

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja ŠTALEKAR

**PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA KATEPSINA B V
E. coli IN INHIBICIJA NJEGOVE AKTIVNOSTI Z
NIZKOMOLEKULARNIMI INHIBITORJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja ŠTALEKAR

**PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA KATEPSINA B V *E. coli* IN
INHIBICIJA NJEGOVE AKTIVNOSTI Z NIZKOMOLEKULARNIMI
INHIBITORJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARATION OF RECOMBINANT CATHEPSIN B IN *E. coli* AND
INHIBITION OF ITS ACTIVITY BY LOW MOLECULAR WEIGHT
INHIBITORS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študijskega programa biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija študija biotehnologije je na seji dne 18. 6. 2009 sprejela naslov diplomskega dela. Za mentorja je imenovala prof. dr. Janka Kosa, za somentorico mag. Uršo Pečar Fonović in za recenzentko prof. dr. Natašo Poklar Ulrih.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Janko KOS
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Članica: mag. Urša PEČAR FONOVIĆ
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Članica: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 8. 9. 2010

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Maja Štalekar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 606:61:577.15(043.2)
KG katepsin B/prokatepsin B/cisteinska proteaza/heterologno izražanje/rekombinantni protein/*Escherichia coli*/nizkomolekularni inhibitor/inhibicija/testiranje inhibicije
AV ŠTALEKAR, Maja
SA KOS, Janko (mentor)/PEČAR FONOVIČ, Urša (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
LI 2010
IN PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA KATEPSINA B V *E. coli* IN INHIBICIJA NJEGOVE AKTIVNOSTI Z NIZKOMOLEKULARNIMI INHIBITORJI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 46, [5] str., 5 pregl., 11 sl., 1 pril., 54 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Pripravili smo rekombinantni človeški katepsin B. Preverili smo inhibitorni učinek 22 nizkomolekularnih sinteznih spojin, izbranih z virtualnim rešetanjem, na katepsin B. V *E. coli* smo izrazili človeški prokatepsin B, ki se je v bakterijah nakopičil v obliki inkluzijskih teles. Izolirani in renaturirani prokatepsin B smo izpostavili procesiranju s pepsinom. Tako pridobljeni zreli in aktivni katepsin B smo očistili z ionsko izmenjevalno kromatografijo. Končni izkoristek je bil 1,4 mg katepsina B, pridobljenega iz 58,6 mg prokatepsina B (približno 2 %) s 70 % deležem aktivnega encima. Testiranje nizkomolekularnih spojin kot potencialnih inhibitorjev katepsina B smo izvedli posebej z endopeptidaznim (Z-Arg-Arg-AMC) in eksopeptidaznim (Abz-GIVRAK-(Dnp)-OH) substratom. Določili smo začetne hitrosti reakcij in jih statistično primerjali z začetnimi hitrostmi kontrolnih reakcij brez testnih spojin. Začetne hitrosti se pri endopeptidaznem testiranju med seboj niso statistično značilno razlikovale ($p = 0,99$). Pri eksopeptidaznem testiranju je nekaj spojin kazalo statistično značilne rezultate ($p \leq 0,05$), vendar pa je njihova nakazana inhibicija prenizka. Domnevo o inhibitornem učinku testnih spojin na katepsin B smo ovrgli.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 606:61:577.15(043.2)
CX cathepsin B/procathepsin B/cysteine protease/recombinant protein/heterologous expression/*Escherichia coli*/low molecular weight inhibitor/inhibition/inhibition screen
AU ŠTALEKAR, Maja
AA KOS, Janko (supervisor)/PEČAR FONOVIĆ, Urša (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty
PY 2010
TI PREPARATION OF RECOMBINANT CATHEPSIN B IN *E. coli* AND INHIBITION OF ITS ACTIVITY BY LOW MOLECULAR WEIGHT INHIBITORS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 46, [5] p., 5 tab., 11 fig., 1 ann., 54 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Recombinant human cathepsin B was prepared. 22 low molecular weight synthetic compounds, proposed by virtual screening to inhibit cathepsin B, were tested. Human procathepsin B was expressed in *E. coli*. Procathepsin B accumulated in bacterial cells in a form of inclusion bodies. Isolated and renatured procathepsin B was processed with pepsin to a mature and active form of cathepsin B, followed by purification by ion exchange chromatography. The final yield of the preparation was 1,4 mg of cathepsin B obtained from 58,6 mg of procathepsin B (approximately 2 %) with 70 % of active enzyme. Low molecular weight compounds were screened for the inhibition of cathepsin B with an endopeptidase (Z-Arg-Arg-AMC) and exopeptidase (Abz-GIVRAK-(Dnp)-OH) substrate. Initial rates of reactions were determined and statistically compared to initial rates of control reactions without test compounds. In endopeptidase screening the initial rates did not differ from each other in a statistically significant manner ($p = 0,99$). In exopeptidase screening some compounds showed statistically significant results ($p \leq 0,05$), but their indicated inhibition was too low. The hypothesis of inhibitory effect of the test compounds to cathepsin B was discarded.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KATEPSIN B	2
2.1.1 Sinteza proencima in zorenje	2
2.1.2 Kristalna struktura	3
2.1.3 Vloga zaporne zanke	4
2.1.4 Fiziološka vloga katepsina B	5
2.1.4.1 Sodelovanje v patoloških procesih	5
2.2 INHIBICIJA AKTIVNOSTI KATEPSINA B	6
2.2.1 Endogeni inhibitorji – cistatini	6
2.2.2 Razvoj novih inhibitorjev	7
2.2.2.1 Rešetanje visoke zmogljivosti	7
2.2.2.2 Virtualno rešetanje	8
2.3 IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV	8
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> kot sistem za izražanje heterolognih proteinov	9
2.3.2 Izražanje rekombinantnega katepsina B	10
2.3.2.1 Bakterija <i>Escherichia coli</i>	10
2.3.2.2 Kvasovki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in <i>Pichia pastoris</i>	11
2.3.2.3 Sesalske celice	12
2.3.2.4 Insektne celice	12
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 MATERIAL IN NAPRAVE	13
3.1.1 Reagenti	13
3.1.2 Naprave in druga oprema	14
3.1.3 Organizem	15
3.2 PRIPRAVA KATEPSINA B	15
3.2.1 Izražanje prokatepsina B	16
3.2.2 Izolacija inkluzijskih teles s prokatepsinom B	16
3.2.3 Renaturacija prokatepsina B	16
3.2.4 Procesiranje in aktivacija	17

