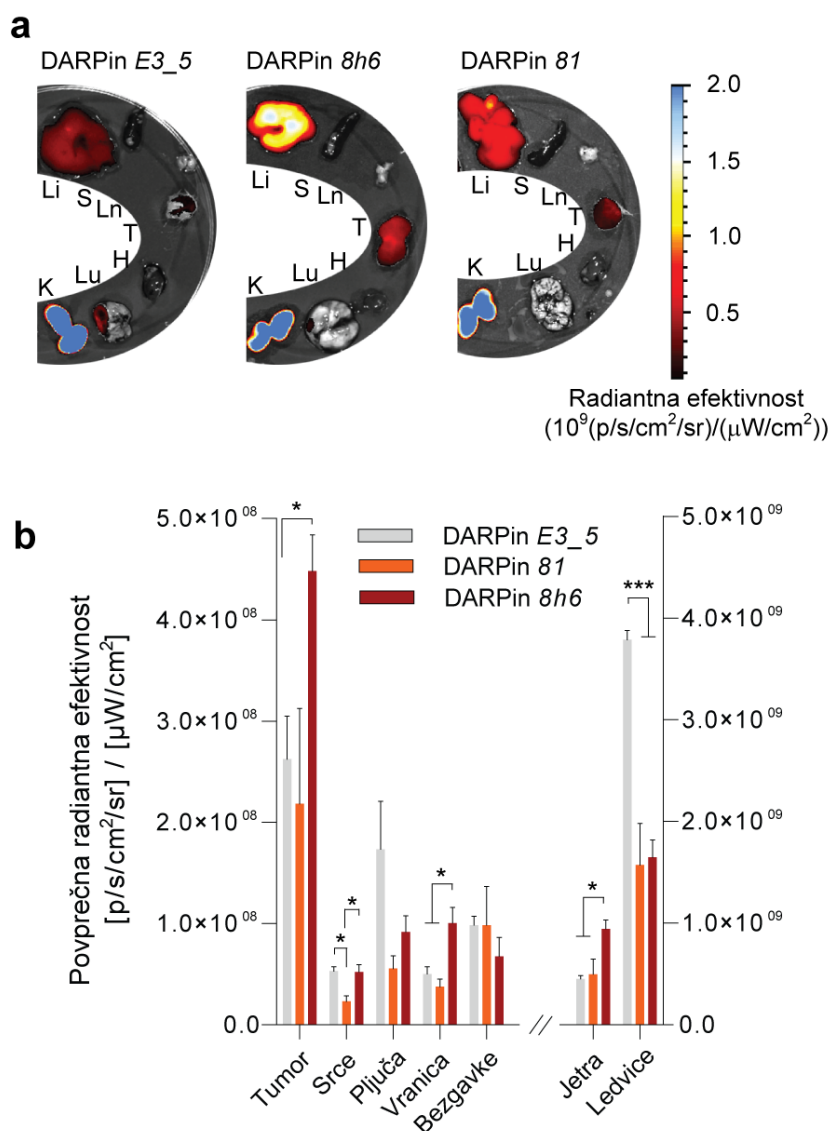
V časovnem oknu do 24 h smo ocenili primernost za hitro neinvazivno slikanje tumorjev. Poleg tega pa nas je zanimalo tudi, če se DARPin *8h6* zadrži v območju tumorja v kasnejših časovnih točkah, kar bi bilo ugodno v primeru potencialne uporabe DARPina kot inhibitorja katepsina B ali uporabe DARPina v tarčni dostavi zdravil, kjer je dolgotrajno zadrževanje na območju bolezni zaželeno. Zato smo izvedli optično slikanje tudi 48 h in 72 h po administraciji ter ugotovili, da tudi ob teh časovnih točkah najdemo povišane tumorske signale v primeru DARPinov *8h6* in *81* v primerjavi z neselektivnim DARPinom *E3_5* (Slika 34a, b). Ko smo primerjali razmerja signalov na območju tumorja in signalov na območju kontralateralne mlečne žleze, smo ugotovili, da je razmerje v primeru DARPina *8h6* signifikantno povišano v primerjavi z neselektivnim DARPinom *E3_5*, medtem ko razlike niso bile statistično signifikantne v primeru DARPina *81* (Slika 34c).



Slika 34: Neinvazivno optično slikanje z DARPini v tumorskem modelu PyMT v poznih časovnih točkah. a) Optično slikanje ob izbranih časovnih točkah do 48 h in 72 h po intravenozni administraciji DARPinov. Na spodnjem delu slike so označena področja tumorjev (rdeč krog) in kontralateralnih mlečnih žlez (črn krog). b) Kvantifikacija signalov iz označenih področij na sliki (a). c) Razmerje signalov iz označenih področij tumorjev in označenih področij kontralateralnih mlečnih žlez ob izbranih časovnih točkah.

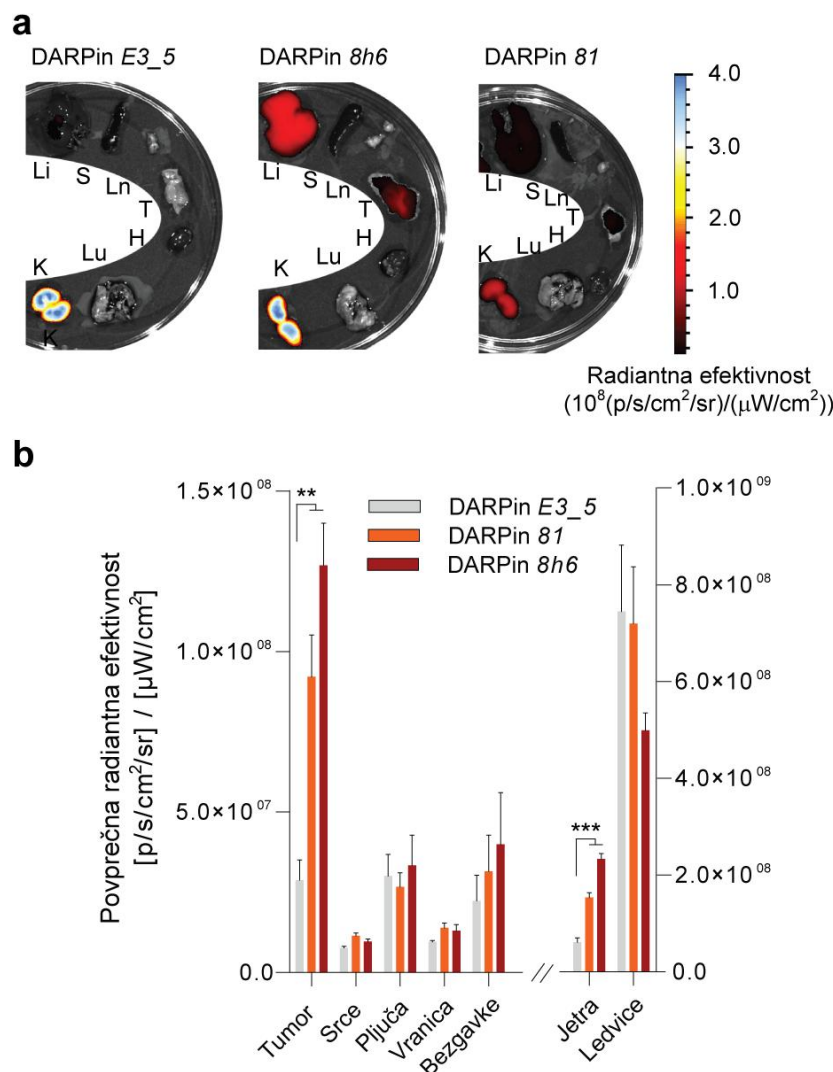
** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Z epifluorescentnim načinom slikanja, ki smo ga uporabili za neinvazivno slikanje miši, pridobimo podatke predvsem o signalih blizu površine telesa, ne pa tudi o notranjih organih. Zato smo naredili tudi eksperiment, kjer smo po administraciji fluorescentnih DARPinov po izbranih časovnih točkah miši usmrtili, izolirali organe in jih slikali ter izmerili fluorescentne signale. Ugotovili smo, da so fluorescentni signali 3 h po administraciji signifikantno višji v tumorjih miši, ki so prejele DARPin *8h6*, kot pa v tumorjih miši, ki so prejele DARPin *E3_5* ali DARPin *81* (Slika 35). Povišan je bil tudi fluorescentni signal v vranici in jetrih miši, ki so prejele DARPin *8h6*. To kaže na povišane nivoje katepsina B v teh tkivih, kar je skladno s podatki iz literature. Poleg tega je bil signal v primeru DARPina *8h6* fluorescentni signal v tumorju signifikantno višji kot v vseh ostalih organih, razen jetrih in ledvicah, ki so udeležene pri izločanju presežnih količin DARPina iz organizma.



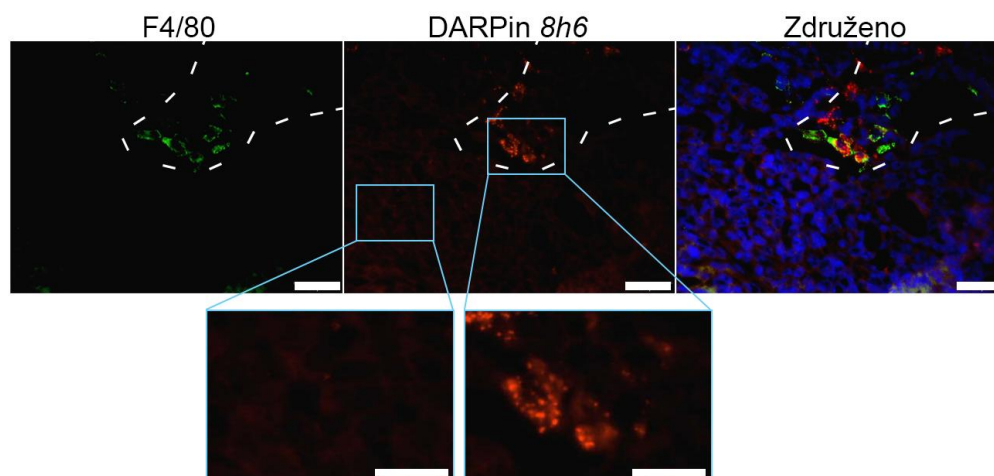
Slika 35: Optično slikanje izoliranih organov 3 h po administraciji fluorescentnih DARPinov *E3_5*, *81* ali *8h6* v modelu PyMT. a) reprezentativne slike organov (Li = jetra, S = vranica, Ln = bezgavke, T = tumor, H = srce, Lu = pljuča, K = ledvice). b) Kvantifikacija fluorescentnih signalov v organih vseh miši (N = 4) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Podoben trend smo opazili tudi za časovno točko 72 h po administraciji. V tem primeru je bil tako v tumorju kot v jetrih signifikantno višji signal za DARPina *81* in *8h6* v primerjavi z neselektivnim DARPinom *E3_5*. Prav tako je bil v primeru DARPinov *81* in *8h6* signal v tumorju signifikantno višji kot v ostalih organih, razen v jetrih in ledvicah (Slika 36).



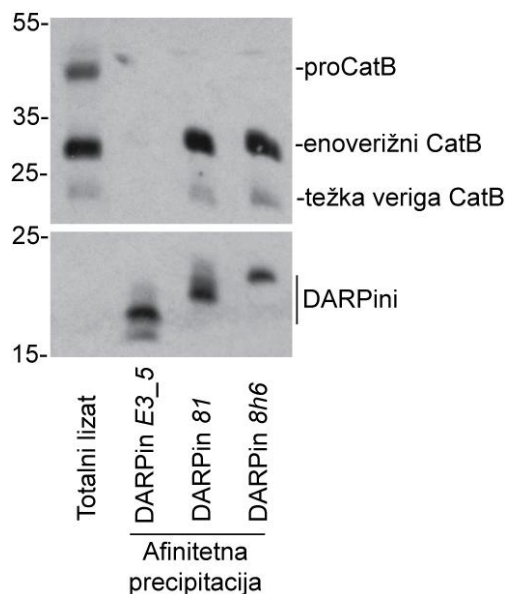
Slika 36: Optično slikanje izoliranih organov 72 h po administraciji fluorescentnih DARPinov *E3_5*, *81* ali *8h6* (Li = jetra, S = vranica, Ln = bezgavke, T = tumor, H = srce, Lu = pljuča, K = ledvice). a) Reprezentativne slike organov v modelu PyMT. b) Kvantifikacija fluorescentnih signalov v organih vseh miši (N = 4) * p<0,05 ** p<0,01 ***p<0,001.

Lokalizacijo fluorescentnega DARPina *8h6* v tumorjih smo podrobneje analizirali s histokemijsko analizo tkiva. V histoloških rezinah smo posebej označili površinski označevalec za makrofage F4/80 (Slika 37) in jih analizirali s fluorescentno mikroskopijo. Ugotovili smo, da se DARPin *8h6* nahaja tako v makrofagih kot tudi v okoliških tumorskih celicah.



Slika 37: Histokemijska analiza tumorskega tkiva po administraciji fluorescentnega DARPina *8h6* v modelu PyMT. Ob časovni točki 3 h po administraciji fluorescentnega DARPina *8h6* (rdeče) smo rezine tumorskega tkiva označili s protitelesi proti površinskemu označevalcu makrofagov F4/80 in s sekundarnimi protitelesi, označenimi s fluorescentnim barvilom Alexa488 (zeleno) ter barvilom DAPI, ki obarva jedra celic (modra). Skala na zgornjih slikah = 20 μm ; skala na spodnjih slikah = 10 μm .

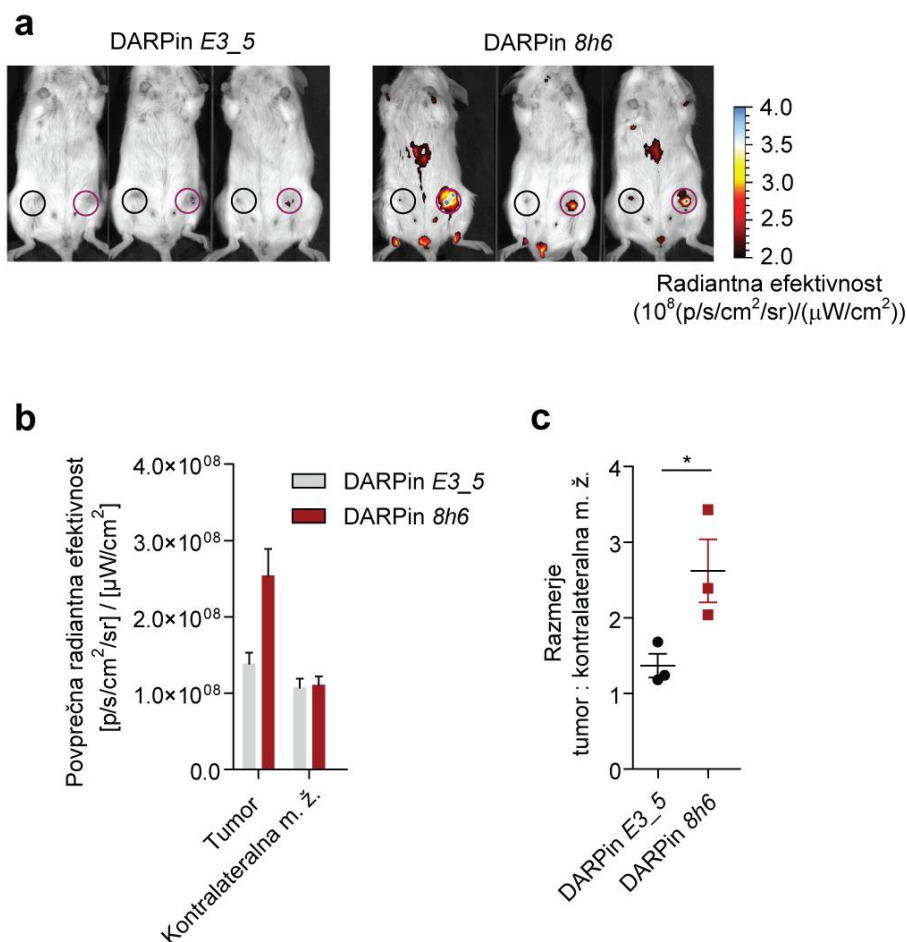
V modelu PyMT smo naredili še neodvisni poskus, s katerim smo želeli potrditi interakcijo DARPinov *8h6* in *81* s katepsinom B v tumorskem tkivu. V ta namen smo intratumoralno administrirali biotinilirane DARPine, nato pa izolirali tumorje in pripravili tkivne lizate ter naredili afinitetno precipitacijo s streptavidinom, konjugiranim z agarozo. Vzorce po afinitetni precipitaciji smo analizirali z ločbo na NaDS-PAGE in prenosom po Westernu, nato pa smo izvedli detekcijo s protitelesi proti katepsinu B. Ob primerjavi s tkivnim lizatom tumorja, kjer nismo naredili afinitetne precipitacije (totalni lizat), smo ugotovili, da DARPina *8h6* in *81* interagirata z zrelo obliko katepsina B (enoverižna in težka veriga), ne pa tudi s prokatepsinom B. Neselektivni DARPin *E3_5* ni interagiral s katepsinom B (Slika 38).