3.2.5	Čiščenje katepsina B z ionsko izmenjevalno kromatografijo	17
3.3	DETEKCIJA KATEPSINA B	17
3.3.1	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE)	17
3.3.1.1	Barvanje proteinov z barvilom Coomassie Brilliant Blue	19
3.3.2	Prenos western in vezava protiteles	19
3.4	DOLOČITEV KONCENTRACIJE IN AKTIVNEGA DELEŽA KATEPSINA B	19
3.4.1	Spektrofotometrična metoda	19
3.4.2	Metoda po Bradfordu	20
3.4.3	Titracija katepsina B	20
3.5	PUFRI ZA MERJENJE ENCIMSKE KINETIKE KATEPSINA B	20
3.6	REŠETANJE NIZKOMOLEKULARNIH SPOJIN	21
3.6.1	Testiranje inhibicije endopeptidazne aktivnosti	22
3.6.2	Testiranje inhibicije eksopeptidazne aktivnosti	22
3.6.3	Statistična analiza	23
4	REZULTATI	24
4.1	PRIPRAVA KATEPSINA B	24
4.1.1	Izražanje prokatepsina B	24
4.1.2	Renaturacija in procesiranje prokatepsina B	25
4.1.3	Ionsko izmenjevalna kromatografija	26
4.1.4	Koncentracija in aktivni delež katepsina B	27
4.2	TESTIRANJE INHIBICIJE	28
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	31
5.1	PRIPRAVA KATEPSINA B	31
5.2	TESTIRANJE INHIBITORNE AKTIVNOSTI NIZKOMOLEKULARNIH SPOJIN	36
6	POVZETEK	38
7	VIRI	40
7.1	CITIRANI VIRI	40
7.2	DRUGI VIRI	45
	ZAHVALA	47
	PRILOGE	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1	Sestava elektroforeznega in nanašalnega pufra	18
Preglednica 2	Sestavine za pripravo poliakrilamidnega elektroforeznega gela	18
Preglednica 3	Priprava založne raztopine barvila in raztopine za razbarvanje	19
Preglednica 4	Koncentracije prokatepsina in katepsina B v mg/ml, določene z dvema metodama	27
Preglednica 5	Povprečna inhibicija eksopeptidazne aktivnosti katepsina B z 22 nizkomolekularnimi inhibitorji s pripadajočo napako ter p-vrednosti prilagojenega t-testa za primerjavo s kontrolo	29

KAZALO SLIK

Slika 1	Poravnava aminokislinskih zaporedij mišjega, podganjega, človeškega in govejega preprokatepsina B (ClustalW) in prikaz ohranjenih regij s senčenjem (BoxShade)	2
Slika 2	Terciarna struktura katepsina B s prikazom dveh konformacij zaporne zanke: rdeče – zaprto stanje; zeleno – odprto stanje (kot v strukturi prokatepsina B) (Schenker in sod., 2008: 2146)	4
Slika 3	Hodogram priprave rekombinantnega katepsina B	15
Slika 4	Približne molekulske mase proteinskih lis označevalca velikosti SeeBlue [®] Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)	18
Slika 5	Elektroforezni gel, barvan z barvilom Coomassie Brilliant Blue (a) ter imunski odtis (b) bakterijskih lizatov ekspresijskega in kontrolnega seva pred indukcijo in ob zaključku ekspresije.	24
Slika 6	Imunski odtis vzorca pred procesiranjem s pepsinom	25
Slika 7	Imunski odtis vzorcev med inkubacijo s pepsinom	25
Slika 8	Imunski odtis	26
Slika 9	Elucijski profil katepsina B	26
Slika 10	Titracijski krivulji dveh serij čiščenja katepsina B (a – serija 1, b – serija 2)	28
Slika 11	Primerjava povprečnih inhibicij eksopeptidazne aktivnosti nekaj inhibitorjev ($p \leq 0,05$) na posameznih ploščah (beli stolpci) in skupne povprečne inhibicije s standardno napako (sivi stolpci)	30

KAZALO PRILOG

Priloga A: SEZNAM TESTNIH NIZKOMOLEKULARNIH SINTEZNIH SPOJIN	48
--	----

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₂₈₀	absorbanca pri 280 nm
Abz	orto-aminobenzojska kislina
AMC	aminometil kumarin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	aspartat
BSA	goveji serumski albumin
cDNA	komplementarna DNA
Cys	cistein
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DMSO	dimetilsulfoksid
Dnp	2,4-dinitrofenil
DTT	ditiotreititol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
His	histidin
HTS	rešetanje visoke zmogljivosti
IC ₅₀	koncentracija snovi, pri kateri je dosežena 50 % inhibicija
IPTG	izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid
mRNA	sporočilna ribonukleinska kislina
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
PEG	polietilen glikol
RFU	relativna enota fluorescence
RNA	ribonukleinska kislina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propanol
[E]	molarna koncentracija encima
[I]	molarna koncentracija inhibitorja

1 UVOD

Katepsini predstavljajo veliko družino proteaz ali peptidaz – encimov, ki cepijo peptidno vez. Doslej je bilo odkritih preko 20 različnih predstavnikov. Večina jih sodi med cisteinske proteaze, katepsina A in G sta serinski, D in E pa aspartatni proteazi. Ime določa aminokislinski ostanek v aktivnem mestu, ki ima osrednjo vlogo pri katalitični aktivnosti. Z nekaj izjemami je večina katepsinov endopeptidaz, ki cepijo peptidno vez znotraj molekul.

Katepsin B je papainu podobna lizosomska cisteinska proteaza, sposobna tako endopeptidazne kot tudi eksopeptidazne aktivnosti. Po klasifikaciji MEROPS so peptidaze razvrščene v klane, znotraj teh pa v družine. Katepsin B je uvrščen v klan CA in družino C1. Je pogosto prisoten encim, ki ga najdemo v celicah vseh sesalcev v vseh tkivih. V celicah se nahaja v lizosomih. Nekateri drugi katepsini so prisotni le v določenih tkivih ali celicah.

Cisteinski katepsini so homologni in imajo podobno strukturo. So encimi, ki skrbijo za razgradnjo proteinov, izkazujejo pa tudi specifične proteolitske aktivnosti. Vpleteni so v različne fiziološke in tudi patofiziološke procese, zato so zanimivi kot predmet raziskav in kot možne tarče za razvoj novih zdravil.

Namen diplomskega dela je bil pripraviti zadostno količino človeškega rekombinantnega katepsina B, ki ga na Fakulteti za farmacijo potrebujejo za študije inhibicije njegove aktivnosti (nekaj mikrogramov) in pripravo kristalne strukture kompleksa katepsina B z določenim inhibitorjem (nekaj miligramov).

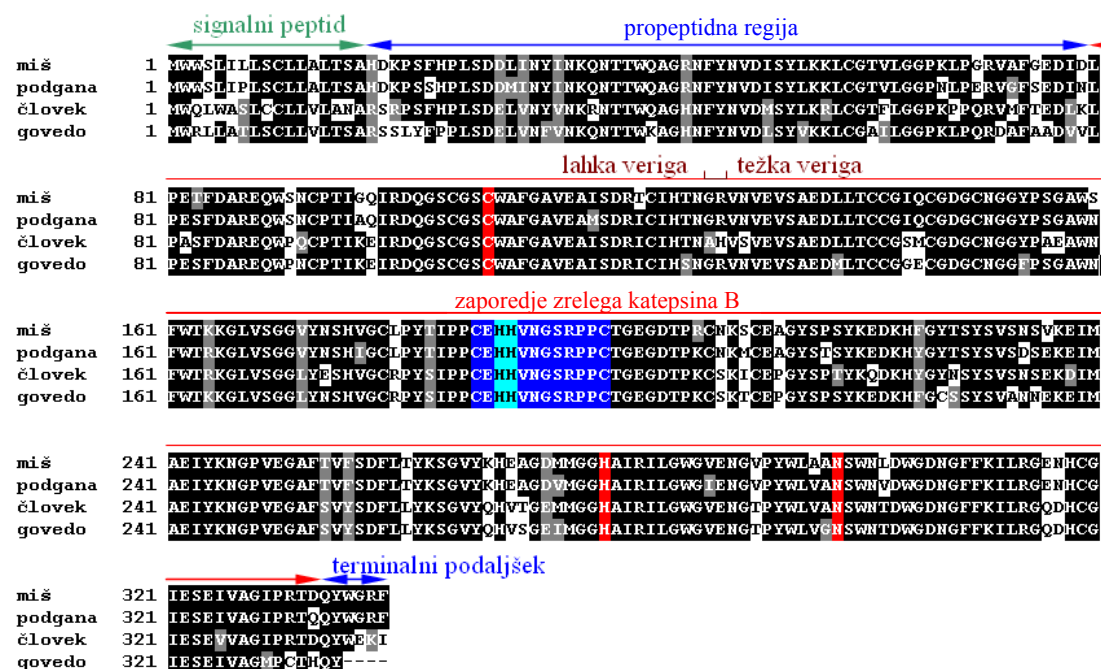
V nadaljevanju smo želeli še preveriti, ali imajo nizkomolekularne spojine, ki so se pri virtualnem rešetanju izkazale kot možni inhibitorji katepsina B, dejanski vpliv na njegovo aktivnost. Virtualno rešetanje je izvedla raziskovalna skupina omenjene fakultete.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KATEPSIN B

2.1.1 Sinteza proencima in zorenje

Katepsin B v celicah nastane kot neaktiven proencim, ki se mora preoblikovati in aktivirati do zrele, aktivne oblike. Na ribosomih se sintetizira preprokatepsin B. Človeški preprokatepsin je sestavljen iz 339 aminokislin. Na NH₂ koncu se nahaja 17 aminokislinskih ostankov prepeptidnega zaporedja, ki mu sledi propeptidna regija, dolga 62 ostankov. Naslednjih 254 ostankov predstavlja verigo zrelega katepsina B, na COOH koncu pa se nahaja še 6 aminokislin dolg podaljšek (Chan in sod., 1986). Signalni prepeptid se odstrani že med translacijo. Proencim se v Golgijevem aparatu glikozilira, potem pa se z manoza 6-fosfatnim signalom usmeri v lizosom. Med transportom se endosomalni/prelizosomalni vezikel zakisa, kar sproži omejeno proteolitično procesiranje proencima. Propeptid in C-terminalni podaljšek se odcepita in tako nastane zrela ter aktivna enoverižna oblika encima, ta pa je lahko v lizosomu še naprej predelana v dvoverižno obliko, sestavljeno iz lahke in težke verige, ki sta povezani z disulfidnim mostičkom.



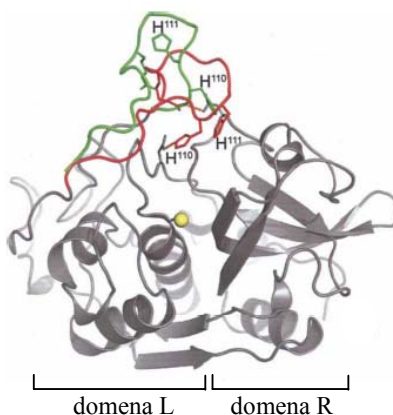
Slika 1: Poravnava aminokislinskih zaporedij mišjega, podganjega, človeškega in govejega preprokatepsina B (ClustalW) in prikaz ohranjenih regij s senčenjem (BoxShade). Dodatno so rdeče osenčeni aminokislinski ostanki, ki so pomembni v aktivnem mestu (Cys29, His199, Asn219), in modro zaporedje zaporne zanke (Cys108–Cys119) s histidinskima ostankoma (His110, His111), ki sta pomembna za eksopeptidazno aktivnost.