Slika 38: Afinitetna precipitacija po intratumoralni aplikaciji biotiniliranih DARPinov. Zgornji del: detekcija s protitelesi proti katepsinu B in sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s HRP. Spodnji del: detekcija s streptavidinom, konjugiranim s HRP.

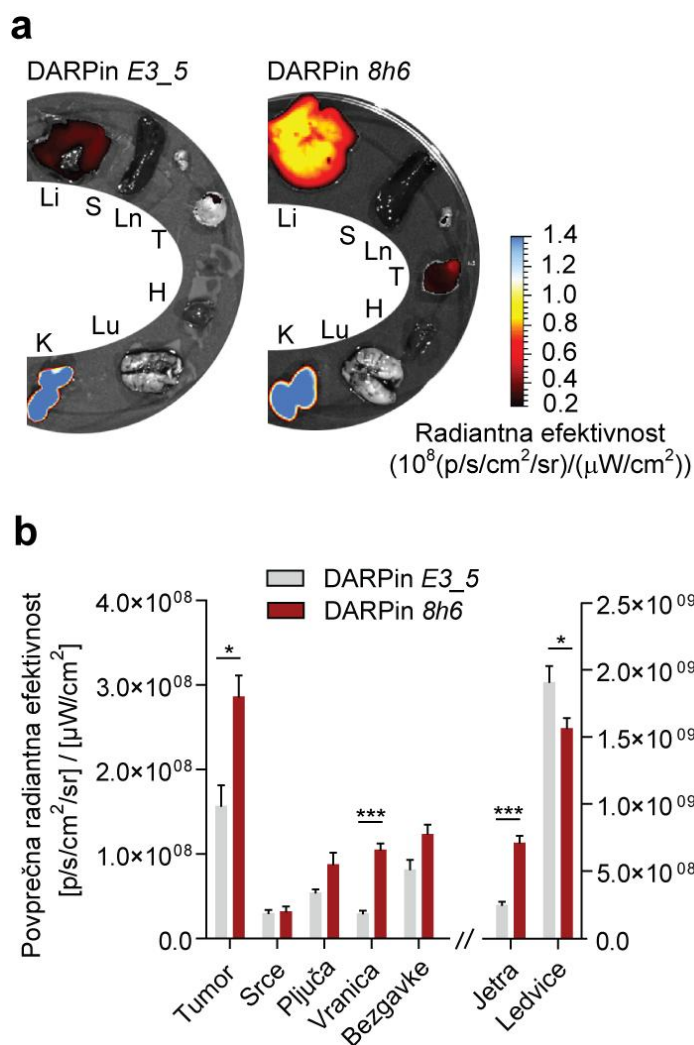
4.1.5.3 Spremljanje biodistribucije DARPinov v modelu mlečne žleze 4T1

V naslednjem koraku smo želeli preveriti, če je mogoče s fluorescentnim DARPinom *8h6* detektirati povišane vrednosti katepsina B še v kakšnem drugem modelu poleg modela PyMT. To smo preverili v sorodnem modelu tumorja mlečne žleze 4T1 z neinvazivnim optičnem slikanjem 3 h po administraciji (Slika 39a). V primeru administracije fluorescentnega DARPina *8h6* smo izmerili signifikantno višje vrednosti fluorescence na območju tumorja kot na območju kontralateralne mlečne žleze. Signali na območju tumorja in kontralateralne mlečne žleze pri DARPinu *E3_5* so bili signifikantno nižji od tumorskega signala pri DARPinu *8h6* (Slika 39b). Prav tako je bilo višje razmerje med signali na območju tumorja in signali na območju kontralateralne mlečne žleze za DARPin *8h6* v primerjavi z DARPinom *E3_5* (Slika 39c).



Slika 39: Neinvazivno optično slikanje z DARPini v tumorskem modelu 4T1. a) Optično slikanje ob časovni točki 3 h po intravenozni administraciji DARPinov. Označena so področja tumorjev (rdeč krog) in kontralateralnih mlečnih žlez (črn krog). b) Kvantifikacija signalov iz označenih področij na sliki (a). c) Razmerje signalov iz označenih področij tumorjev in označenih področij kontralateralnih mlečnih žlez ob izbranih časovnih točkah. * $p < 0,05$.

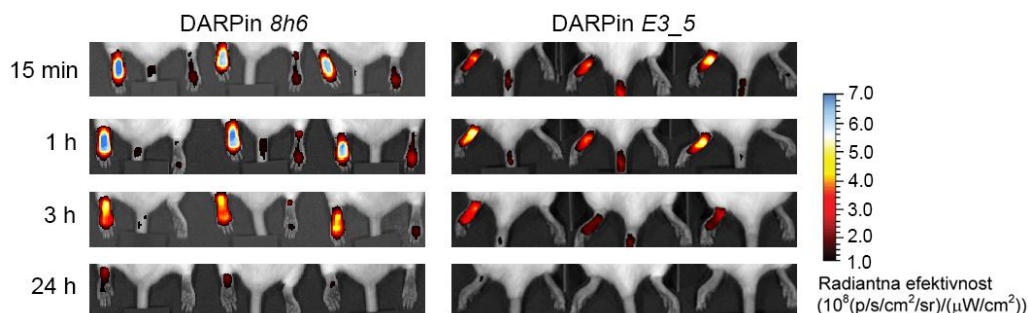
Naredili smo tudi analizo fluorescentnih signalov v izoliranih organih ob časovni točki 3 h po administraciji fluorescentnih DARPinov (Slika 40a). Ugotovili smo, da je signal pri DARPinu *8h6* najvišji v tumorju, z izjemo jeter in ledvic, ki so udeležene pri izločanju presežnega DARPina iz telesa. Signal v tumorjih, vranici in jetrih je bil signifikantno višji v primeru administracije DARPina *8h6* kot neselektivnega DARPina *E3_5*, kar je skladno z visokimi koncentracijami katepsina B v teh tkivih.



Slika 40: Optično slikanje izoliranih organov 3 h po administraciji fluorescentnih DARPinov *E3_5* ali *8h6* v modelu 4T1. a) Reprezentativne slike organov (Li = jetra, S = vranica, Ln = bezgavke, T = tumor, H = srce, Lu = pljuča, K = ledvice). b) Kvantifikacija fluorescentnih signalov v organih vseh miši (N = 4) * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$.

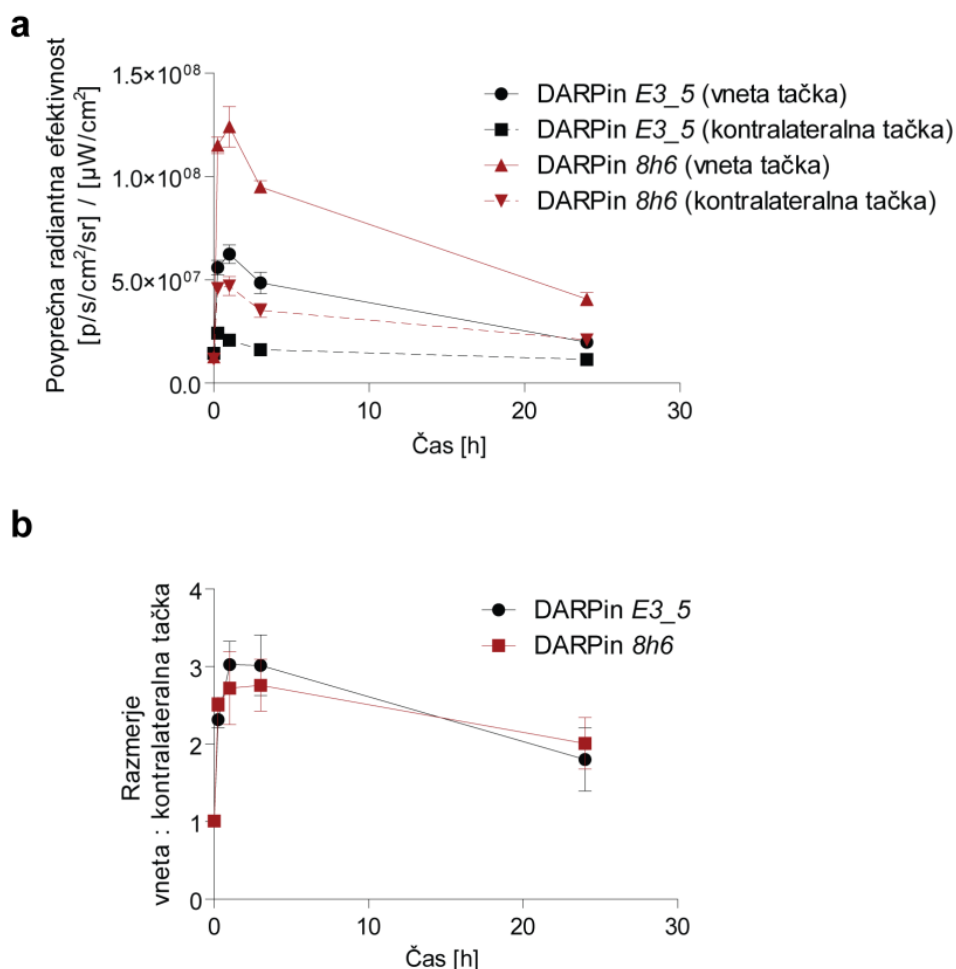
4.1.5.4 Spremljanje biodistribucije DARPinov v modelu akutnega vnetja tačke

Drug alternativni model, ki smo ga izbrali za analizo uporabnosti fluorescentnega DARPina *8h6*, je bil model akutnega vnetja tačke z zymosanom. Po intravenozni administraciji fluorescentnih DARPinov *8h6* ali *E3_5* smo ob izbranih časovnih točkah spremljali signal v vneti tački in ga primerjali s kontralateralno tačko (Slika 41).



Slika 41: Neinvazivno optično slikanje z DARPini v modelu akutnega vnetja tačke z zymosanom ob izbranih časovnih točkah po administraciji (leva tačka: vnetje z zymosanom; desna kontralateralna tačka: brez vnetja).

Signale na območju vnete in kontralateralne tačke smo kvantificirali in ugotovili, da je ob vseh časovnih točkah signal na območju vnete tačke signifikantno višji kot v primeru kontralateralne tačke za oba DARPina, kar kaže na delno nespecifično zadrževanje DARPinov na območju akutnega vnetja. Kljub temu pa je bil signal na območju vnete tačke signifikantno višji v primeru DARPina *8h6* kot pa v primeru DARPina *E3_5*, kar kaže na povišane količine katepsina B na območju vnetja (Slika 42).



Slika 42: Kvantifikacija fluorescentnih signalov v primeru modela akutnega vnetja z zymosanom. a) Kvantifikacija povprečne radiantne učinkovitosti iz območja vnetih in

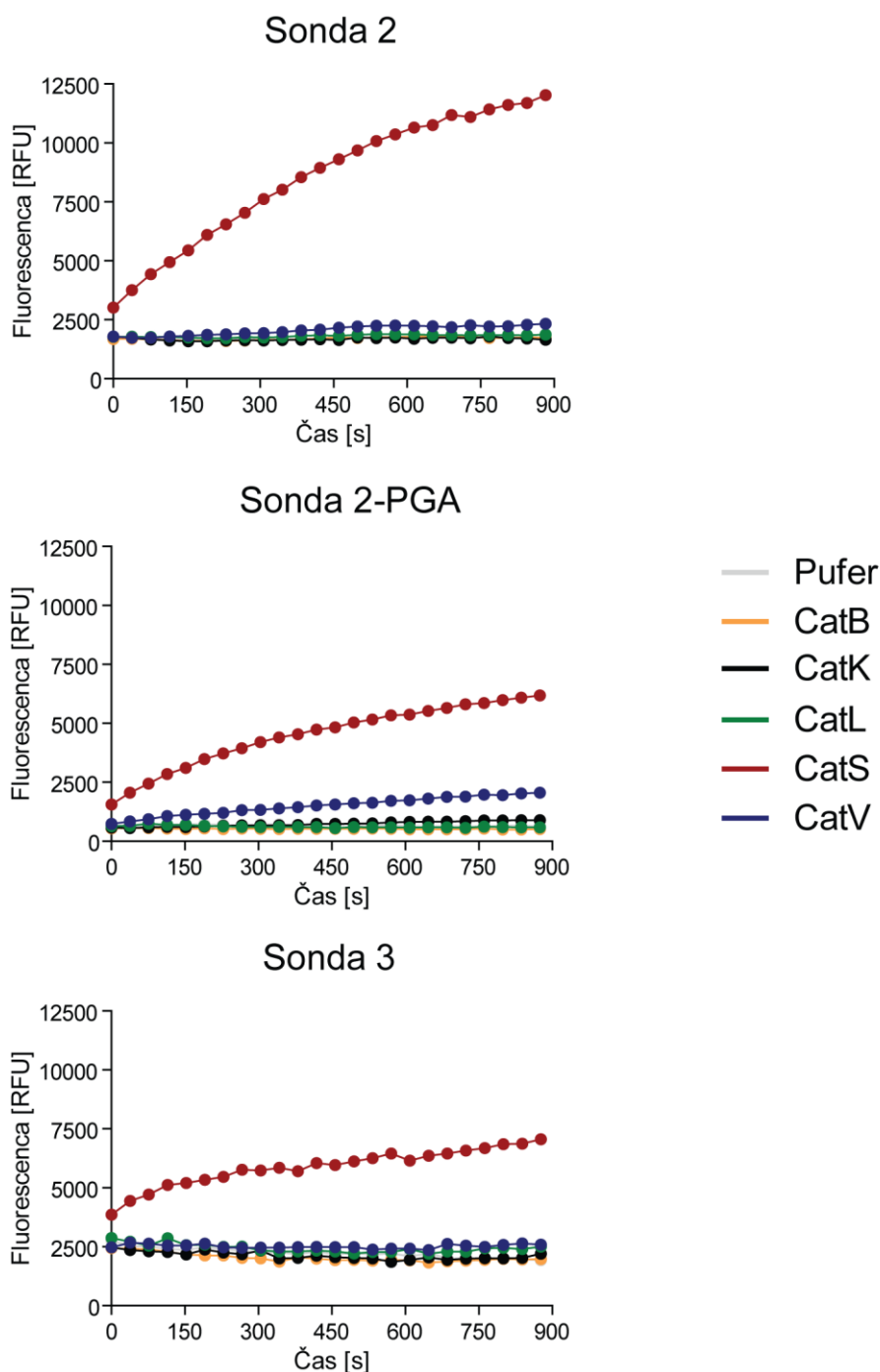
kontralateralnih tačk. b) Razmerje med signalom na območju vnete in signalom na območju kontralateralne tačke.

4.2 Karakterizacija pametnih substratnih sond za katepsin S

4.2.1 Analiza selektivnosti pametnih substratnih sond

V drugem delu doktorske naloge smo raziskovali vpliv konjugacije selektivne pametne substratne sonde 2 za katepsin S s polimerom poliglutaminske kisline (sonda 2-PGA) oziroma s palmitinsko kislino (sonda 3). Osnovna sonda 2 je bila načrtovana na osnovi reverznega pristopa iz znanega inhibitorja (Watzke in sod., 2008). Sonda je bila opremljena s FRET parom fluoroforja Cy5.5 in dušilca BHQ-3, kar omogoči nastanek fluorescentnega signala šele cepitvi s proteazo (Slika 5). Konjugacija s polimerom oziroma palmitično kislino je bila izvedena z namenom vplivati na biodostopnost sonde in zadržati nastali fluorescentni signal na območju bolezni v primeru diagnostične uporabe sonde. Osnovno in lipidirano sondo je sintetizirala dr. Hu v raziskovalni skupini dr. Schultza (EMBL, Heidelberg, Nemčija), PGA konjugat pa je bil sintetiziran v skupini dr. Vincentove (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Španija).

V prvem koraku smo analizirali selektivnost osnovne sonde 2 ter obeh konjugatov z *in vitro* testom z rekombinantnimi cisteinskimi katepsini (Slika 43). Ugotovili smo, da vse substratne sonde cepi le katepsin S. Minimalno naraščanje fluorescence smo opazili še pri katepsinu V, vendar je bil ta signal signifikantno nižji v primerjavi s tistim pri katepsinu S.



Slika 43: Test selektivnosti substratnih sond 2, 2-PGA in 3. Sonde smo inkubirali z rekombinantnimi Katepsini B, K, L, S, V ali le s pufrom in spremljali naraščanje fluorescence.