Zorenje katepsina B je proučevalo več raziskovalnih skupin. Rowan in sod. (1992) so ugotovili, da so procesiranja prokatepsina B do zrelega enoverižnega encima v *in vitro* pogojih zmožne različne proteaze, kot so pepsin, katepsina D in L ter tudi sam katepsin B. Encimi režejo prokatepsin B na različnih mestih, rezultat procesiranja s posameznimi encimi je bil katepsin B z različnimi kratkimi N-terminalnimi podaljškami. S procesiranjem prokatepsina B s katepsinom B v kombinaciji s peptidil-dipeptidazo I pa so uspeli pridobiti katepsin B brez podaljška, torej enakega kot pri naravnem *in vivo* procesiranju. Ugotovili so tudi, da je prokatepsin B v kislem okolju zmožen avtoprocesiranja. Mach in sod. (1993) so pokazali, da je v človeških jetrnih celicah za pretvorbo v zrelo obliko odgovoren sam katepsin B.

2.1.2 Kristalna struktura

Musil in sod. (1991) so določili X-žarkovno kristalno strukturo človeškega katepsina B, izoliranega iz jeter. Ugotovili so, da je polipeptidna veriga zvrta v dve domeni, poimenovani "R" in "L", vmes pa se tvori reža z aktivnim mestom v obliki črke V. Potrdili so, da je v strukturi šest disulfidnih mostičkov, dva cisteina pa sta prosta. Eden teh je Cys29, ki se topološko ujema z reaktivnim cisteinom aktivnega mesta v drugih cisteinskih proteazah. Disulfidni mostiček med Cys108 in Cys119 ustvari kovalentno zaprto krožno strukturo, tako imenovano zaporno zanko (angl. occluding loop), ki z ene strani ovira režo z aktivnim mestom. Ta zanka je unikatna značilnost katepsina B, saj je druge cisteinske proteaze nimajo.

Določeni sta bili tudi kristalni strukturi podganjega (Cygler in sod., 1996) ter človeškega (Turk in sod., 1996) prokatepsina B. Propeptid v prokatepsinu ne tvori lastne globularne strukture, pač pa je ovit okoli strukture katepsina B, preko reže z aktivnim mestom. Pokazalo se je, da zaseda zaporna zanka v prokatepsinu drugačen položaj kot v zrelem katepsinu B, kar pomeni, da je gibljiva. Po odcepitvi propeptida zanka spremeni konformacijo. Propeptid, ki deluje kot inhibitor zrelega katepsina B (Fox in sod., 1992), je sposoben spremeniti konformacijo zanke (Illy in sod., 1997).



Slika 2: Terciarna struktura katepsina B s prikazom dveh konformacij zaporne zanke: rdeče – zaprto stanje; zeleno – odprto stanje (kot v strukturi prokatepsina B) (Schenker in sod., 2008: 2146)

2.1.3 Vloga zaporne zanke

V zrelem katepsinu B je struktura zaporne zanke stabilizirana z interakcijami znotraj zanke ter z interakcijami z ostalim delom proteina. Tako dva aminokislinska ostanka zanke, His110 in Arg116, tvorita solna mostička z Asp22 in Asp224 (Musil in sod., 1991). Te elektrostatske interakcije zaklepajo zaporno zanko v zaprtem stanju. V proencimu teh povezav ni.

Katepsin B je eden redkih predstavnikov lizosomskih cisteinskih proteaz, ki ima poleg endopeptidazne tudi eksopeptidazno aktivnost, in sicer deluje kot peptidil dipeptidaza, kar pomeni, da odceplja dipeptide s C-konca polipeptidov. Za to sposobnost je neposredno odgovorna zaporna zanka. Illy in sod. (1997) so pripravili mutiran katepsin B brez dvanajstih aminokislinskih ostankov (Cys108 do Cys119), ki gradijo zanko. Encim je popolnoma izgubil eksopeptidazno aktivnost, medtem ko je bila endopeptidazna aktivnost ohranjena. Pomembno vlogo imata histidinska ostanka na mestih 110 in 111 v zaporni zanki, ki s svojim pozitivnim nabojem delujeta kot sprejemnika negativnega naboja na C-koncu substrata. To idejo je podprla študija z mutiranimi oblikami katepsina B, ki so jo izvedli Krupa in sod. (2002).

Zaporna zanka je z oviranjem dostopa substrata odgovorna tudi za slabo endopeptidazno aktivnost katepsina B v primerjavi z drugimi podobnimi cisteinskimi proteazami. Nägler in sod. (1997) so oblikovali mutante, kjer so posamezne aminokislinske ostanke, ki stabilizirajo zaporno zanko s tvorbo solnih mostičkov, zamenjali z alaninom. S tem so dosegli odprto stanje zaporne zanke. Endopeptidazna aktivnost takih mutant je močno povečana in se lahko primerja z aktivnostjo drugih cisteinskih proteaz. Energetska zahteva spremembe konformacije zanke je verjetno vzrok za slabšo endopeptidazno aktivnost katepsina B.

2.1.4 Fiziološka vloga katepsina B

Katepsin B sodeluje pri znotrajcelični razgradnji proteinov v lizosomih, odkrili pa so tudi nekatere bolj specifične naloge. Vlogo ima pri procesiranju antigenov v antigen predstavitvenih celicah (Matsunaga in sod., 1993), pri aktivaciji tiroglobulina, prekursorja tiroidnih hormonov (Friedrichs in sod., 2003), in pri zorenju β -galaktozidaze v lizosomih (Okamura-Oho in sod., 1997).

2.1.4.1 Sodelovanje v patoloških procesih

Pri nekaterih bolezenskih stanjih se katepsin B izloča iz celic in deluje zunajcelično – razgrajuje zunajcelične proteine. Katepsin B naj bi bil vpleten v razgradnjo zunajceličnega matriksa pri artritisu, saj se izloča iz revmatoidnih sinovialnih celic (Mort in sod., 1984). Povezali so ga tudi z Alzheimerjevo boleznijo, kjer pa različne študije kažejo tako negativen kot pozitiven vpliv katepsina B. Ugotovili so, da peptidi A β 42, ki tvorijo amiloidne plake pri Alzheimerjevi bolezni, spodbujajo večje izražanje katepsina B v mikroglia celicah. Z inhibicijo katepsina B na nivoju mRNA in proteinskem nivoju so pokazali, da ima katepsin B vlogo pri smrti nevronov, povzročeni z vnetnim odzivom mikroglia celic v prisotnosti A β 42 (Gan in sod., 2004). Mueller-Steiner in sod. (2006) pa so z mišjim modelom pokazali, da katepsin B s proteolitsko razgradnjo zmanjšuje nivo peptidov A β in ima zaščitni vpliv na živčne celice.

Vlogo ima pri različnih virusnih okužbah. Tako naj bi bil skupaj s katepsinom L odgovoren za razgradnjo glikoproteina virusa ebole, kar je nujen korak za vstop virusa v celico in s tem okužbo (Chandran in sod., 2005). Sodeloval naj bi tudi v apoptotični signalni poti, sproženi s človeškim papiloma virusom (Kaznelson in sod., 2004).

Največ znanstvene pozornosti pa je bilo posvečene udeležnosti katepsina B pri raku. K zmožnosti tumorskih celic, da napadajo tkiva in metastazirajo, naj bi prispevalo povečano izražanje proteaz in/ali zmanjšano izražanje proteaznih inhibitorjev. Proteaze lahko prispevajo k metastaziranju na različne načine: z razgrajevanjem zunajceličnega matriksa lahko povzročijo odcepitev posameznih celic iz primarnega tumorja ter pomagajo pri napadanju okoliškega tkiva za vzpostavitev kontakta z žilnim omrežjem; razgradijo bazalno membrano med intra- in ekstravazacijo (vstop in izstop tumorskih celic iz kapilar) in pomagajo pri invaziji tkiva med nastajanjem sekundarnih tumorjev.

Pri raku debelega črevesa in danke oziroma kolorektalnem raku so odkrili povečano izražanje katepsina B v tumorskih stromalnih celicah v primerjavi z njegovim izražanjem v normalnem mukoznem tkivu in v adenomih (to je benignih tumorjih). Opazili so tudi korelacijo izražanja s stadijem bolezni ter ga povezali s signifikantno krajšim časom

preživetja bolnikov (Campo in sod., 1994). Višji nivo katepsina B so opazili tudi pri raku želodca (Farinati in sod., 1996), pljuč (Sukoh in sod., 1994), kjer so tudi opazili korelacijo z večjim metastatskim potencialom in krajšim časom preživetja, pri gliomu (korelacija z invazivnostjo) (Rempel in sod., 1994), ploščatoceličnem karcinomu ustne votline (Vigneswaran in sod., 2000) in drugih.

Po drugi strani pa kaže, da lahko katepsin B sodeluje tudi pri zaviranju raka. Foghsgaard in sod. (2001) so z raziskavo na treh različnih linijah tumorskih celic pokazali, da ima katepsin B ključno vlogo v apoptozi, povzročeni z dejavnikom tumorske nekroze, TNF (iz angl. tumor necrosis factor), v normalnih celicah pa temu ni tako. Ugotovili so, da TNF v tumorskih celicah ne povzroči večjega izražanja katepsina B in ne vpliva na njegovo aktivnost, pač pa sproži premik katepsina B iz lizosomov v citosol, ki mu sledi celična smrt. Nasprotno pa Klarić in sod. (2009) niso uspeli pokazati proapoptotičnega vpliva katepsina B pri dveh drugih tumorskih celičnih linijah. Kaže, da je vpliv katepsina B odvisen od tipa celic.

Zaradi opisane vloge v boleznih je katepsin B pomembna tarča za razvoj novih protitumorskih in tudi protiviralnih zdravil. O tem pričajo tudi patentni o inhibitorjih katepsina B, o uporabi inhibitorjev ter tudi drugih načinov regulacije katepsina B za zdravljenje različnih bolezni in o uporabnosti katepsina B kot diagnostičnega tumorskega označevalca.

2.2 INHIBICIJA AKTIVNOSTI KATEPSINA B

Aktivnost proteaz *in vivo* je regulirana na transkripcijskem nivoju s stopnjo izražanja ter na proteinskem nivoju z aktivacijo prooblike encima ter z inhibitorji in morebitnimi kofaktorji. Te stopnje predstavljajo potencialne možnosti za uravnavanje neustrezne aktivnosti v bolezenskih stanjih. Iskanje inhibitorjev proteaz, ki so vpletene v patološke procese, je zato zelo pomembno področje razvoja novih zdravil.

2.2.1 Endogeni inhibitorji – cistatini

Aktivnost lizosomskih proteaz inhibirajo proteinski inhibitorji superdružine cistatinov. Le-te delimo na tri poddružine. Družino I oziroma stefine predstavljajo okoli 100 aminokislin dolgi proteini z eno samo domeno in brez disulfidnih vezi. V družino II so uvrščeni nekoliko daljši proteini (okoli 120 aminokislin), ki imajo disulfidne vezi. Družino III pa zastopajo glikoproteini z velikimi molekulskimi masami in več domenami. Imenujemo jih tudi kininogeni.