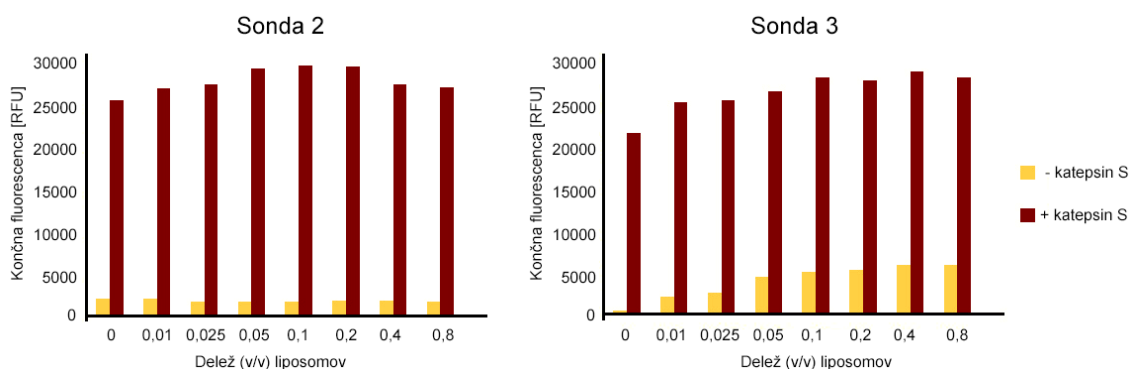
Interakcijo substratov s Katepsinom S smo podrobneje analizirali s kinetično karakterizacijo (Tabela 6). Ugotovili smo, da je osnovna sonda 2 najboljši substrat Katepsina S, saj je bil parameter k_{cat}/K_M signifikantno višji kot v primeru ostalih dveh sond. Pri konjugatu sonda 2-PGA se je znižala afiniteta sonde do Katepsina S, kar predstavlja K_M , kar je vodilo tudi do znižane katalitične učinkovitosti k_{cat}/K_M . Lipidirana sonda 3 je imela znatno nižji parameter k_{cat}/K_M v primerjavi s sondo 2, medtem ko je bila afiniteta podobna. Ko smo meritve kinetike ponovili v prisotnosti liposomov, ki lahko zasidrajo lipidirano

sondo 3 zaradi prisotnosti lipidnega repa, smo izmerili k_{cat}/K_M , ki je bil višji za približno en velikostni razred (Tabela 6), medtem ko osnovna sonda ni spremenila kinetičnih parametrov v prisotnosti liposomov (rezultat ni prikazan).

Tabela 6: Kinetična karakterizacija substratnih sond 2, 2-PGA in 3.

	Sonda 2	Sonda 2-PGA	Sonda 3	Sonda 3 + liposomi
K_M [μM]	$1,8 \pm 1,1$	14 ± 4	$1,7 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,7$
k_{cat}/K_M [$(\mu\text{M})^{-1}\text{s}^{-1}$]	41700	12300	2700	19500

Vpliv liposomov na optične lastnosti sonde 3 smo podrobneje preučili, tako da smo višali koncentracije liposomov ob prisotnosti sonde 3 in merili fluorescentni signal (Slika 44, rumeni stolpci). Primerjali smo ga s fluorescentnim signalom, ki ga dobimo po dolgotrajni inkubaciji sonde s katepsinom (Slika 44, rdeči stolpci). Ugotovili smo, da se s koncentracijo liposomov viša fluorescentni signal tudi v odsotnosti katepsina S, vendar ta signal nikoli ni presegel 20 % celotnega signala, ki ga generira cepitev s katepsinom S. Na sondo 2 liposomi niso imeli nobenega vpliva.

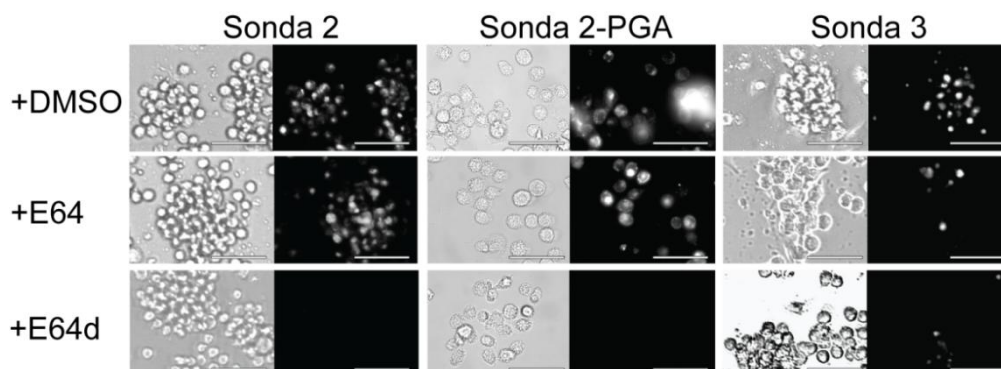


Slika 44: Vpliv liposomov na sondi 2 in 3. Sonde smo inkubirali z naraščajočo koncentracijo liposomov brez dodatka katepsina S (rumeni stolpci) ali z dodatkom katepsina S (rdeči stolpci) ter izmerili končni fluorescentni signal.

4.2.2 Analiza aktivnosti sond na živih celicah

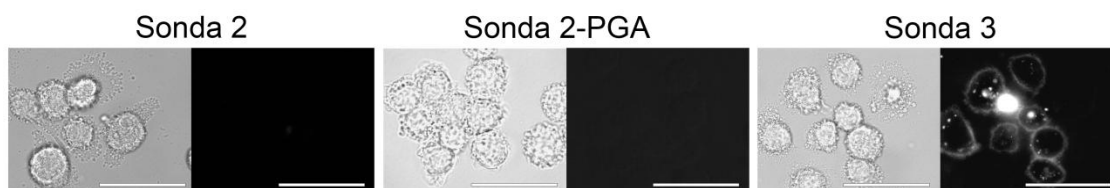
Vse tri sonde so izkazale visoko selektivnost za detekcijo katepsina S v *in vitro* testih, zato smo ovrednotili njihovo uporabnost za zaznavanje te proteaze v celičnih modelih. V prvem koraku smo uporabili sistem diferenciranih makrofagov THP-1, kjer je znana visoka prisotnost katepsina S. Celice smo inkubirali s sondami in spremljali nastanek fluorescentnega signala z mikroskopijo (Slika 45). Izvedli smo tudi kontrolne poskuse, kjer smo blokirali aktivnost zunajceličnih katepsinov z inhibitorjem E64, ki ne prehaja celičnih membran, oziroma znotrajceličnih katepsinov z inhibitorjem E64d, ki prehaja celično membrano. Ugotovili smo, da vse tri sonde v celicah proizvedejo fluorescentne signale, ki jih lahko blokiramo z inhibicijo katepsina S. V primeru sonde 2 in sonde 2-PGA je celotni signal nastal šele znotrajcelično, saj inhibitor E64 ni imel nobenega vpliva na nastanek signala, inhibitor E64d pa je v celoti blokiral nastanek signala. Drugače je bilo v primeru

sonde 3, kjer je že inhibicija zunajceličnega katepsina S z inhibitorjem E64 blokirala nastanek dela signala, medtem ko inhibicija znotrajceličnih katepsinov z inhibitorjem E64d ni v celoti blokirala signala. To kaže na delno cepitev sonde že v zunajceličnem oziroma membranskem okolju.



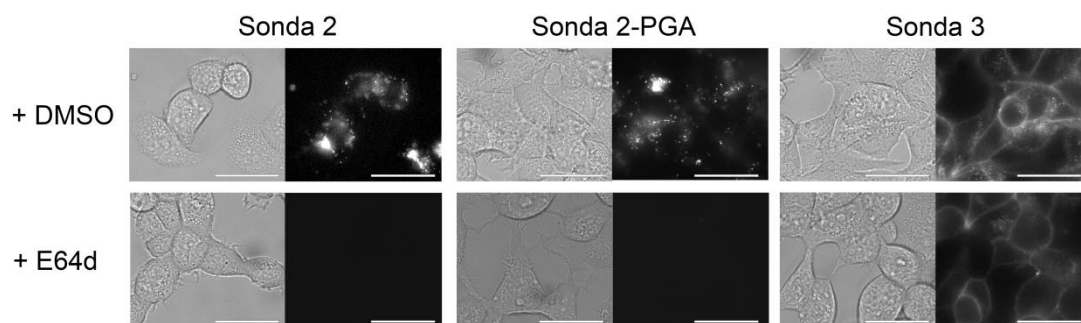
Slika 45: Spremljanje aktivacije substratnih sond v celicah THP-1 s fluorescentno mikroskopijo. V kontrolnih diferenciranih celicah THP-1 smo blokirali zunajcelične katepsine z inhibitorjem E64 oziroma znotrajcelične katepsine z inhibitorjem E64d. Fluorescentno mikroskopijo smo izvedli 2 h po inkubaciji s sondo 2 oziroma sondo 2-PGA ter 4 h po inkubaciji s sondo 3. Skala = 50 μm .

V naslednjem koraku smo preverili splošen mehanizem vstopa sond v celice, tako da smo blokirali aktivno endocitozo z ohlajanjem celic na 4 $^{\circ}\text{C}$, nato pa inkubirali sonde s celicami in po spiranju spremljali nastanek fluorescentnega signala (Slika 46). V primeru sonde 2 in sonde 2-PGA nismo zaznali nobenega signala, kar nakazuje na dejstvo, da je za vstop sond v celice potreben aktiven transport preko membrane, šele nato pa sta sondi aktivirani znotrajcelično. Drugače je bilo v primeru sonde 3, kjer smo zaznali znotrajcelični in membranski signal, kar kaže na asociacijo sonde s celično membrano že v hladnem ter na kasnejše procesiranje sonde na območju membrane in znotrajcelično.



Slika 46: Spremljanje mehanizma vstopa sond v celice THP-1 s fluorescentno mikroskopijo. Diferenciranim celicam THP-1 smo blokirali aktivno endocitozo z ohlajanjem na 4 $^{\circ}\text{C}$, nato pa jih inkubirali s sondami. Po spiranju smo spremljali nastanek fluorescentnega signala z inkubacijo na 37 $^{\circ}\text{C}$ za 15 min. Skala = 20 μm .

V sklepnem poskusu pa smo želeli ovrednotiti sonde še v celičnem modelu raka dojke s celicami MCF-7, ki izražajo nižje količine katepsina S kot diferencirani makrofagi. Tudi v tem primeru smo uspešno zaznali vse tri aktivirane sonde s fluorescentno mikroskopijo ter signal uspešno blokirali v primeru sonde 2 in sonde 2-PGA z uporabo inhibitorja znotrajceličnih katepsinov E64d. V primeru sonde 3 smo z inhibitorjem E64d blokirali le znotrajcelični signal, medtem ko je bil membranski signal še vedno prisoten, kar nakazuje na aktivacijo te sonde s katepsinom S v membranskem okolju (Slika 47).



Slika 47: Spremljanje aktivacije substratnih sond v celicah MCF7 s fluorescentno mikroskopijo. V kontrolnih celicah smo blokirali znotrajcelične katepsine z inhibitorjem E64d. Fluorescentno mikroskopijo smo izvedli 2 h po inkubaciji s sondami. Skala = 20 μm .

Poglavje 5

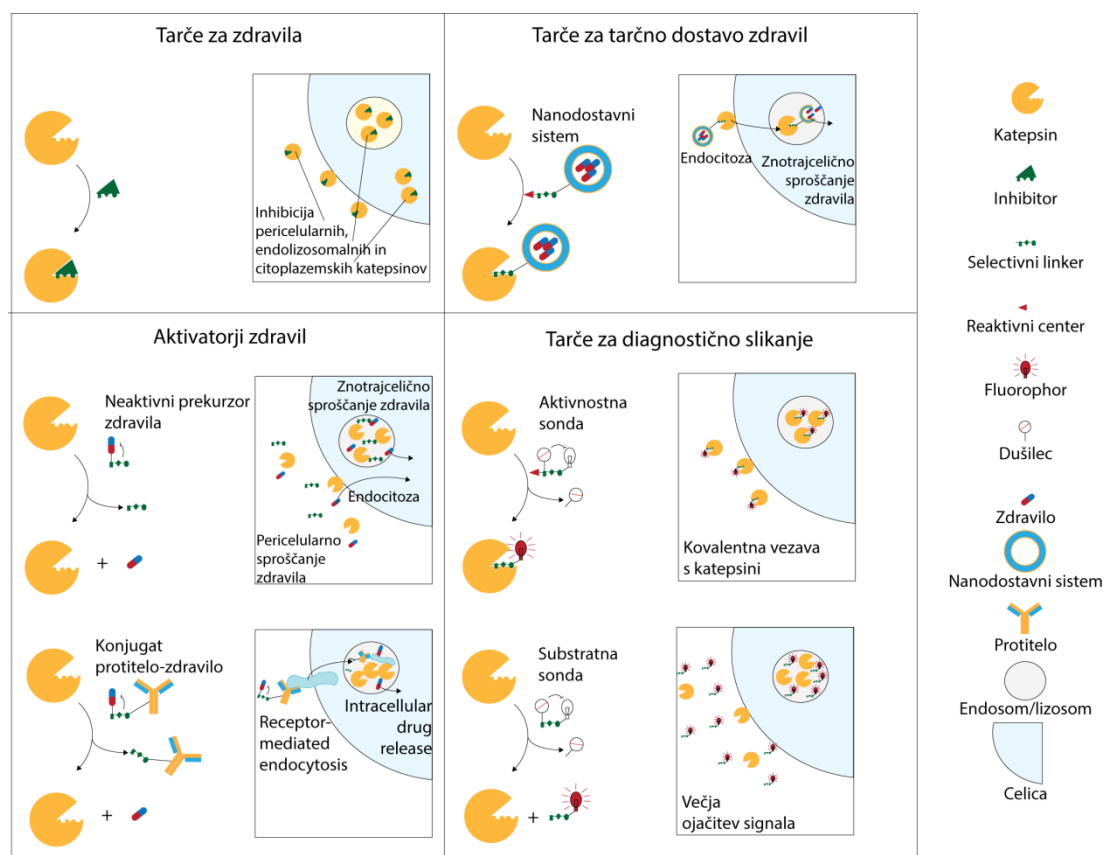
Razprava

V okviru doktorske naloge smo razvijali nova molekularna orodja za selektivno detekcijo Katepsinov B in S, ki so kompatibilna za neinvazivno ali minimalno invazivno diagnostično slikanje vnetnih bolezni, kot so rak in vnetne bolezni sklepov. Razvoj novih natančnih diagnostičnih tehnik je ključen predvsem za zgodnje odkrivanje bolezni, ki v številnih primerih s trenutnimi kliničnimi tehnikami ni mogoče.

Eno od področij, ki ponuja številne možnosti za zelo selektivno diagnostično detekcijo vnetnih bolezni, je molekularno diagnostično slikanje, ki temelji na afinitetnih, aktivnostnih in substratnih sondah (Garland in sod., 2016). Osnovni princip vseh treh tipov sond je v visoko selektivnem prepoznavanju tarčnih molekul, ki so diferencialno izražene na področju bolezni in zato ob vezavi ali encimski pretvorbi sonde ustvarijo kontrast pri detekciji, potreben za diagnozo bolezni. Medtem ko so afinitetne sonde zaradi možnosti konjugacije z raznolikimi reporterskimi skupinami kompatibilne s številnimi metodami za slikanje, kot so optično slikanje, PET/SPECT in MRI, to ne velja za aktivnostne in substratne sonde. Te so namreč v osnovi fluorescentne sonde, ki izkoriščajo princip FRET za prehod iz temnega v svetlo stanje po encimski pretvorbi sonde, kar omogoča doseganje visokih kontrastov in nizkih signalov ozadja. Po drugi strani pa ima optično slikanje pomembno omejitev v okviru klinične diagnostike, saj je omejeno z nizko penetracijo svetlobe skozi tkiva. Svetloba valovne dolžine v območju bližnje infrardeče svetlobe (650 nm - 900 nm) ponuja najglobljo penetracijo ob minimalnem ozadju tkivne avtofluorescence, a še vedno omogoča le detekcijo do globine tkiva le nekaj cm (Hilderbrand in Weissleder, 2010). Tehnike optičnega slikanja imajo zato največjo uporabno vrednost pri intraoperativni diagnostiki ter endoskopskih preiskavah, kjer je tkivo interesa v neposrednem vidnem polju diagnostičnega detektorja.

Molekularno diagnostično slikanje smo identificirali kot eno štirih najbolj aktivnih raziskovalnih in razvojnih področij v povezavi s cisteinskimi Katepsini (Slika 48). Poleg tega so Katepsini pomembne tarče za zdravila, saj je 14 Katepsinskih inhibitorjev v preteklosti že vstopilo v klinične faze, a še noben ni bil odobren za terapevtsko uporabo. Najaktivnejši razvoj je bil pri tarčenju Katepsina K pri osteoporozi in nekaterih ostalih kostnih obolenjih, Katepsina S pri vnetnih avtoimunskih boleznih, nevropatski bolečini in krvožilnih obolenjih, ter Katepsina B pri boleznih jeter. Katepsini so ključni tudi pri aktivaciji neaktivnih prekurzorjev zdravil v aktivne oblike. Številna farmacevtska podjetja razvijajo konjugate protiteles z zdravili, kjer je zdravilo povezano s protitelesom s povezovalno regijo, ki jo cepijo Katepsini. Protitelesa imajo vlogo tarčne dostave v rakaste ali druge celice, kjer po endocitozi Katepsini cepijo povezovalno regijo in omogočijo delovanje zdravila. Ta pristop je zelo uspešen, na kar kaže tudi zdravilo Adcetris, ki je že dovoljeno za klinično uporabo v terapiji Hodkinovega limfoma. V zadnjih letih pa je

postalo aktivno še področje tarčenja katepsinov z nanodostavnimi sistemi za dostavo zdravil (Kramer in sod., poslano v objavo).