Cistatini inhibirajo lizosomske cisteinske proteaze tako, da se trdno vežejo na režo z aktivnim mestom. Pri katepsinu B pa vezavo ovira zaporna zanka. Na primeru cistatina C (Nycander in sod., 1998), ki spada v družino II, in stefina A (Pavlova in sod., 2000), predstavnika družine I, so pokazali, da poteka mehanizem inhibicije katepsina B s cistatini v dveh korakih. Najprej pride do šibke vezave inhibitorja, ki ji sledi konformacijska sprememba katepsina B in tvorba stabilnega kompleksa encim-inhibitor. Konformacijska sprememba naj bi bil odmik zaporne zanke.

2.2.2 Razvoj novih inhibitorjev

Razvoj inhibitorjev navadno temelji na izboljšavi že poznanih spojin z inhibitornim učinkom. Znanе spojine, ki morda niso dovolj učinkovite ali dovolj specifične, uporabijo kot spojine vodnice in jih poskušajo preoblikovati z uporabo molekulskega modeliranja, usmerjenega sistematičnega modificiranja in sinteze analogov. Na ta način so oblikovali tudi prvi potentni specifični inhibitor katepsina B, CA-074 (Sumiya in sod., 1992), ki se danes pogosto uporablja za različne študije funkcij katepsina B. To je sintetični analog ireverzibilnega inhibitorja E-64, ki nespecifično inhibira cisteinske proteaze.

Pri iskanju novih inhibitorjev ali spojin vodnic si lahko pomagamo z rešetanjem visoke zmogljivosti (HTS, iz angl. high-throughput screening) in virtualnim rešetanjem (VS, iz angl. virtual screening) knjižnic več tisoč ali celo več sto tisoč sinteznih spojin. Pristopa se dejansko dopolnjujeta.

2.2.2.1 Rešetanje visoke zmogljivosti

Rešetanje visoke zmogljivosti je eksperimentalno iskanje spojin z želeno aktivnostjo z avtomatiziranim in robotiziranim testiranjem spojin v miniaturiziranih testnih sistemih na mikrotitrskih ploščah s 384 ali 1536 luknjicami.

Analizo podatkov, pridobljenih z rešetanjem visoke zmogljivosti, otežujejo šumi in napake, ki so v glavnem posledica lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov. Do slednjih lahko pride zaradi razgradnje snovi na ploščah, nezadostne čistosti snovi ali prenizkih koncentracij. K lažno pozitivnim rezultatom pa lahko prispeva nespecifična vezava, lastnost promiskuitetne vezave ali toksični efekti v primeru celičnih sistemov. Težavo pa predstavlja tudi nekonsistentna ponovljivost med ploščami.

Raziskovalci ameriškega Penn centra za molekularna odkritja (The Penn Center for Molecular Discovery) so izvedli HTS 63332 spojin, ki jih hrani ameriški Nacionalni inštitut za zdravje (angl. NIH, National Institute of Health), za inhibitorno aktivnost proti katepsinu B. Rezultate so javno objavili v podatkovni zbirki PubChem BioAssay (AID

453, 2010). Uporabili so endopeptidazni substrat Z-Arg-Arg-AMC, testiranje so izvedli pri pH 6,8. Odkrili so 75 spojin, ki so dosegle več kot 20 % inhibicijo. Kasneje so izvedli še potrditveno testiranje teh 75 aktivnih spojin, kjer so določili IC₅₀ (koncentracija spojine, pri kateri je dosežena 50 % inhibicija) posameznih spojin (AID 820, 2010). Identificirali so 37 spojin, katerih IC₅₀ je nižja od 50 μM.

2.2.2.2 Virtualno reševanje

V nasprotju s HTS gre pri virtualnem reševanju za teoretično računalniško (*in silico*) iskanje in izbor omejenega števila kandidatnih molekul za testiranje. Virtualnega reševanja se lahko lotimo na več načinov. Nove spojine lahko iščemo na podlagi kemijske podobnosti z že znanimi inhibitorji ali na osnovi strukture tarčnega proteina in tako imenovanega sidranja (angl. docking). Sidranje je iskanje ujemanja med dvema molekulama – receptorjem in ligandom – z uporabo računalniških algoritmov, ki upoštevajo geometrijo molekul (znano ali predvideno z modeliranjem), nekateri pa tudi energijo predvidene vezave.

Podobnost molekul se lahko preiskuje z dvodimenzionalnimi (2D) ali tridimenzionalnimi (3D) poizvedbami. 2D poizvedbe navadno temeljijo na primerjavi substruktur ali tako imenovanih molekularnih prstnih odtisov – to so predstavitve strukture in lastnosti molekul v obliki binarnih nizov. 3D poizvedbe pa vključujejo ujemanje volumna oziroma površine in primerjavo farmakoforov (Mason in sod., 2001). Farmakofor predstavlja prostorska razporeditev kemijskih skupin oziroma delov molekule, ki so pomembni za njeno aktivnost. Pogosto se uporabljajo tudi QSAR (iz angl. quantitative structure-activity relationship) analize (Esposito in sod., 2004). To so metode, ki s kvantitativnimi izrazi povežejo strukturne značilnosti molekule z njeno aktivnostjo.

Primer uporabe virtualnega reševanja za iskanje novih inhibitorjev katepsina B predstavlja študija, ki so jo izvedli Schenker in sod. (2008). S strategijo sidranja so želeli poiskati inhibitor, ki se ne bi vezal na aktivno mesto katepsina B, pač pa na zaporno zanko. Reševanje so izvedli s 47878 spojinami. Našli so 40 kandidatnih spojin. 29 so jih testirali. Ena od teh spojin, DOFA, se je izkazala kot dejanski inhibitor.

2.3 IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV

Za različne namene, bodisi industrijske, diagnostične, terapevtske ali raziskovalne, navadno potrebujemo večjo količino proteina. V naravnih virih so proteini običajno prisotni v nizkih koncentracijah, zato je njihova izolacija zahtevna in zamudna. Pogosto jih ni možno izolirati v dovolj veliki količini. V primeru živalskih in še posebej človeških proteinov se srečamo še z etičnimi zadržki, poleg tega pa obstaja tudi nevarnost okužb in

prenosa bolezni. Težava pri izolaciji encimov iz naravnih virov je tudi prisotnost drugih encimov v sledovih, ki se jih ne da odstraniti, težko jih zaznamo, zelo pa lahko motijo raziskave. Zato pogosto uporabimo heterologne sisteme za izražanje, kadar potrebujemo večje količine določenega proteina.

Predpogoj je poznan genski zapis želenega proteina, katerega skloniramo v vektor za izražanje, tega pa vnesemo v gostiteljsko celico, ki nato proizvede naš protein. Sistemi za izražanje so zasnovani tako, da je izražanje vnesenega zaporedja zelo močno. V nekaterih primerih celice posvetijo večino metabolizma izdelavi rekombinantnega proteina. Ta lahko predstavlja znaten delež med vsemi celičnimi proteini. Ostane nam le izolacija, ki pa je tudi olajšana, prvič zaradi višje vsebnosti proteina ter zaradi dobro poznane "okolja". Poleg tega predstavlja pomembno prednost dejstvo, da je rekombinantni protein proizveden v kontroliranih, sterilnih pogojih. Žal pa ni izražanje vsakega proteina enako uspešno. Pomagamo si lahko z izbiro različnih sistemov izražanja z različnimi gostiteljskimi celicami ter z optimizacijo pogojev.

Na razpolago imamo različne prokariontske in evkariontske sisteme. Med prokariontskimi najpogosteje uporabimo bakterijo *Escherichia coli*, med evkariontskimi pa prevladujejo kvasovke in nitaste glive na področju industrijskih rekombinantnih encimov, za produkcijo zahtevnejših terapevtskih proteinov pa se v glavnem uporabljajo sesalske celice. Vsak sistem ima svoje prednosti in slabosti, ki jih moramo pretehtati in izbrati najustrežnejšega. Pri izbiri sistema za izražanje se odločamo glede na lastnosti, namen uporabe ter želeno količino proteina, ki ga pripravljamo, ekonomsko smiselnost, v primeru uporabe v prehrani ali v terapevtske namene pa tudi glede na regulativo.

2.3.1 *Escherichia coli* kot sistem za izražanje heterolognih proteinov

Po Gramu negativna bakterija *Escherichia coli* je eden najpogosteje uporabljenih organizmov za proizvodnjo rekombinantnih proteinov. Privlačna je zaradi izjemno hitre rasti – podvoji se v dvajsetih minutah, zmožnosti rasti v veliki gostoti ter na enostavnih cenelih gojiščih, zelo dobre genske proučenosti – predstavlja tudi modelni organizem – ter preproste genske manipulacije. Ima pa tudi svoje slabosti, kot so nezmožnost posttranslacijskih modifikacij, kot je glikozilacija, tvorba netopnih agregatov nepravilno zviti proteinov, tako imenovanih inkluzijskih teles, in prisotnost pirogenov.

Kot vektorji se uporabljajo plazmidi za izražanje. Obstaja mnogo različnih komercialno dostopnih plazmidov. Vsi vsebujejo zaporedje ori, ki je potrebno za podvajanje plazmida med razmnoževanjem bakterij. Nosijo tudi zapis za rezistenco proti določenemu antibiotiku, kar omogoča selekcijo bakterij, ki vsebujejo plazmid po transformaciji in skozi generacije med gojenjem bakterij. Imajo multiplo mesto za kloniranje (MCS, iz angl.

multiple cloning site) oziroma polilinker, to je zaporedje, v katerem so zgoščena prepoznavna mesta več restrikcijskih encimov. Tja vstavimo želeno zaporedje. Pred MCS se nahaja promotor. To je regulatorna regija, ki je bistvenega pomena za transkripcijo, ker jo RNA polimeraza prepozna in se nanjo veže. Različni plazmidi imajo različne promotorje. Pomembno je, da je močan, kar pomeni, da se RNA polimeraza veže nanj z veliko afiniteto, zato je prepisovanje vstavljenega zapisa za želeni protein zelo intenzivno, ter da ga lahko čim bolj kontroliramo.

2.3.2 Izražanje rekombinantnega katepsina B

Katepsin B je možno izolirati iz različnih sesalskih tkiv, kot so jetra, vranica, ledvica in drugi, vendar pa je na tak način težko pridobiti dovolj encima za različne študije. Zato je smiselna priprava rekombinantnega katepsina.

Doslej so poskusili pripraviti rekombinantni katepsin B v bakteriji *Escherichia coli*, v kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*, v sesalskih ter v insektnih celicah.

2.3.2.1 Bakterija *Escherichia coli*

Prvi poskusi, ki segajo v leto 1988, so bili narejeni z *E. coli*. Le-ta nima sistema glikozilacije proteinov, vendar pa je neglikoziliran katepsin B funkcionalno enakovreden naravnemu, iz jeter izoliranemu, glikoziliranemu encimu (Hasnain in sod., 1992). Mort in sod. (1988) so prvi uspeli izraziti podganji prokatepsin B ter mišji preprokatepsin B v *E. coli*, vendar pa niso bili uspešni pri njuni aktivaciji. Opazili so toksični učinek preprokatepsina na bakterijske celice, saj se je rast celic ob indukciji izražanja preprokatepsina ustavila. Zaradi podobnost mišjega in podganjega zaporedja prokatepsina B, so ta učinek pripisali signalnemu prepeptidu.

Istega leta sta Chan in Fong (1988) objavila svoj poskus izrazitve človeškega katepsina B v *E. coli*. cDNA zrelega encima brez proregije sta vstavila v vektor pET3 in transformirala bakterijska seva BL21(DE3) ter BL21(DE3)pLysS. pET so pogosto uporabljeni plazmidi za izražanje, v katerih je vneseno zaporedje kontrolirano z močnim bakteriofagnim promotorjem T7, ki pa ga bakterijska RNA polimeraza ne prepozna. Za prepisovanje vstavljenega zaporedja je potrebna bakteriofagna T7 RNA polimeraza, zato se lahko izraža samo v ustreznem gostiteljskem sevu, ki ima zapis za to polimerazo. Izražanje je bilo uspešno, vendar pa tako pridobljeni encim ni kazal aktivnosti. Ugotovila sta tudi, da izražanje v sevu BL21(DE3) ni bilo stabilno.