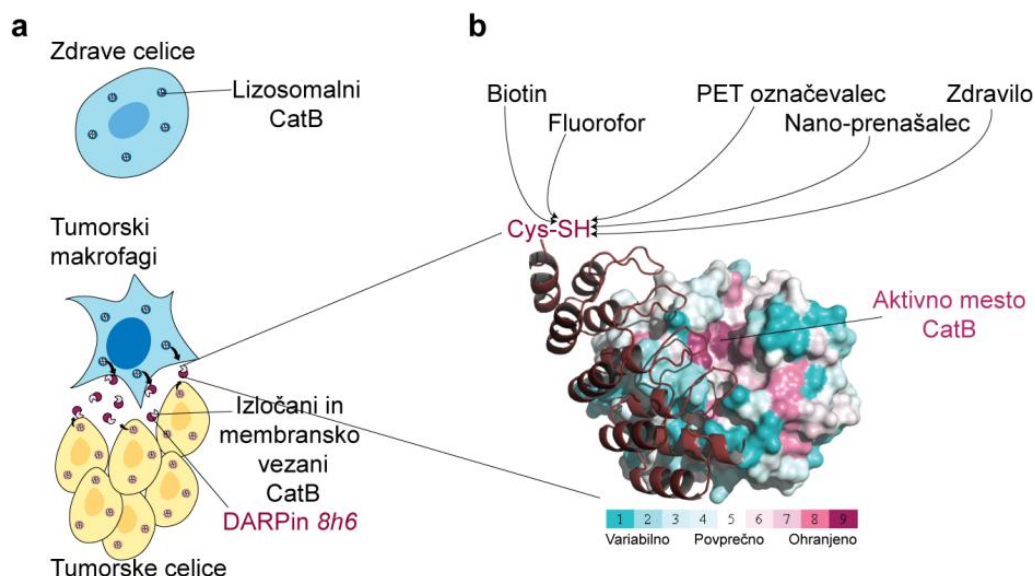
Slika 48: Glavne vloge katepsinov v terapevtskem in diagnostičnem razvoju. Katepsini so uveljavljene tarče za zdravljenje bolezni s selektivnimi inhibitorji (levo zgoraj) in za aktivacijo neaktivnih prekurzorjev zdravil (levo spodaj). Povišane vrednosti katepsinov na območju bolezni so vodile do eksperimentalnih pristopov, kjer so katepsini tarče za tarčno dostavo zdravil (desno zgoraj) ali diagnostično slikanje (desno spodaj).

V našem delu smo se osredotočili na dva predstavnika iz družine enajstih cisteinskih katepsinov, katepsina B in S, ki sta prekomerno izražena tako v različnih oblikah raka, pri boleznih sklepov, kot sta revmatoidni artritis in osteoartritis, pa tudi v nekaterih drugih vnetnih boleznih, kot sta ateroskleroza in vnetna črevesna bolezen. Za katepsine je značilna visoka strukturna ohranjenost in zelo podobna substratna specifičnost, zato predstavljajo zahtevne tarče za razvoj selektivnih orodij za diskriminacijo med posameznimi člani družine. Čeprav so se številne širokospecifične sonde, ki prepoznajo več katepsinov hkrati, izkazale za zelo uporabne tako v predklinični diagnostični detekciji nekaterih vnetnih bolezni kot v prvih kliničnih testih pri ljudeh (Whitley in sod., 2016; Withana in sod., 2016b), številne raziskave kažejo, da imajo lahko posamezni katepsini pri boleznih raznolike ali celo nasprotujoče vloge. En tak primer je protitumorska vloga katepsina L v skvamoznem karcinomu kože (Benavides in sod., 2012), medtem ko je vloga tega katepsina v številnih drugih oblikah raka ravno nasprotna. Poleg tega je bilo v številnih primerih povečano izražanje ali aktivnost katepsinov pri boleznih omejeno le na posamezne katepsine oziroma je le aktivnost posameznih katepsinov korelirala z napredovanjem bolezni. Ilustrativen primer je razlikovanje med revmatoidnim artritisom

in osteoartritisom. Aktivnosti in nivoji izražanja katepsina B korelirajo s stopnjo napredovanja osteoartritisa, medtem ko v primeru revmatoidnega artritisa korelira aktivnost katepsina S (Ben-Aderet in sod., 2015; Pozgan in sod., 2010). V takšnih primerih je uporabnost širokospecifičnih sond vprašljiva, saj se lahko povišani signal zaradi povišanega izražanja posameznega katepsina skriva v signalu ozadja, ki ga proizvedejo ostali katepsini, katerih izražanje se ne spremeni. Selektivne sonde imajo poleg tega dodatno vrednost, saj z njimi lahko merimo *in vivo* odziv na selektivne inhibitorje katepsinov.

V prvem delu doktorskega dela smo se osredotočili na pripravo selektivne afinitetne sonde za katepsin B. Raziskave na celičnih in mišjih modelih so pokazale, da ima katepsin B pomembno vlogo pri napredovanju in zasevanju raka, kjer sodeluje predvsem v pericelularni proteolizi zunajceličnega matriksa na invazivni fronti tumorjev. Rakaste in imunske celice v tumorskem mikrookolju izločajo katepsin B v membranske kaveole in v zunajceličnino, medtem ko se v zdravih tkivih nahaja v znotrajceličnem endolizosomalnem sistemu (Cavallo-Medved in sod., 2005; Vasiljeva in sod., 2006; Yan in sod., 2016). Poleg tega je izražanje katepsina B povišano v raku debelega črevesa, dojke, pljuč, glave in vratu ter melanomu in gliomu, kar kaže na možnosti za diagnostično detekcijo s selektivnimi sondami za katepsin B (Kos in sod., 1995; Lah in sod., 2000). Podobno vlogo ima katepsin B v revmatoidnem artritisu ter osteoartritisu, kjer ga predvsem aktivirani hondrociti in sinovialni fibroblasti izločajo v zunajceličnino, kjer sodeluje pri razgradnji hrustanca in s tem pripomore k degenerativnim spremembam. Biopsije sinovialnih tekočin so pokazale korelacijo med povišanimi vrednostmi katepsina B in stopnjo razvitosti osteoartritisa (Ben-Aderet in sod., 2015; Pozgan in sod., 2010).

V literaturi so že opisane nekatere pametne substratne sonde, ki delno ali zelo selektivno prepoznajo katepsin B in so potencialno primerne za optično diagnostično slikanje. Ohlapno selektivna polimerna substratna sonda C-PGC je bila uporabljena za diagnostično slikanje raka dojke, ateroskleroze (Chen in sod., 2002), revmatoidnega artritisa (Wunder in sod., 2004) in osteoartritisa (Lai in sod., 2004), medtem ko je bila komercialna substratna sonda CatB FAST uporabljena za detekcijo raka požiralnika (Habibollahi in sod., 2012), raka jajčnika (Hensley in sod., 2012) in ateroskleroze (Jaffer in sod., 2011). Opisan je tudi sistem za MRI slikanje, ki temelji na konjugiranih liposomih z enkapsuliranim MR kontrastnim sredstvom. Liposomi so bili konjugirani s selektivnim kovalentnim inhibitorjem katepsina B, kar je omogočilo uspešno detekcijo tumorjev mlečne žleze v mišjem modelu (Mikhaylov in sod., 2014). Ta raziskava je pokazala tudi na biodostopnost katepsina B v tumorskem mikrookolju za tarčenje z makromolekularnimi reagenti, ki ne vstopajo pasivno v celice (Slika 49a). Ključna pomanjkljivost substratnih sond je v nezdružljivosti s tehnikami detekcije za globinsko slikanje, kot so PET/SPECT ali MRI, medtem ko je ključna pomanjkljivost opisanega liposomalnega sistema v dolgem času, ki je potreben za doseganje kontrasta med obolelim tkivom in ozadjem, kar je posledica počasnega izločanja liposomov zaradi njihove velikosti. Z razvojem nove afinitetne sonde smo želeli te omejitve premestiti, zato smo za ligand sonde izbrali vezavni protein iz knjižnice DARPInov, za katere je značilno hitro izločanje iz krvnega obtoka in možnost konjugacije z raznolikimi reporterskimi sredstvi (Kramer in sod., sprejeto v objavo). Dodatna ovira pri razvoju novih substratnih ali aktivnostnih sond je še v omejenem načinu možnosti za selektivno tarčenje katepsina B, saj je pri teh dveh tehnikah zaradi potrebe po encimatski pretvorbi vedno tarčeno aktivno mesto encima. To je v skupini cisteinskih katepsinov zelo ohranjeno, zato je diferenciacija med različnimi katepsini zahtevna. V primeru razvoja afinitetne sonde na osnovi DARPina se nismo omejili le na tarčenje aktivnega mesta, kar je zvišalo možnosti za pripravo visokoselektivne sonde (Slika 49b).



Slika 49: Shematski prikaz tarčenja katepsina B z DARPinom *8h6*. a) Katepsin B je v zdravih celicah izražen v znotrajceličnih veziklih, medtem ko je v tumorskih celicah ali aktiviranih makrofagih translociran na celično površino in v zunajcelični prostor. Tam postane katepsin B dostopen za interakcijo z DARPinom, ki ga administriramo sistemsko. b) Skupina cisteinskih katepsinov ima zelo ohranjeno tridimenzionalno strukturo, posebej v okolici aktivnega mesta. Z DARPini pa smo uspeli tarčiti variabilno regijo na L-domeni, kar je bilo ključno za selektivnost DARPina *8h6*.

Za izbor selektivnih DARPinov se najpogosteje uporabljata fagna ali ribosomalna predstavitev DARPinske knjižnice, ki ji sledijo številni presejalni testi, s katerimi iz raziskave izločimo DARPine z neustreznimi lastnostmi. V primeru klasične ribosomalne predstavitve so potrebni 3 do 4 krogi predstavitve proti tarčnemu proteinu, da iz reakcije odstranimo večino nespecifičnih DARPinov (Wyler in sod., 2007), medtem ko lahko z modificiranimi knjižnicami in prilagojenimi pogoji ribosomalne predstavitve selekcijo izvedemo tudi enem samem krogu (Schilling in sod., 2014). V biomedicinskih raziskavah je pomembna prenosljivost reagentov iz živalskih sistemov v človeškega, kar omogoči preizkušanje učinkovitosti reagentov v živalskih eksperimentalnih modelih. Pri delu smo zato želeli pridobiti DARPine, ki se vežejo tako na mišji kot človeški katepsin B, zakar smo že pri obogatitvi knjižnice DARPinov izbrali posebno strategijo, kjer smo v krogih ribosomalne predstavitve izmenjevali mišji in človeški homolog, ali pa smo najprej izvedli štiri kroge predstavitve proti enemu in nato štiri proti drugemu homologu (Slika 10). Takšna strategija je bila predhodno uspešno uporabljena za selekcijo DARPinov proti mišji in človeški proteazi FAP (Roszitski-Voser in sod., neobjavljeni rezultati) in tudi v našem primeru se je izkazala za dobro. Ko smo po četrtem krogu ribosomalne predstavitve izvedli presejalni test ELISA celokupnih bakterijskih lizatov (Slika 14, Tabela 1), smo ugotovili, da so se analizirani DARPini v primeru selekcije le proti človeškemu katepsinu B v večini vezali le na človeški katepsin B in ne na mišjega. Analogno so se DARPini, ki smo jih v procesu ribosomalne predstavitve izpostavili le mišjemu katepsinu B, vezali skoraj izključno na mišji katepsin B in ne na človeškega. Po drugi strani so se DARPini, ki smo jih tekom ribosomalne predstavitve izpostavili obema homologoma, tudi v presejalnem testu

vezali tako na mišji kot človeški katepsin B. Ob tem smo ugotovili, da je bila najuspešnejša strategija izmenjave tarč v vsakem krogu, saj je bil tako po štirih kot po osmih krogih delež vezavnih proteinov relativno visok. Za manj uspešen pristop se je izkazala menjava tarč po štirih krogih predstavitve. Vzrok je najverjetneje v previsoki selektivnosti obogatene DARPinске knjižnice že po štirih krogih predstavitve proti eni tarči, kar v nadaljnjih krogih, ko se tarča zamenja, privede do selekcije le manjšega števila klonov. Za nadaljnje presejalne teste smo izbrali 9 klonov (Slika 15), med katerimi je bil en iz selekcije le proti mišjemu katepsinu B (DARPin *4m3*), dva iz selekcije le proti človeškemu katepsinu B (DARPina *4h1* in *4h7*), ostali pa iz selekcije proti obema homologoma (DARPini *410*, *8h1*, *8h2*, *8h4*, *8h6* in *81*).

Pri tarčenju katepsina B v diagnostičnih aplikacijah je pomemben dejavnik nakisano zunajcelično okolje, ki ga najdemo v nekaterih primerih tumorjev (Rothberg in sod., 2013) ali vnetih sinovialnih tekočin (Fujii in sod., 2015), kjer se katepsin B nahaja. Tudi v primeru potencialnega znotrajceličnega tarčenja katepsina B je pomembno upoštevati pH, saj se katepsin B nahaja v kislih organelih. Izbrane DARPine smo zato analizirali z afinitetnim pH testom, kjer smo želeli preveriti, ali tudi v kislem pH ohranijo sposobnost vezave na katepsin B. V tem testu smo potrdili, da se DARPini vežejo na ustrezni homolog v skladu s selekcijo z ribosomalno predstavitvijo, poleg tega pa smo opazili trend znižanja vezave kislem pH (Slika 16). Od bispecifičnih DARPinov je bil izjema DARPin *8h6* in delno DARPin *81*, pri katerih se signal v afinitetnem testu ni bistveno znižal ob nakisanju. Interakcijo s katepsinom B smo nato okarakterizirali kvantitativno z metodo SPR, kjer smo ponovno potrdili vezavo DARPinov na ustrezen homolog v skladu z ribosomalno predstavitvijo, poleg tega pa smo določili kinetične parametre vezave in konstanto disociacije (Tabela 2). Ugotovili smo, da se DARPini na katepsin B vežejo s konstanto disociacije v nizkem nanomolarnem ali pikomolarnem območju. Pozorni smo bili predvsem na kinetično konstanto razpada kompleksa k_d , ki je bila posebej nizka v primeru DARPinov *8h6* in *81*. Za uspešno diagnostično slikanje je namreč ključen počasen razpad kompleksa med ligandom ter tarčo, kajti v nasprotnem primeru lahko pride do difuzije afinitetne sonde stran od mesta bolezni (Zahnd in sod., 2010). Zadnji presejalni test je bil test inhibicije encimske aktivnosti katepsina B, s katerim smo želeli zožati izbor DARPinov na inhibitorje, saj bi nam to v prihodnosti omogočilo tudi uporabo DARPina v terapevtske namene v primerih, ko lahko zaviranje aktivnosti katepsina B ugodno vpliva na potek bolezni (Mirković in sod., 2015). Ugotovili smo, da so bili vsi DARPini razen DARPinov *4h1* in *4h7* tudi inhibitorji encimske aktivnosti katepsina B. Na podlagi presejalnih testov smo zato izbrali DARPina *8h6* in *81* kot vodilna DARPina za nadaljnjo karakterizacijo.

Ključna lastnost molekularnih sond je selektivnost za tarčni protein. Popolno selektivnost je pogosto težko doseči, sploh v primeru proteinov z visoko stopnjo strukturne podobnosti. Kljub temu pa je razvoj selektivnih DARPinov omogočil razlikovanje med strukturno zelo sorodnimi proteini kot sta kaspaza 3 in kaspaza 7 (Seeger in sod., 2013) ali pa fosforilirana in nefosforilirana oblika ERK2 kinaze (Kummer in sod., 2013). Za DARPina *8h6* in *81* smo zato z afinitetnim testom potrdili visoko selektivnost za mišji in človeški katepsin B, saj se nobeden od DARPinov ni vezal na strukturno zelo sorodne katepsine K, L, S in X (Slika 19). Prav tako DARPina *8h6* in *81* nista inhibirala aktivnosti teh katepsinov (Slika 18). Z afinitetnim testom smo prav tako potrdili vezavo obeh DARPinov na prokatepsin B (Slika 19d). Sledila je podrobna kinetična karakterizacija mehanizma inhibicije encimske aktivnosti katepsina B, s katero smo želeli pridobiti vpogled v vezavne lastnosti DARPinov ter preko konstante inhibicije posredno pridobiti podatke o afiniteti vezave. Izkazalo se je, da ima DARPin *8h6* močnejšo afiniteto kot DARPin *81*, saj so bile konstante inhibicije za dva velikostna razreda nižje v primeru DARPina *8h6* kot v primeru DARPina *81* (Tabela 3). Ta podatek se nekoliko razlikuje od meritev K_D s SPR, kjer sta imela oba DARPina primerljive vrednosti (Tabela 2). Razlika najverjetneje izhaja iz dejstva, da smo pri metodi SPR uporabili biotiniliran katepsin B za imobilizacijo na SPR čip, kar bi lahko vplivalo na vezavo DARPina *81*. Biotinilacija

aminskih skupin na lizinih Katepsina B (Slika 13) spremeni lokalni površinski naboj in lahko povzroči manjše spremembe v strukturi. Tudi med ribosomalno predstavitvijo smo namreč uporabili biotinilirani Katepsin B, kar bi lahko bil vzrok za preferenčno oziroma močnejšo vezavo na biotinilirano obliko Katepsina.

Oba DARPina sta imela zelo podoben inhibicijski mehanizem mešanega tipa s prevladujočo kompetitivno komponento, kar je okarakteriziral parameter α , ki je bil v vseh primerih $1 < \alpha < \infty$ (Slika 11). Poleg tega smo v primeru DARPina *8h6* izmerili hiperbolično inhibicijo, ki nakazuje da lahko kompleks DARPina *8h6* in Katepsina B še vedno katalizira razgradnjo substratov, čeprav z nižjo učinkovitostjo, ker je bil $0 < \beta < 1$. V primeru DARPina *81* in človeškega Katepsina B je bil parameter β prav tako večji od nič, čeprav signifikantno manjši kot v primeru DARPina *8h6* ($\beta = 0,027$), medtem ko je bil v primeru mišjega Katepsina B enak 0, kar kaže na linearno inhibicijo. Takšen inhibicijski mehanizem kaže na vezavo DARPinov stran od cisteina v aktivnem mestu Katepsina B, saj se lahko tvori trojni kompleks med DARPinom, Katepsinom B in substratom z-Arg-Arg-AMC, vendar je afiniteta DARPina oziroma substrata do Katepsina B bistveno znižana (sorazmerno za parameter α). Možnost bi bila alosterična modifikacija, ki je poznana v primeru nekaterih nizkomolekularnih inhibitorjev Katepsina B (Crček, 2016) kot tudi v primeru DARPinskih inhibitorjev kaspaz (Schweizer in sod., 2007), ali pa kompetitivna vezava z akomodacijo, ki je možna v primeru majhnega steričnega prekrivanja med inhibitorjem in substratom.

Za dokončno razrešitev mehanizma vezave smo rešili kristalne strukture kompleksov med človeškim Katepsinom B in DARPinom *8h6* oziroma *81*. Oba DARPina se vežeta s Katepsinom B na zelo podobnem mestu na levi domeni Katepsina B ter deloma zasedata S3 in S2 vezavni mesti v aktivnem mestu, medtem ko so mesta S1, S1' in S2' izpostavljena topilu. To se sklada s karakterizacijo inhibicijskega mehanizma, saj smo za kinetične meritve uporabili dipeptidilni substrat z-Arg-Arg-AMC, ki ob vezavi na Katepsin B zaseda le mesti S2, S1 in del mesta S1'. Nakazuje na možnost delne akomodacije vezave substrata oziroma DARPina na Katepsin B zaradi manjšega steričnega prekrivanja obeh molekul ob vezavi na Katepsin B, kar vodi do znižane afinitete. Prav tako je bila struktura Katepsina B v kompleksu z DARPinom skoraj nespremenjena v primerjavi s strukturo samega Katepsina B, s čimer smo ovrgli možnost alosterične regulacije. Ta način inhibicije je drugačen od endogenih inhibitorjev Katepsina B iz družine cistatinov, za katere je značilna vezava direktno v aktivno mesto in preko katalitične diade Cys-His. Ključne strukturne komponente cistatinov za vezavo na Katepsine so N-terminalni del ter dva β -zavoja, ki skupaj tvorijo komplementarno strukturo aktivnemu mestu Katepsinov. Večina cistatinov se z visoko afiniteto veže na Katepsinske endopeptidaze, medtem ko je vezava na eksopeptidaze, kot je Katepsin B, otežena zaradi dodatnih strukturnih komponent v okolici aktivnega mesta. V primeru Katepsina B je to zaporna zanka, ki je v strukturi kompleksa med Katepsinom B in stefinom A zamaknjena, kar vodi do signifikantno znižane afinitete (Renko in sod., 2010). DARPina *8h6* in *81* se vežeta na drugo stran aktivnega mesta od zaporne zanke, ki se v strukturi kompleksov ne zamakne kot v primeru stefina A.

Primerjava kristalnih struktur kompleksov DARPinov s prokatepsinom B (Slika 26) je pokazala, da se DARPina vežeta na površino Katepsina B, ki jo deloma zaseda tudi propeptid. Ob vezavi propeptida vzdolž aktivnega mesta bi bila torej vezava DARPinov zelo ovirana, kar je v nasprotju s podatki iz afinitetnega testa (Slika 19) kot tudi gelske filtracije in afinitetne precipitacije (ni prikazano), kjer smo izmerili vezavo DARPinov *8h6* in *81* na Katepsin B. Razlaga za možnost vezave najverjetneje leži v fleksibilnosti vezave propeptida vzdolž aktivnega mesta. Predhodne raziskave so pokazale, da se sintetični propeptid veže na zrel Katepsin B s konstanto disociacije okoli 1 nM, kar je v rangi afinitete DARPina *81* in bistveno nižja afiniteta kot v primeru DARPina *8h6* (Quraishi in sod., 1999). Fleksibilnost propeptida je poleg tega ključna za avtokatalitično aktivacijo Katepsina B, medtem ko lahko interakcije dodatno razrahljajo glikozaminoglikani (Caglic in sod., 2007). V prid visoki fleksibilnosti propeptida kažejo tudi rezultati, pridobljeni z

aktivnostnimi sondami, ki se uspešno vežejo v aktivno mesto prokatepsina B tako v primeru rekombinantnega encima (Pungercar in sod., 2009) kot v celicah (Yan in sod., 2016). V kompleksu prokatepsina B z DARPinom *8h6* oziroma *81* sta DARPina torej najverjetneje vezana na enakih položajih kot v primeru kompleksov z zrelim katepsinom B, medtem ko je propeptid po disociaciji stran od aktivnega mesta še vedno kovalentno povezan z encimom, ker je onemogočena njegova aktivacija zaradi inhibicije katepsinske aktivnosti.

Primerjava obeh struktur kompleksov je podala tudi razlago za razliko v afiniteti DARPinov *8h6* in *81*, na kar sta v največji meri vplivala dva Trp v strukturi DARPina *8h6* (Trp56 in Trp122), ki ju v DARPinu *81* nadomeščata Asn56 in Ser122. Oba triptofana namreč tvorita dodatne interakcije s katepsinom B, ki niso prisotne pri DARPinu *81*. Posledica je rahel zasuk (~ 3 Å) pri vezavi DARPina *8h6* stran od aktivnega mesta v primerjavi z vezavo DARPina *81*, poleg tega pa tudi signifikantno večja interakcijska površina v primeru kompleksa z DARPinom *8h6*, ki vodi do višje afinitete. Zaradi močnejše interakcije smo izbrali DARPin *8h6* za nadaljnje poskuse detekcije katepsina B v celičnih kulturah in mišjih modelih, DARPin *81* pa smo uporabili kot kompetitivni vezavni protein za preverjanje selektivnosti vezave DARPina *8h6* ter za ovrednotenje vpliva afinitete na poskuse.

Katepsin B je lahko na površini tumorskih celic prisoten kot proencim, ki je povezan z membranskim proteinom aneksin II (Mai in sod., 2000), ali pa je prisoten v posebnih membranskih predelih, imenovanih kaveole (Cavallo-Medved in sod., 2005), čeprav mehanizem translokacije iz endolizosomalnega sistema do membrane ni v celoti poznan. Nedavni rezultati v M2-stimuliranih makrofagih kažejo, da ima na izločanje katepsinov iz celic vpliv kombinacija prekomernega izražanja preprokatepsinov in zasičenja receptorjev za manozo-6-fosfat, ki vodijo prokatepsine v endolizosomalni sistem (Yan in sod., 2016). Zaradi deregulacije izražanja in lokalizacije pride do izločanja prokatepsinov iz M2-stimuliranih makrofagov, medtem ko so katepsini v primeru M1-stimuliranih makrofagov izločani v zreli obliki, najverjetneje zaradi eksocitoze lizosomov (Beers in sod., 2003). V naših celičnih modelih smo z imunološko detekcijo potrdili, da je katepsin B prisoten na celični membrani in v zunajceličnem okolju tako pri tumorskih celicah PyMT in 4T1 kot tudi pri makrofagih (Slika 29). Prav tako smo potrdili pericelularno aktivnost katepsina B (Slika 29), ki je skladna z vlogo katepsina B pri razgradnji zunajceličnine v tumorskem mikrookolju. Membransko vezani katepsin B smo uspeli detektirati tudi z uporabo biotiniliranega DARPina *8h6* in tudi s to metodo potrdili višje količine katepsina B na makrofagih kot na tumorskih celicah (Slika 30).

Selektivnost vezave DARPina *8h6* v kompleksnem celičnem okolju smo preverili s kompetitivnim testom, kjer so presežne koncentracije neoznačenih DARPinov *8h6* ali *81* preprečile vezavo biotiniliranega DARPina *8h6* zaradi zasičenja vezavnih mest na katepsinu B. Komplementarni pristop za potrjevanje selektivnosti je bil merjenje pericelularne aktivnosti katepsina B v prisotnosti DARPina *8h6*, ki je to aktivnost inhibiral. Katepsin B smo z biotiniliranim DARPinom *8h6* uspešno detektirali tudi v tkivnih rezinah tumorjev PyMT (Slika 31) ter s fluorescentno označenim DARPinom *8h6* na celični membrani makrofagov, kar kaže na široko uporabnost te nove afinitetne sonde, primerljivo z aktivnostnimi sondami. Tudi slednje so bile uporabljene tako za zasledovanje membransko vezanih katepsinov (Balaji in sod., 2002) kot tudi v histokemijskih metodah (Withana in sod., 2016a) in imajo v primerjavi z biotinilirano ali fluorescentno afinitetno sondo na osnovi DARPina prednost v kovalentni ireverzibilni vezavi na tarčni encim, ki omogoča številne postopke proteomske identifikacije in kvantifikacije tarčnih encimov. V primeru afinitetnih sond je v takšnih primerih možna uporaba kemijskih sredstev za zamreženje (angl. cross-linking). Imajo pa biološki afinitetni reagenti, kot je DARPin, pomembno prednost pred kemijskimi sondami, saj jih lahko izražamo v sesalskih celicah kot rekombinantne proteine z reporterji (angl. intrabodies), ki omogočijo preučevanje

lokalizacije ali merjenje količine tarčnih proteinov v bolj nativnih pogojih brez uporabe kemijskih sredstev (Kummer in sod., 2013).

Fluorescentni DARPin *8h6* se je vezal s katepsinom B v tumorskem mikrookolju tudi po intravenozni administraciji v mišjih modelih tumorja mlečne žleze PyMT in 4T1, kar je vodilo do povišanih fluorescentnih signalov v tumorjih v primerjavi z okoliškim tkivom (Slika 33, Slika 39). V modelu PyMT je zadrževanje fluorescentnega DARPina *8h6* v tumorju vodilo do približno dvakrat višjega signala v primerjavi s signalom v zdravi kontralateralni mlečni žlezi. Učinkovit kontrast smo dosegli že 30 min po intravenozni administraciji, po 3 h pa je kontrast dosegel maksimum. Podoben trend je kazal tudi fluorescentni DARPin *8I*, ki je sicer izkazal signifikantno nižje signale v tumorju, je pa še vedno dosegal visoke kontraste, ki so se odražali v razmerju med signalom na območju tumorja in signalom na območju kontralateralne mlečne žleze. Neselektivni DARPin *E3_5* se ni v večji meri zadrževal niti v tumorju niti na območju kontralateralne mlečne žleze. Ob prvih časovni točkah (3 h in 6 h) smo sicer izmerili nekoliko povišane vrednosti v tumorju, ki jih najverjetneje lahko pripišemo neselektivnemu zadrževanju zaradi povišane prehodnosti ožilja v tumorjih kot v zdravem tkivu. Ob analizi notranjih organov smo ugotovili, da se DARPin *8h6* v nekoliko večji meri zadržuje v jetrih in vranici v primerjavi z neselektivnim DARPinom *E3_5*, kar je skladno s podatki iz literature o visokih količinah katepsina B v teh tkivih (Shuja in sod., 1991) ter z meritvami, opravljenimi z aktivnostnimi sondami, ki prav tako reagirajo s katepsinom B v teh tkivih (Blum in sod., 2007). DARPin *8h6* smo aplicirali tudi v modelu 4T1, kjer smo po 3 h izmerili primerljivo visoke tumorske signale kot v primeru modela PyMT, medtem ko so bila razmerja med signalom na območju tumorja in območju kontralateralne mlečne žleze še višja (povprečno razmerje je bilo okoli 2,5). Meritve so potrdile našo hipotezo, da lahko s selektivno afinitetno sondo na osnovi DARPina *8h6* v zelo hitrih časih izvedemo diagnostično slikanje tumorjev, kar ni mogoče z liposomalnim sistemom ali polimernimi sondami. Zaradi možnosti konjugacije DARPina s PET/SPECT reporterji je potencialno možen tudi prenos afinitetne sonde v klinično diagnostiko, kar je težko dosegljivo s fluorescentnimi substratnimi sondami zaradi manjše penetracije fluorescentnega signala skozi tkiva. Podobne karakteristike kot naša afinitetna sonda imajo aktivnostne sonde, ki imajo podoben farmakokinetični profil in hitrost detekcije, omogočajo pa tudi označevanje, kompatibilno s PET/SPECT načinom detekcije (Withana in sod., 2016b). Trenutno ni poznana nobena selektivna fluorescentna ali PET/SPECT aktivnostna sonda za katepsin B, ki bi bila testirana *in vivo*, kljub temu da je poznana zelo selektivna biotinilirana aktivnostna sonda (Balaji in sod., 2002). Iz rezultatov s širokospecifičnimi katepsinskimi sondami sklepamo, da bi lahko imela selektivna aktivnostna sonda za katepsin B visok diagnostični potencial, saj so številne širokospecifične sonde v *in vivo* poskusih reagirale tudi s katepsinom B v tumorjih, ki je tako pomembno prispeval k tumorskim signalom teh sond (Blum in sod., 2007; Verdoes in sod., 2013).

V naši raziskavi smo prav tako potrdili, da ima v primeru majhnih vezavnih proteinov, kot so DARPini, zelo pomembno vlogo visoka afiniteta do vezavnih partnerjev. DARPin *8h6* z afiniteto v nizkem pikomolarnem območju ($K_i \sim 35$ pM) je pokazal signifikantno zvišano zadrževanje v tumorjih v primerjavi z DARPinom *8I*, ki se veže s katepsinom B šibkeje ($K_i = 4,1$ nM). To je skladno z rezultati iz literature, kjer so Zahnd in sod. preučili vpliv afinitete selektivnega DARPina za tumorski označevalec HER2 na uspešnost detekcije s PET slikanjem (Zahnd in sod., 2010). Tudi v njihovi raziskavi so bili signali signifikantno višji v primeru DARPina z afiniteto v pikomolarnem območju, medtem ko so DARPini z nižjo afiniteto slabše zaznali tumorje. To po drugi strani ni značilno za DARPine, ki so modificirani s polimeri za podaljšanje zadrževanja v krvnem obtoku, kot tudi ne za večje formate vezavnih proteinov, kot so npr. protitelesa. V obeh teh primerih je afiniteta v nanomolarnem območju praviloma dovolj, da je detekcija uspešna. Zhand in sod. so zato predlagali, da je v primeru majhnih proteinov za uspešno tarčenje potrebna izjemno visoka afiniteta ali pa konjugacija s polimeri, kar naše raziskave potrjujejo.

Fluorescentni DARPIn *8h6* smo uporabili tudi za detekcijo akutnega vnetja tačke z zymosanom, kjer smo izmerili signifikantno povišane signale v primerjavi z neselektivnim DARPinom *E3_5* (Slika 41). Tudi v primeru neselektivnega DARPina *E3_5* smo sicer izmerili povišane signale na območju vnete tačke v primerjavi s kontralateralno. Vzrok za to je najverjetneje v povišanem pretoku krvi na območju vnetja, ki vodi do nespecifičnega zadrževanja DARPina *E3_5* na območju vnetja. V nasprotju s pričakovanji so meritve pokazale tudi povišane signale fluorescentnega DARPina *8h6* v kontralateralni tački v primerjavi z neselektivnim DARPinom *E3_5*. Čeprav nismo podrobno raziskali vzroka za to, je možna razlaga v zelo rahlem vnetju, ki ga izzove že kontrolno injiciranje fiziološke raztopine v kontralateralno tačko. Tudi v primeru rahlega vnetja bi lahko prišlo do povišanja koncentracije katepsina B in posledičnega povišanja signala v kontralateralni tački. Zaradi vseh teh razlogov nismo izmerili signifikantnih razlik med DARPinom *8h6* in DARPinom *E3_5* v razmerju med vneto in kontralateralno tačko. Vseeno pa so razmerja med vneto in kontralateralno tačko pri DARPinu *8h6* (maksimalno razmerje med 1 in 3 h po administraciji fluorescentnega DARPina) primerljiva oziroma višja od tistih iz literature, kjer so bile uporabljene substratna sonda za katepsin S ali širokospecifična substratna sonda za katepsine (Caglič in sod., 2011) kot tudi substratni sonde za metaloproteazo matriksa 12 in 13 (Lim in sod., 2014).

Drugi del doktorske naloge smo posvetili pripravi selektivnih sond za detekcijo katepsina S, ki je podobno kot katepsin B povezan s številnimi vnetnimi obolenji. Katepsin S v zdravih tkivih v večji meri izražajo le antigen-predstavitvene celice, medtem ko se izražanje inducira tudi v nekaterih oblikah tumorskih celic. V številnih vnetnih boleznih, vključno z rakom in aterosklerozo, se močno poviša izražanje katepsina S v makrofagih, ki ta encim tudi izločajo v zunajcelično okolje (Verdoes in sod., 2013; Yan in sod., 2016). Zaradi tega je prišla v zadnjih letih v ospredje predvsem vloga katepsina S v pericelularnem okolju in v zunajceličnini, poleg številnih predhodnih raziskav, ki so pokazale ključno vlogo katepsina S pri antigenski predstavitvi v endolizosomalnem sistemu. V zunajceličnini je katepsin S udeležen pri razgradnji zunajceličnega matriksa v raku, revmatoidnem artritisu in aterosklerozi (Fonović in Turk, 2014; Sukhova in sod., 2003). Poleg tega pa ima tudi pomembne vloge v celični signalizaciji, predvsem zaradi procesiranja nekaterih membranskih proteinov in celičnih adhezijskih molekul (Sevenich in sod., 2014; Sobotić in sod., 2015).

Pri našem delu smo razvili novo selektivno pametno substratno sondo (sonda 2) za katepsin S, ki je načrtana z namenom, da jo lahko z enostavno kemijsko reakcijo konjugiramo na makromolekularne reagente in po tem ohrani selektivnost za katepsin S (Slika 5). To smo dosegli z maleimidnim vmesnikom, ki lahko reagira s sulfhidrilnimi skupinami na tarčnih molekulah, kot so proteini. Poleg tega smo razvili dva konjugata osnovne sonde, ki sta vsebovala polimerno ali lipidno skupino. Konjugacija substratnih sond z biokompatibilnimi polimeri ali lipidi je bila predhodno že raziskana v literaturi. Polimeri imajo ključno vlogo pri pasivnem tarčenju pri raku, kjer razrahljano ožilje vodi do efekta povišane permeabilnosti in zadrževanja, kar je posebej učinkovito za polimere (Shi in sod., 2017). Polimerne sonde imajo zato možnost proizvodnje višjih signalov kot nekonjugirane sonde, ki se v manjši meri zadržijo v tumorjih. Lipidirane sonde so bile razvite z namenom asociacije s celično membrano, kar je bilo uspešno v primeru substratne sonde za metaloproteazo matriksa 12 (Cobos-Correa in sod., 2009). Sklepali smo, da bi lahko bila lipidacija posebej učinkovita tudi pri sondah za katepsin S, saj so Kwok in sod. pri tumorskih celicah pokazali, da se velike količine katepsina S iz znotrajceličnih veziklov translocirajo na celično membrano (Kwok in sod., 2011).

Pri *in vitro* testih selektivnosti substratnih sond 2, 2-PGA in 3 smo ugotovili, da vse tri sonde ohranijo popolno selektivnost za katepsin S (Slika 43). Ugotovili smo, da osnovna sonda 2 kot tudi konjugat s PGA ne vstopata v celice pasivno, saj je bila za nastanek signala potrebna endocitoza, medtem ko se je lipidirana sonda 3 delno tudi pasivno asociirala s

celično membrano. Pri podrobnejši karakterizaciji lipidirane sonde 3 smo sicer ugotovili, da se ob vsidranju v liposomalno ali celično membrano učinkovitost FRET senčenja delno zmanjša, kar je razvidno v povišanih fluorescentnih signalih že ob odsotnosti ali inhibiciji katepsina S. Vzrok temu je najverjetneje sterična sprememba v strukturi sonde ob vsidranju v lipidno membrano, ki vodi do spremembe v medsebojni legi fluoroforja in FRET akceptorja. Kljub temu pa je takšna sonda še vedno odlično orodje za spremljanje lokalizacije katepsina S *in vivo*, saj več kot 80 % signala proizvede encimska cepitev, manj kot 20 % pa nespecifično zmanjšanje senčenja (Slika 44). To smo v sodelovanju s sodelavci iz Švice in Nemčije nenazadnje potrdili tudi z uporabo mišjega modela raka mlečne žleze, kjer je lipidirana sonda 3 v primerjavi z osnovno sondo 2 izkazala odlične fluorescentne signale in tako potrdila uporabnost konjugacije z lipidi tudi za *in vivo* detekcijo raka (Hu in sod., 2014b). Pri tem smo ugotovili, da je lipidacija vodila tudi do zelo učinkovitega zadrževanja aktivirane sonde v tkivu, kjer je prišlo do cepitve, kar je pogosto problem substratnih sond v primerjavi z aktivnostnimi sondami. Slednje zaradi kovalentne asociacije s tarčnimi encimi ostanejo na mestu cepitve, kar je bilo pokazano tudi v primeru selektivnih aktivnostnih sond za katepsin S v mišjih modelih raka in vnetne črevesne bolezni (Cattaruzza in sod., 2011; Verdoes in sod., 2012). Rezultati naše raziskave zato kažejo, da je lipidacija lahko pomemben splošen pristop za izboljšanje *in vivo* slikanja s substratnimi sondami.

Poglavje 6

Zaključki

V sklopu doktorskega dela smo razvili nove sonde za spremljanje lokalizacije katepsinov B in S. Sonda za katepsin B temelji na visokoafinitetnem vezavnem proteinu DARPinu *8h6*, ki je označen s fluorescentnim barvilom ali biotinom, medtem ko so sonde za katepsin S osnovane na pretvorbi inhibitorja katepsina S iz literature v selektivni fluorescentni substrat. Razvite sonde so izjemno selektivne za izbrana katepsina in so kompatibilne za uporabo pri celičnih poskusih kot tudi pri slikanju celotnega telesa malih živali, kar ima pomembno vrednost za nadaljnje predklinične raziskave o vlogi teh dveh encimov v različnih boleznih.

Poleg tega je v prihodnosti možen tudi nadaljnji razvoj sond za uporabo v humani diagnostiki vnetnih bolezni, kot so rak ali vnetne bolezni sklepov, saj sta v teh boleznih izražanje in aktivnost katepsinov B in S na območju bolezni visoko povišana v primerjavi z zdravimi tkivi. V primeru afinitetne sonde na osnovi DARPina *8h6* smo to že potrdili v dveh predkliničnih mišjih modelih raka dojke in v modelu akutnega vnetja tačke, kjer smo s sondo lahko zaznali signifikantno povišane signale na območju tumorja. Posebna prednost afinitetne sonde na osnovi DARPina *8h6* je v možnosti označevanja sonde s PET/SPECT označevalci, kar bi lahko vodilo do uporabe v humanem diagnostičnem slikanju celotnega telesa.

V primeru substratnih sond za katepsin S je bil najpomembnejši zaključek našega dela ohranjenost selektivnosti sond *in vitro* po modifikaciji z lipidno ali polimerno skupino. To je kasneje vodilo do uporabe lipidirane sonde v predkliničnem diagnostičnem slikanju mišjega raka dojke, kjer je sonda izkazala izjemno dobro detekcijo tumorjev. Čeprav fluorescentne substratne sonde niso direktno kompatibilne s humanim diagnostičnim slikanjem celotnega telesa zaradi nizke penetracije svetlobe skozi tkiva, je visok potencial za njihovo uporabo v intraoperativni ter endoskopski diagnostiki.

Literatura

Akkari, L., Gocheva, V., Quick, M.L., Kester, J.C., Spencer, A.K., Garfall, A.L., Bowman, R.L., in Joyce, J.A. (2016). Combined deletion of cathepsin protease family members reveals compensatory mechanisms in cancer. *Genes Dev* *30*, 220-232.

Alamir, I., Boukhattala, N., Aziz, M., Breuillé, D., Déchelotte, P., in Coëffier, M. (2010). Beneficial effects of cathepsin inhibition to prevent chemotherapy-induced intestinal mucositis. *Clin Exp Immunol* *162*, 298-305.

Alishekevitz, D., Gingis-Velitski, S., Kaidar-Person, O., Gutter-Kapon, L., Scherer, S.D., Raviv, Z., Merquioli, E., Ben-Nun, Y., Miller, V., in Rachman-Tzemah, C. (2016). Macrophage-Induced Lymphangiogenesis and Metastasis following Paclitaxel Chemotherapy Is Regulated by VEGFR3. *Cell Reports* *17*, 1344-1356.

Ashley, N.T., Weil, Z.M., in Nelson, R.J. (2012). Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annu Rev Ecol Evol Syst* *43*, 385-406.

Baici, A. (1981). The specific velocity plot. A graphical method for determining inhibition parameters for both linear and hyperbolic enzyme inhibitors. *Eur J Biochem* *119*, 9-14.

Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., in Henkart, P.A. (2002). Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* *196*, 493-503.

Beers, C., Honey, K., Fink, S., Forbush, K., in Rudensky, A. (2003). Differential regulation of cathepsin S and cathepsin L in interferon gamma-treated macrophages. *J Exp Med* *197*, 169-179.

Ben-Aderet, L., Merquioli, E., Fahham, D., Kumar, A., Reich, E., Ben-Nun, Y., Kandel, L., Haze, A., Liebergall, M., Kosinska, M.K., *in sod.* (2015). Detecting cathepsin activity in human osteoarthritis via activity-based probes. *Arthritis Res Ther* *17*, 69.

Beroukhim, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., *in sod.* (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* *463*, 899-905.

Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M.G., in Pluckthun, A. (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol* *22*, 575-582.

Binz, H.K., Stumpp, M.T., Forrer, P., Amstutz, P., in Pluckthun, A. (2003). Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J Mol Biol* *332*, 489-503.

Blum, G., Von Degenfeld, G., Merchant, M.J., Blau, H.M., in Bogoy, M. (2007). Noninvasive optical imaging of cysteine protease activity using fluorescently quenched activity-based probes. *Nat Chem Biol* *3*, 668-677.

Boersma, Y.L., in Pluckthun, A. (2011). DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Curr Opin Biotechnol* *22*, 849-857.

- Bravman, T., Bronner, V., Lavie, K., Notcovich, A., Papalia, G.A., in Myszka, D.G. (2006). Exploring "one-shot" kinetics and small molecule analysis using the ProteOn XPR36 array biosensor. *Anal Biochem* **358**, 281-288.
- Bromme, D., Nallaseth, F.S., in Turk, B. (2004). Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods* **32**, 199-206.
- Bromme, D., Panwar, P., in Turan, S. (2016). Cathepsin K osteoporosis trials, pycnodysostosis and mouse deficiency models: Commonalities and differences. *Expert Opin Drug Discov* **11**, 457-472.
- Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Vegran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., *in sod.* (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med* **19**, 57-64.
- Burr, D.B., in Gallant, M.A. (2012). Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 665-673.
- Caglic, D., Kosec, G., Bojic, L., Reinheckel, T., Turk, V., in Turk, B. (2009). Murine and human cathepsin B exhibit similar properties: possible implications for drug discovery. *Biol Chem* **390**, 175-179.
- Caglic, D., Pungercar, J.R., Pejler, G., Turk, V., in Turk, B. (2007). Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *J Biol Chem* **282**, 33076-33085.
- Caglic, D., Repnik, U., Jedeszko, C., Kosec, G., Miniejew, C., Kindermann, M., Vasiljeva, O., Turk, V., Wendt, K.U., Sloane, B.F., *in sod.* (2013). The proinflammatory cytokines interleukin-1alpha and tumor necrosis factor alpha promote the expression and secretion of proteolytically active cathepsin S from human chondrocytes. *Biol Chem* **394**, 307-316.
- Caglič, D., Globisch, A., Kindermann, M., Lim, N.-H., Jeske, V., Juretschke, H.-P., Bartnik, E., Weithmann, K.U., Nagase, H., Turk, B., *in sod.* (2011). Functional in vivo imaging of cysteine cathepsin activity in murine model of inflammation. *Bioorg Med Chem* **19**, 1055-1061.
- Cantini, F., Niccoli, L., Nannini, C., Kaloudi, O., Bertoni, M., in Cassara, E. (2010). Psoriatic arthritis: a systematic review. *Int J Rheum Dis* **13**, 300-317.
- Cattaruzza, F., Lyo, V., Jones, E., Pham, D., Hawkins, J., Kirkwood, K., Valdez-Morales, E., Ibeakanma, C., Vanner, S.J., Bogyo, M., *in sod.* (2011). Cathepsin S Is Activated During Colitis and Causes Visceral Hyperalgesia by a PAR2-Dependent Mechanism in Mice. *Gastroenterology* **141**, 1864-1874.
- Cavallo-Medved, D., Dosescu, J., Linebaugh, B.E., Sameni, M., Rudy, D., in Sloane, B.F. (2003). Mutant K-ras regulates cathepsin B localization on the surface of human colorectal carcinoma cells. *Neoplasia (New York, NY)* **5**, 507-519.
- Cavallo-Medved, D., Mai, J., Dosescu, J., Sameni, M., in Sloane, B.F. (2005). Caveolin-1 mediates the expression and localization of cathepsin B, pro-urokinase plasminogen activator and their cell-surface receptors in human colorectal carcinoma cells. *J Cell Sci* **118**, 1493-1503.
- Cavallo-Medved, D., Rudy, D., Blum, G., Bogyo, M., Caglic, D., in Sloane, B.F. (2009). Live-cell imaging demonstrates extracellular matrix degradation in association with active cathepsin B in caveolae of endothelial cells during tube formation. *Exp Cell Res* **315**, 1234-1246.

- Chen, J., Tung, C.H., Mahmood, U., Ntziachristos, V., Gyurko, R., Fishman, M.C., Huang, P.L., in Weissleder, R. (2002). In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation* *105*, 2766-2771.
- Cho, J.H., in Gregersen, P.K. (2011). Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med* *365*, 1612-1623.
- Choi, H.K., Mount, D.B., in Reginato, A.M. (2005). Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med* *143*, 499-516.
- Chu, S.C., Yang, S.F., Tzang, B.S., Hsieh, Y.S., Lue, K.H., in Lu, K.H. (2010). Cathepsin B and cystatin C play an inflammatory role in gouty arthritis of the knee. *Clin Chim Acta* *411*, 1788-1792.
- Clark, A.K., Grist, J., Al-Kashi, A., Perretti, M., in Malcangio, M. (2012). Spinal cathepsin S and fractalkine contribute to chronic pain in the collagen-induced arthritis model. *Arthritis Rheum* *64*, 2038-2047.
- Clark, A.K., Yip, P.K., Grist, J., Gentry, C., Staniland, A.A., Marchand, F., Dehvari, M., Wotherspoon, G., Winter, J., in Ullah, J. (2007). Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 10655-10660.
- Cobos-Correa, A., Trojanek, J.B., Diemer, S., Mall, M.A., in Schultz, C. (2009). Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation. *Nat Chem Biol* *5*, 628-630.
- Crček, M. (2016). Karakterizacija prvih alosteričnih regulatorjev katepsina B: magistrsko delo (M. Crček).
- de Jong, M., Essers, J., in van Weerden, W.M. (2014). Imaging preclinical tumour models: improving translational power. *Nat Rev Cancer* *14*, 481-493.
- Dejica, V.M., Mort, J.S., Laverty, S., Antoniou, J., Zukor, D.J., Tanzer, M., in Poole, A.R. (2012). Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage. *Arthritis Res Ther* *14*, R113.
- Dennemärker, J., Lohmüller, T., Mayerle, J., Tacke, M., Lerch, M.M., Coussens, L.M., Peters, C., Reinheckel, T. (2010) Deficiency for the cysteine protease cathepsin L promotes tumor progression in mouse epidermis. *Oncogene* *29*, 1611-1621.
- Deu, E., Verdoes, M., in Bogoy, M. (2012). New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 9-16.
- Droga-Mazovec, G., Bojič, L., Petelin, A., Ivanova, S., Repnik, U., Salvesen, G.S., Stoka, V., Turk, V., in Turk, B. (2008). Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem* *283*, 19140-19150.
- Edgington, L.E., Verdoes, M., in Bogoy, M. (2011). Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes. *Curr Opin Chem Biol* *15*, 798-805.
- Fonović, M., in Turk, B. (2014). Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta-General Subjects* *1840*, 2560-2570.
- Fortelny, N., Cox, J.H., Kappelhoff, R., Starr, A.E., Lange, P.F., Pavlidis, P., in Overall, C.M. (2014). Network analyses reveal pervasive functional regulation between proteases in the human protease web. *PLoS Biol* *12*, e1001869.
- Fujii, W., Kawahito, Y., Nagahara, H., Kukida, Y., Seno, T., Yamamoto, A., Kohno, M., Oda, R., Taniguchi, D., in Fujiwara, H. (2015). Monocarboxylate transporter 4, associated with the

acidification of synovial fluid, is a novel therapeutic target for inflammatory arthritis. *Arthritis Rheumatol* **67**, 2888-2896.

Garland, M., Yim, J.J., in Bogyo, M. (2016). A bright future for precision medicine: Advances in fluorescent chemical probe design and their clinical application. *Cell Chem Biol* **23**, 122-136.

Geertsma, E.R., in Dutzler, R. (2011). A versatile and efficient high-throughput cloning tool for structural biology. *Biochemistry* **50**, 3272-3278.

Gocheva, V., Wang, H.-W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T., in Joyce, J.A. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev* **24**, 241-255.

Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., in Peters, C. (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev* **20**.

Goldring, M.B., in Otero, M. (2011). Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **23**, 471-478.

Goldstein, R., Sosabowski, J., Livanos, M., Leyton, J., Vigor, K., Bhavsar, G., Nagy-Davidescu, G., Rashid, M., Miranda, E., Yeung, J., in *sod*. (2015). Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **42**, 288-301.

Gopinathan, A., Denicola, G.M., Frese, K.K., Cook, N., Karreth, F.A., Mayerle, J., Lerch, M.M., Reinheckel, T., in Tuveson, D.A. (2012). Cathepsin B promotes the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Gut* **61**, 877-884.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., in Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899.

Grivennikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.Y., Osterreicher, C.H., Hung, K.E., in *sod*. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254-258.

Guo, M., Mathieu, P.A., Linebaugh, B., Sloane, B.F., in Reiners, J.J., Jr. (2002). Phorbol ester activation of a proteolytic cascade capable of activating latent transforming growth factor-betaL a process initiated by the exocytosis of cathepsin B. *J Biol Chem* **277**, 14829-14837.

Habibollahi, P., Figueiredo, J.L., Heidari, P., Dulak, A.M., Imamura, Y., Bass, A.J., Ogino, S., Chan, A.T., in Mahmood, U. (2012). Optical Imaging with a Cathepsin B Activated Probe for the Enhanced Detection of Esophageal Adenocarcinoma by Dual Channel Fluorescent Upper GI Endoscopy. *Theranostics* **2**, 227-234.

Hanahan, D., in Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.

Hashimoto, Y., Kakegawa, H., Narita, Y., Hachiya, Y., Hayakawa, T., Kos, J., Turk, V., in Katunuma, N. (2001). Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 334-339.

Hensley, H.H., Roder, N.A., O'Brien, S.W., Bickel, L.E., Xiao, F., Litwin, S., in Connolly, D.C. (2012). Combined in vivo molecular and anatomic imaging for detection of ovarian carcinoma-associated protease activity and integrin expression in mice. *Neoplasia (New York, NY)* **14**, 451-462.

Hilderbrand, S.A., in Weissleder, R. (2010). Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol* **14**, 71-79.

- Hou, W.S., Li, W., Keyszer, G., Weber, E., Levy, R., Klein, M.J., Gravallesse, E.M., Goldring, S.R., in Bromme, D. (2002). Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* *46*, 663-674.
- Hou, W.S., Li, Z., Gordon, R.E., Chan, K., Klein, M.J., Levy, R., Keysser, M., Keyszer, G., in Bromme, D. (2001). Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *Am J Pathol* *159*, 2167-2177.
- Hu, H.Y., Gehrig, S., Reither, G., Subramanian, D., Mall, M.A., Plettenburg, O., in Schultz, C. (2014a). FRET-based and other fluorescent proteinase probes. *Biotechnol J* *9*, 266-281.
- Hu, H.Y., Vats, D., Vizovisek, M., Kramer, L., Germanier, C., Wendt, K.U., Rudin, M., Turk, B., Plettenburg, O., in Schultz, C. (2014b). In vivo imaging of mouse tumors by a lipidated cathepsin S substrate. *Angew Chem Int Ed Engl* *53*, 7669-7673.
- Hulkower, K.I., Butler, C.C., Linebaugh, B.E., Klaus, J.L., Keppler, D., Giranda, V.L., in Sloane, B.F. (2000). Fluorescent microplate assay for cancer cell-associated cathepsin B. *Eur J Biochem* *267*, 4165-4170.
- Ikeda, Y., Ikata, T., Mishiro, T., Nakano, S., Ikebe, M., in Yasuoka, S. (2000). Cathepsins B and L in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and the effect of cathepsin B on the activation of pro-urokinase. *J Med Invest* *47*, 61-75.
- Illy, C., Quraishi, O., Wang, J., Purisima, E., Vernet, T., in Mort, J.S. (1997). Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem* *272*, 1197-1202.
- Jaffer, F.A., Calfon, M.A., Rosenthal, A., Mallas, G., Razansky, R.N., Mauskapf, A., Weissleder, R., Libby, P., in Ntziachristos, V. (2011). Two-dimensional intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of inflammation in atherosclerosis and stent-induced vascular injury. *J Am Coll Cardiol* *57*, 2516-2526.
- Jost, C., Schilling, J., Tamaskovic, R., Schwill, M., Honegger, A., in Pluckthun, A. (2013). Structural basis for eliciting a cytotoxic effect in HER2-overexpressing cancer cells via binding to the extracellular domain of HER2. *Structure* *21*, 1979-1991.
- Joyce, J.A., Baruch, A., Chehade, K., Meyer-Morse, N., Giraudo, E., Tsai, F.Y., Greenbaum, D.C., Hager, J.H., Bogoy, M., in Hanahan, D. (2004). Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* *5*, 443-453.
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.P., in Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* *7*, 33-42.
- Klippel, J.H., Stone, J.H., in White, P.H. (2008). *Primer on the rheumatic diseases* (Springer Science & Business Media).
- Kohl, A., Binz, H.K., Forrer, P., Stumpp, M.T., Plückthun, A., in Grütter, M.G. (2003). Designed to be stable: crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 1700-1705.
- Kos, J., in Lah, T.T. (1998). Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep* *5*, 1349-1361.
- Kos, J., Smid, A., Krasovec, M., Svetic, B., Lenarcic, B., Vrhovec, I., Skrk, J., in Turk, V. (1995). Lysosomal proteases cathepsins D, B, H, L and their inhibitors stefins A and B in head and neck cancer. *Biol Chem Hoppe Seyler* *376*, 401-405.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., in Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* *31*, 51-72.

- Kummer, L., Hsu, C.W., Dagliyan, O., MacNevin, C., Kaufholz, M., Zimmermann, B., Dokholyan, N.V., Hahn, K.M., in Pluckthun, A. (2013). Knowledge-based design of a biosensor to quantify localized ERK activation in living cells. *Chem Biol* *20*, 847-856.
- Kwok, H.F., Buick, R.J., Kuehn, D., Gormley, J.A., Doherty, D., Jaquin, T.J., McClurg, A., Ward, C., Byrne, T., Jaworski, J., *in sod*. (2011). Antibody targeting of Cathepsin S induces antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Cancer* *10*, 147.
- Lah, T.T., Cercek, M., Blejec, A., Kos, J., Gorodetsky, E., Somers, R., in Daskal, I. (2000). Cathepsin B, a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: comparison with cathepsin D, cathepsin L, and other clinical indicators. *Clin Cancer Res* *6*, 578-584.
- Lai, W.F., Chang, C.H., Tang, Y., Bronson, R., in Tung, C.H. (2004). Early diagnosis of osteoarthritis using cathepsin B sensitive near-infrared fluorescent probes. *Osteoarthritis Cartilage* *12*, 239-244.
- Lee-Dutra, A., Wiener, D.K., in Sun, S. (2011). Cathepsin S inhibitors: 2004-2010. *Expert Opin Ther Pat* *21*, 311-337.
- Lesley, S.A. (1995). Preparation and use of E. coli S-30 extracts. *Methods Mol Biol* *37*, 265-278.
- Li, N.G., Shi, Z.H., Tang, Y.P., Wang, Z.J., Song, S.L., Qian, L.H., Qian, D.W., in Duan, J.A. (2011). New hope for the treatment of osteoarthritis through selective inhibition of MMP-13. *Curr Med Chem* *18*, 977-1001.
- Lim, N.H., Meinjohanns, E., Bou-Gharios, G., Gompels, L.L., Nuti, E., Rossello, A., Devel, L., Dive, V., Meldal, M., in Nagase, H. (2014). In vivo imaging of matrix metalloproteinase 12 and matrix metalloproteinase 13 activities in the mouse model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol* *66*, 589-598.
- Liu, R., Liote, F., Rose, D.M., Merz, D., in Terkeltaub, R. (2004). Proline-rich tyrosine kinase 2 and Src kinase signaling transduce monosodium urate crystal-induced nitric oxide production and matrix metalloproteinase 3 expression in chondrocytes. *Arthritis Rheum* *50*, 247-258.
- López-Otín, C., in Bond, J.S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* *283*, 30433-30437.
- Louie, A. (2010). Multimodality imaging probes: design and challenges. *Chem Rev* *110*, 3146-3195.
- Mai, J., Finley, R.L., Jr., Waisman, D.M., in Sloane, B.F. (2000). Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *J Biol Chem* *275*, 12806-12812.
- Malla, R.R., Gopinath, S., Gondi, C.S., Alapati, K., Dinh, D.H., Gujrati, M., in Rao, J.S. (2011). Cathepsin B and uPAR knockdown inhibits tumor-induced angiogenesis by modulating VEGF expression in glioma. *Cancer Gene Ther* *18*, 419-434.
- Mandelin, J., Li, T.F., Hukkanen, M., Liljestrom, M., Salo, J., Santavirta, S., in Konttinen, Y.T. (2005). Interface tissue fibroblasts from loose total hip replacement prosthesis produce receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and cathepsin K. *J Rheumatol* *32*, 713-720.
- Martin-Killias, P., Stefan, N., Rothschild, S., Pluckthun, A., in Zangemeister-Wittke, U. (2011). A novel fusion toxin derived from an EpCAM-specific designed ankyrin repeat protein has potent antitumor activity. *Clin Cancer Res* *17*, 100-110.

- Mason, S.D., in Joyce, J.A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol* *21*, 228-237.
- McGrath, M.E., Palmer, J.T., Bromme, D., in Somoza, J.R. (1998). Crystal structure of human cathepsin S. *Protein Sci* *7*, 1294-1302.
- McInnes, I.B., in Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* *365*, 2205-2219.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* *454*, 428-435.
- Merz, T., Wetzel, S.K., Firbank, S., Pluckthun, A., Grutter, M.G., in Mittl, P.R. (2008). Stabilizing ionic interactions in a full-consensus ankyrin repeat protein. *J Mol Biol* *376*, 232-240.
- Mihelic, M., Dobersek, A., Guncar, G., in Turk, D. (2008). Inhibitory fragment from the p41 form of invariant chain can regulate activity of cysteine cathepsins in antigen presentation. *J Biol Chem* *283*, 14453-14460.
- Mikhaylov, G., Klimpel, D., Schaschke, N., Mikac, U., Vizovisek, M., Fonovic, M., Turk, V., Turk, B., in Vasiljeva, O. (2014). Selective targeting of tumor and stromal cells by a nanocarrier system displaying lipidated cathepsin B inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl* *53*, 10077-10081.
- Mikhaylov, G., Mikac, U., Magaeva, A.A., Itin, V.I., Naiden, E.P., Psakhie, I., Babes, L., Reinheckel, T., Peters, C., Zeiser, R., *in sod.* (2011). Ferri-liposomes as an MRI-visible drug-delivery system for targeting tumours and their microenvironment. *Nat Nanotechnol* *6*, 594-602.
- Mirković, B., Markelc, B., Butinar, M., Mitrović, A., Sosic, I., Gobec, S., Vasiljeva, O., Turk, B., Cemazar, M., Serša, G., *in sod.* (2015). Nitroxoline impairs tumor progression in vitro and in vivo by regulating cathepsin B activity. *Oncotarget* *6*, 19027-19042.
- Moelants, E.A., Mortier, A., Van Damme, J., in Proost, P. (2013). Regulation of TNF-alpha with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol* *91*, 393-401.
- Montaser, M., Lalmanach, G., in Mach, L. (2002). CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells. *Biol Chem* *383*, 1305-1308.
- Nakagawa, T.Y., Brissette, W.H., Lira, P.D., Griffiths, R.J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J.D., Eastman, S.E., Howard, E.D., Clarke, S.R.M., *in sod.* (1999). Impaired Invariant Chain Degradation and Antigen Presentation and Diminished Collagen-Induced Arthritis in Cathepsin S Null Mice. *Immunity* *10*, 207-217.
- Neogi, T. (2011). Clinical practice. Gout. *N Engl J Med* *364*, 443-452.
- Nouh, M.A., Mohamed, M.M., El-Shinawi, M., Shaalan, M.A., Cavallo-Medved, D., Khaled, H.M., in Sloane, B.F. (2011). Cathepsin B: a potential prognostic marker for inflammatory breast cancer. *J Transl Med* *9*, 1.
- Noy, R., in Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* *41*, 49-61.
- Olson, O.C., in Joyce, J.A. (2015). Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. *Nat Rev Cancer* *15*, 712-729.
- Oude Blenke, E., Klaasse, G., Merten, H., Pluckthun, A., Mastrobattista, E., in Martin, N.I. (2015). Liposome functionalization with copper-free "click chemistry". *J Control Release* *202*, 14-20.

- Pluckthun, A. (2015). Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **55**, 489-511.
- Podobnik, M., Kuhelj, R., Turk, V., in Turk, D. (1997). Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen1. *J Mol Biol* **271**, 774-788.
- Pozgan, U., Caglic, D., Rozman, B., Nagase, H., Turk, V., in Turk, B. (2010). Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Chem* **391**, 571-579.
- Pungercar, J.R., Caglic, D., Sajid, M., Dolinar, M., Vasiljeva, O., Pozgan, U., Turk, D., Bogyo, M., Turk, V., in Turk, B. (2009). Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity. *FEBS J* **276**, 660-668.
- Puzer, L., Cotrin, S.S., Cezari, M.H., Hirata, I.Y., Juliano, M.A., Stefe, I., Turk, D., Turk, B., Juliano, L., in Carmona, A.K. (2005). Recombinant human cathepsin X is a carboxymonopeptidase only: a comparison with cathepsins B and L. *Biol Chem* **386**, 1191-1195.
- Quail, D.F., in Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* **19**, 1423-1437.
- Quraishi, O., Nägler, D.K., Fox, T., Sivaraman, J., Cygler, M., Mort, J.S., in Storer, A.C. (1999). The Occluding Loop in Cathepsin B Defines the pH Dependence of Inhibition by Its Propeptide. *Biochemistry* **38**, 5017-5023.
- Reinheckel, T., Peters, C., Krüger, A., Turk, B., in Vasiljeva, O. (2012). Differential Impact of Cysteine Cathepsins on Genetic Mouse Models of De novo Carcinogenesis: Cathepsin B as Emerging Therapeutic Target. *Front Pharmacol* **3**, 133.
- Renko, M., Pozgan, U., Majera, D., in Turk, D. (2010). Stefin A displaces the occluding loop of cathepsin B only by as much as required to bind to the active site cleft. *FEBS J* **277**, 4338-4345.
- Ritchlin, C.T., Haas-Smith, S.A., Li, P., Hicks, D.G., in Schwarz, E.M. (2003). Mechanisms of TNF-alpha- in RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* **111**, 821-831.
- Rothberg, J.M., Bailey, K.M., Wojtkowiak, J.W., Ben-Nun, Y., Bogyo, M., Weber, E., Moin, K., Blum, G., Mattingly, R.R., Gillies, R.J., in *sod*. (2013). Acid-Mediated Tumor Proteolysis: Contribution of Cysteine Cathepsins. *Neoplasia* (New York, NY) **15**, 1125-1137.
- Ruettger, A., in Wiederanders, B. (2007). Microplate assay for cathepsin detection in viable cells using derivatives of 4-methoxy-beta-naphthylamide. *Current protocols in protein science Chapter 21*, Unit 21.21.
- Ruffell, B., Affara, N.I., Cottone, L., Junankar, S., Johansson, M., DeNardo, D.G., Korets, L., Reinheckel, T., Sloane, B.F., Bogyo, M., Coussens, L.M. (2013) Cathepsin C is a tissue-specific regulator of squamous carcinogenesis. *Genes Dev* **27**, 2086-2098.
- Ruffell, B., in Coussens, L.M. (2015). Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* **27**, 462-472.
- Ryu, J.H., Kim, S.A., Koo, H., Yhee, J.Y., Lee, A., Na, J.H., Youn, I., Choi, K., Kwon, I.C., Kim, B.-S., in *sod*. (2011). Cathepsin B-sensitive nanoprobe for in vivo tumor diagnosis. *J Mater Chem* **21**, 17631-17634.
- Ryu, J.H., Na, J.H., Ko, H.K., You, D.G., Park, S., Jun, E., Yeom, H.J., Seo, D.H., Park, J.H., Jeong, S.Y., in *sod*. (2014). Non-invasive optical imaging of cathepsin B with activatable fluorogenic nanoprobe in various metastatic models. *Biomaterials* **35**, 2302-2311.

- Saegusa, K., Ishimaru, N., Yanagi, K., Arakaki, R., Ogawa, K., Saito, I., Katunuma, N., in Hayashi, Y. (2002). Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *J Clin Invest* **110**, 361-369.
- Schechter, I., in Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 157-162.
- Schilling, J., Schöppe, J., Plückthun, A. (2014). From DARPins to LoopDARPins: novel LoopDARPin design allows the selection of low picomolar binders in a single round of ribosome display. *J Mol Biol* **6**, 691-721
- Schönefuss, A., Wendt, W., Schattling, B., Schulten, R., Hoffmann, K., in Stuecker, M. (2010). Upregulation of cathepsin S in psoriatic keratinocytes. *Exp Dermatol* **19**.
- Schurigt, U., Stopfel, N., Huckel, M., Pfirschke, C., Wiederanders, B., in Brauer, R. (2005). Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* **7**, R174-188.
- Schweizer, A., Roschitzki-Voser, H., Amstutz, P., Briand, C., Gulotti-Georgieva, M., Prenosil, E., Binz, H.K., Capitani, G., Baici, A., Pluckthun, A., *in sod.* (2007). Inhibition of caspase-2 by a designed ankyrin repeat protein: specificity, structure, and inhibition mechanism. *Structure* **15**, 625-636.
- Schweizer, A., Rusert, P., Berlinger, L., Ruprecht, C.R., Mann, A., Cortesy, S., Turville, S.G., Aravantinou, M., Fischer, M., Robbiani, M., *in sod.* (2008). CD4-specific designed ankyrin repeat proteins are novel potent HIV entry inhibitors with unique characteristics. *PLoS Pathog* **4**, e1000109.
- Seeger, M.A., Mittal, A., Velamakanni, S., Hohl, M., Schauer, S., Salaa, I., Grutter, M.G., in van Veen, H.W. (2012). Tuning the drug efflux activity of an ABC transporter in vivo by in vitro selected DARPins binders. *PLoS One* **7**, e37845.
- Seeger, M.A., Zbinden, R., Flutsch, A., Gutte, P.G., Engeler, S., Roschitzki-Voser, H., in Grutter, M.G. (2013). Design, construction, and characterization of a second-generation DARPins library with reduced hydrophobicity. *Protein Sci* **22**, 1239-1257.
- Segal, E., Prestwood, T.R., van der Linden, W.A., Carmi, Y., Bhattacharya, N., Withana, N., Verdoes, M., Habtezion, A., Engleman, E.G., in Bogoy, M. (2015). Detection of intestinal cancer by local, topical application of a quenched fluorescence probe for cysteine cathepsins. *Chem Biol* **22**, 148-158.
- Seo, H.R., Bae, S., in Lee, Y.S. (2009). Radiation-induced cathepsin S is involved in radioresistance. *Int J Cancer* **124**, 1794-1801.
- Sevenich, L., Bowman, R.L., Mason, S.D., Quail, D.F., Rapaport, F., Elie, B.T., Brogi, E., Brastianos, P.K., Hahn, W.C., in Holsinger, L.J. (2014). Analysis of tumour-and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nat Cell Biol* **16**, 876-888.
- Shaked, H., Hofseth, L.J., Chumanevich, A., Chumanevich, A.A., Wang, J., Wang, Y., Taniguchi, K., Guma, M., Shenouda, S., Clevers, H., *in sod.* (2012). Chronic epithelial NF-kappaB activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 14007-14012.
- Shalapour, S., in Karin, M. (2015). Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest* **125**, 3347-3355.
- Shi, G.P., Sukhova, G.K., Kuzuya, M., Ye, Q., Du, J., in Zhang, Y. (2003). Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ Res* **92**.

- Shi, J., Kantoff, P.W., Wooster, R., in Farokhzad, O.C. (2017). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* *17*, 20-37.
- Shree, T., Olson, O.C., Elie, B.T., Kester, J.C., Garfall, A.L., Simpson, K., Bell-McGuinn, K.M., Zabor, E.C., Brogi, E., in Joyce, J.A. (2011). Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev* *25*, 2465-2479.
- Shuja, S., Sheahan, K., in Murnane, M.J. (1991). Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissues, colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* *49*, 341-346.
- Simon, M., Frey, R., Zangemeister-Wittke, U., in Pluckthun, A. (2013). Orthogonal assembly of a designed ankyrin repeat protein-cytotoxin conjugate with a clickable serum albumin module for half-life extension. *Bioconj Chem* *24*, 1955-1966.
- Simon, M., Stefan, N., Borsig, L., Pluckthun, A., in Zangemeister-Wittke, U. (2014). Increasing the antitumor effect of an EpCAM-targeting fusion toxin by facile click PEGylation. *Mol Cancer Ther* *13*, 375-385.
- Sobotic, B., Vizovisek, M., Vidmar, R., Van Damme, P., Gocheva, V., Joyce, J.A., Gevaert, K., Turk, V., Turk, B., in Fonovic, M. (2015). Proteomic Identification of Cysteine Cathepsin Substrates Shed from the Surface of Cancer Cells. *Mol Cell Proteomics* *14*, 2213-2228.
- Sukhova, G.K., Zhang, Y., Pan, J.H., Wada, Y., Yamamoto, T., Naito, M., Kodama, T., Tsimikas, S., Witztum, J.L., Lu, M.L., *in sod.* (2003). Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* *111*, 897-906.
- Szedlacsek, S.E., Ostafe, V., Serban, M., in Vlad, M.O. (1988). A re-evaluation of the kinetic equations for hyperbolic tight-binding inhibition. *Biochem J* *254*, 311-312.
- Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M., in Pluckthun, A. (2012). Designed ankyrin repeat proteins (DARPs) from research to therapy. *Methods Enzymol* *503*, 101-134.
- Tao, K., Stearns, N.A., Dong, J., Wu, Q.L., Sahagian, G.G. (1994). The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys* *311*, 19-27.
- Trinchieri, G. (2012). Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu Rev Immunol* *30*, 677-706.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* *5*, 785-799.
- Turk, B., Dolenc, I., Zerovnik, E., Turk, D., Gubensek, F., in Turk, V. (1994). Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site. *Biochemistry* *33*, 14800-14806.
- Turk, B., Turk, D., in Turk, V. (2012a). Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J* *31*, 1630-1643.
- Turk, D. (2013). MAIN software for density averaging, model building, structure refinement and validation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *69*, 1342-1357.
- Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M., in Turk, B. (1998). Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem* *379*, 137-147.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., in Turk, D. (2012b). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta* *1824*, 68-88.
- Unanue, E.R., Turk, V., in Neefjes, J. (2016). Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annu Rev Immunol* *34*, 265-297.

- Vasiljeva, O., Dolinar, M., Pungercar, J.R., Turk, V., in Turk, B. (2005). Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans. *FEBS Lett* **579**, 1285-1290.
- Vasiljeva, O., Papazoglou, A., Kruger, A., Brodoefel, H., Korovin, M., Deussing, J., Augustin, N., Nielsen, B.S., Almholt, K., Bogyo, M., *in sod.* (2006). Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* **66**, 5242-5250.
- Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V., in Turk, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des* **13**, 387-403.
- Veillard, F., Saidi, A., Burden, R.E., Scott, C.J., Gillet, L., Lecaille, F., in Lalmanach, G. (2011). Cysteine cathepsins S and L modulate anti-angiogenic activities of human endostatin. *J Biol Chem* **286**, 37158-37167.
- Verdoes, M., Edgington, L.E., Scheeren, F.A., Leyva, M., Blum, G., in Weiskopf, K. (2012). A nonpeptidic cathepsin S activity-based probe for noninvasive optical imaging of tumor-associated macrophages. *Chem Biol* **19**.
- Verdoes, M., Oresic Bender, K., Segal, E., van der Linden, W.A., Syed, S., Withana, N.P., Sanman, L.E., in Bogyo, M. (2013). Improved quenched fluorescent probe for imaging of cysteine cathepsin activity. *J Am Chem Soc* **135**, 14726-14730.
- Vizovisek, M., Vidmar, R., Van Quickelberghe, E., Impens, F., Andjelkovic, U., Sobic, B., Stoka, V., Gevaert, K., Turk, B., in Fonovic, M. (2015). Fast profiling of protease specificity reveals similar substrate specificities for cathepsins K, L and S. *Proteomics* **15**, 2479-2490.
- Wang, B., Sun, J., Kitamoto, S., Yang, M., Grubb, A., Chapman, H.A., Kalluri, R., and Shi, G.P. (2006). Cathepsin S controls angiogenesis in tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* **281**, 6020-6029.
- Watzke, A., Kosec, G., Kindermann, M., Jeske, V., Nestler, H.P., Turk, V., Turk, B., in Wendt, K.U. (2008). Selective activity-based probes for cysteine cathepsins. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**, 406-409.
- Weissleder, R., Tung, C.-H., Mahmood, U., in Bogdanov, A. (1999). In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotech* **17**, 375-378.
- Whitley, M.J., Cardona, D.M., Lazarides, A.L., Spasojevic, I., Ferrer, J.M., Cahill, J., Lee, C.-L., Snuderl, M., Blazer, D.G., Hwang, E.S., *in sod.* (2016). A mouse-human phase 1 co-clinical trial of a protease-activated fluorescent probe for imaging cancer. *Sci Transl Med* **8**, 320ra324.
- Wiederanders, B., Kaulmann, G., in Schilling, K. (2003). Functions of propeptide parts in cysteine proteases. *Curr Protein Pept Sci* **4**, 309-326.
- Wilkinson, R.D.A., Magorrian, S.M., Williams, R., Young, A., Small, D.M., Scott, C.J., in Burden, R.E. (2015). CCL2 is transcriptionally controlled by the lysosomal protease cathepsin S in a CD74-dependent manner. *Oncotarget* **6**, 29725-29739.
- Willmann, J.K., van Bruggen, N., Dinkelborg, L.M., in Gambhir, S.S. (2008). Molecular imaging in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 591-607.
- Winkler, J., Martin-Killias, P., Plückthun, A., in Zangemeister-Wittke, U. (2009). EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with Designed Ankyrin Repeat Proteins. *Mol Cancer Ther* **8**, 2674-2683.

- Withana, N.P., Garland, M., Verdoes, M., Ofori, L.O., Segal, E., in Bogyo, M. (2016a). Labeling of active proteases in fresh-frozen tissues by topical application of quenched activity-based probes. *Nat Protoc* *11*, 184-191.
- Withana, N.P., Ma, X., McGuire, H.M., Verdoes, M., van der Linden, W.A., Ofori, L.O., Zhang, R., Li, H., Sanman, L.E., Wei, K., *in sod.* (2016b). Non-invasive Imaging of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Using Cathepsin Protease Probes. *Sci Rep* *6*, 19755.
- Wunder, A., Tung, C.H., Muller-Ladner, U., Weissleder, R., in Mahmood, U. (2004). In vivo imaging of protease activity in arthritis: a novel approach for monitoring treatment response. *Arthritis Rheum* *50*, 2459-2465.
- Wyler, E., Kaminska, M., Coïc, Y.M., Baleux, F., Véron, M., Agou, F. (2007) Inhibition of NF-kappaB activation with designed ankyrin-repeat proteins targeting the ubiquitin-binding/oligomerization domain of NEMO. *Protein Sci* *16*, 2013-2022
- Yan, D., Wang, H.-W., Bowman, Robert L., in Joyce, Johanna A. (2016). STAT3 and STAT6 Signaling Pathways Synergize to Promote Cathepsin Secretion from Macrophages via IRE1 α Activation. *Cell Reports* *16*, 2914-2927.
- Zahnd, C., Amstutz, P., in Pluckthun, A. (2007a). Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nat Methods* *4*, 269-279.
- Zahnd, C., Kawe, M., Stumpp, M.T., de Pasquale, C., Tamaskovic, R., Nagy-Davidescu, G., Dreier, B., Schibli, R., Binz, H.K., Waibel, R., *in sod.* (2010). Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size. *Cancer Res* *70*, 1595-1605.
- Zahnd, C., Wyler, E., Schwenk, J.M., Steiner, D., Lawrence, M.C., McKern, N.M., Pecorari, F., Ward, C.W., Joos, T.O., in Pluckthun, A. (2007b). A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to Her2. *J Mol Biol* *369*, 1015-1028.

Bibliografija

Objave v povezavi z delom

Hu, H.Y., Vats, D., Vizovisek, M., Kramer, L., Germanier, C., Wendt, K.U., Rudin, M., Turk, B., Plettenburg, O., in Schultz, C. (2014b). In vivo imaging of mouse tumors by a lipidated cathepsin S substrate. *Angew Chem Int Ed Engl* 53, 7669-7673.

Kramer, L., Renko, M., Završnik, J., Turk, D., Seeger, M.A., Vasiljeva, O., Grütter, M.G., Turk, V. in Turk B. (sprejeto v objavo) Non-invasive *in vivo* imaging of tumour-associated cathepsin B by a highly selective inhibitory DARPin

Kramer, L., Turk, D. in Turk, B. (poslano v objavo) The future of cysteine cathepsins in disease management

Članki v revijah

Kurtjak, M., Vukomanović, M., Kramer, L., Suvorov, D. (2016) Biocompatible nano-gallium/hydroxyapatite nanocomposite with antimicrobial activity. *J Mater Sci Mater Med* 27, 170

Kurtjak, M., Vukomanović, M., Krajnc, A., Kramer, L., Turk, B., Suvorov, D. (2016) Designing Ga(III)-containing hydroxyapatite with antibacterial activity. *RSC Adv* 6, 112839-52

Prispevek na konferenci

Starkl, K., Kramer, L., Turk, B., Iskra, J. (2015) Sinteza in protitumorsko delovanje nesimetričnih 1,2,4,5 – tetraoksanov. Zbornik referatov in povzetkov, Slovenski kemijski dnevi 2015, Ljubljana, Slovenija

Kramer, L., Vizovišek, M., Turk, B. (2016) Imaging cathepsins : from cells to in vivo diagnostics. Book of abstracts, XVth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control, Portorož (Slovenija)

Kramer, L., Renko, M., Turk, D., Seeger, M.A., Vasiljeva, O., Grütter, M.G., Turk, V. in Turk B. (2015) Targeting cathepsin B in the tumour microenvironment by inhibitory DARPins. The 15th FEBS Young Scientists Forum, Berlin (Nemčija)

Starkl, K., Kramer, L., Turk, B., Iskra, J. (2015) Synthesis of unsymmetrical 1,2,3,5-tetraoxanes and evaluation of their antitumor activity. International Conferences on Current Challenges in Drug Discovery Research, Rajasthan (Indija)

Vizovišek, M., Vidmar, R., Sobotič, B., Kramer, L., Stoka, V., Turk, B., Fonović, M. (2015) Proteomic insights in cancer-related extracellular proteolysis with cathepsin K. Advanced proteomics, 9th European Summer School, Brixen, Bressanone

Biografija

Lovro Kramer je dodiplomski študij zaključil na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo (FKKT) Univerze v Ljubljani septembra 2012 in s tem pridobil naziv univerzitetni diplomirani kemik. Tekom študija je bil prejemnik Zoisove štipendije za nadarjene študente in pohvale FKKT za najboljši učni uspeh med študenti 3. letnika univerzitetnega študijskega programa kemije.

Oktobra 2012 se je vpisal na podiplomski študij Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana, smer Nanoznanosti in nanotehnologije (NANO3) pri mentorju prof. dr. Vitu Turku. Tekom študija je zaradi upokojitve prof. dr. Vita Turka mentorstvo prevzel prof. ddr. Boris Turk.

Decembra 2012 se je zaposlil na Institutu »Jožef Stefan«, na Oddelku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo kot mladi raziskovalec. Med januarjem in marcem 2013 je bil gostujoči študent na Odseku za biokemijo Univerze v Zürichu v Švici.

Avtor je septembra 2012 opravil tečaj za usposobljenost za delo s poskusnimi živalmi in se junija 2016 udeležil delavnice o meritvah proteinskih interakcij FEBS Advanced course on ligand binding theory and practice.