Oba uporabljena seva imata v svojem kromosomu vključen profag λ DE3. Ta nosi zapis za T7 RNA polimerazo, kontroliran s promotorjem *lacUV5*, ki ga prepozna bakterijska RNA

polimeraza in je inducibilen z IPTG. Prepisovanje T7 RNA polimeraze v manjši meri poteka že pred indukcijo z IPTG. Sev BL21(DE3)pLysS dodatno vsebuje še plazmid pLysS, ki nosi zapis za lizocim T7 in odpornost proti antibiotiku kloramfenikolu. Lizocim T7 je naravni inhibitor T7 RNA polimeraze. Transkripcija gena, kontroliranega s T7 promotorjem, je tako skoraj popolnoma zavirana, dokler ne dodamo IPTG. Ta povzroči čezmerno izražanje T7 RNA polimeraze in transkripcija steče. Pri sevu BL21(DE3)pLysS imamo zato v primerjavi s sevom brez pLysS večji nadzor nad izražanjem vstavljenega zaporedja. To je zelo pomembno, kadar imamo opravka z zaporedjem, katerega proteinski produkt je toksičen za celice in njegova prisotnost zavira rast celic ali jih celo ubije. Omogočeno je, da bakterije najprej namnožimo do ustrezne gostote in šele nato sprožimo izražanje vstavljenega zaporedja.

Kasneje so razvili postopek za pripravo katalitično aktivnega katepsina B iz prokatepsina, ki se je v *E. coli* akumuliral v obliki inkluzijskih telesc (Kuhelj in sod., 1996). V vektor pET3a so sklonirali cDNA človeškega prokatepsina brez končne regije, ki kodira C-terminalni heksapeptidni podaljšek, ki v zrelem katepsinu B ni prisoten. Prokatepsin so izrazili v sevu BL21(DE3)pLysS. Inkluzijska telesa so izolirali in očistili, nato pa so jih raztopili v raztopini močnega denaturanta. Denaturirani prokatepsin so uspeli renaturirati. Proučili so različne dejavnike, ki vplivajo na renaturacijo prokatepsina B. Renaturiran proencim so izpostavili procesiranju s pepsinom. Zrel encim so očistili z ionsko izmenjevalno kromatografijo.

2.3.2.2 Kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*

Tudi kvasovke lahko kot *E. coli* rastejo na enostavnem gojišču do velikih gostot celic. Rastejo sicer počasneje kot bakterije, vendar hitreje kot sesalske celice, in nimajo endotoksinov. Prednost predstavlja tudi možnost izločanja rekombinantnega proteina v gojišče. Slednje lahko dosežemo s fuzijo tarčnega zaporedja s signalno sekvenco zaporedja za α -faktor, kar je v ZDA zaščiteno s patentom (Singh, 2007). Pri kvasovkah posttranslacijske modifikacije proteinov potečejo, vendar pa se vzorec glikozilacije razlikuje od tistega v sesalskih celicah, kar je lahko problematično s stališča aktivnosti proteina in imunogenosti v primeru terapevtske uporabe. *S. cerevisiae* se zaradi dolge zgodovine uporabe v živilski industriji smatra kot varna, zato je še posebej sprejemljiva za proizvodnjo farmacevtskih rekombinantnih proteinov. Izražanje v *S. cerevisiae* je pogosto omejeno z nizkimi izkoristki, medtem ko je metilotrofna kvasovka *P. pastoris* znana po višjih izkoristkih.

Več skupin je pripravilo katepsin B v *Saccharomyces cerevisiae* (Lee in sod., 1990; Hasnain in sod., 1992; Rowan in sod., 1992; Mach in sod., 1993, 1994). cDNA podganjega oziroma človeškega prokatepsina so izrazili kot fuzijski protein z α -faktorjem, s čimer so

dosegli izločanje encima v gojišče. Dobljeni encim je bil heterogeno glikoziliran, kar je zmanjšalo njegovo aktivnost (Hasnain in sod., 1992). S pripravo mutirane oblike z zamenjavo serina na mestu 115 z alaninom (Ser¹¹⁵-Ala) so izločili glikozilacijsko mesto in se tako izognili glikozilaciji. Mutirani katepsin B je bil funkcionalno enakovreden katepsinu, izoliranemu iz podganjih jeter (Hasnain in sod., 1992). Podobno je tudi z izražanjem v kvasovki *Pichia pastoris* (Sivaraman in sod., 1996).

2.3.2.3 Sesalske celice

Sesalske celice rastejo počasneje od bakterijskih in kvasnih, potrebujejo zahtevnejša in zato dražja gojišča, tehnike genske manipulacije so zahtevnejše, vendar pa lahko predstavljajo edini primeren sistem za izražanje proteinov, ki za svojo aktivnost nujno potrebujejo ustrezne posttranslacijske modifikacije ali jih v drugih sistemih ne moremo uspešno izraziti.

V sesalskih celicah so z virusom vakcinije izrazili človeški prokatepsin B (Ren in sod., 1996). Uporabili so celice HeLa. To je linija človeških rakavih celic materničnega vratu. Celice so istočasno inficirali z rekombinantnim virusom vakcinije, ki je nosil cDNA človeškega preprokatepsina B pod kontrolo promotorja T7, ter rekombinantnim virusom vakcinije z zapisom za bakteriofagno T7 RNA polimerazo. Prokatepsin B so izolirali iz skoncentriranega gojišča z imunoafinitetno kromatografijo.

2.3.2.4 Insektne celice

V insektnih celicah izražamo heterologe proteine z uporabo bakulovirusa. Genom bakulovirusa je velik, zato je možen vnos večjih fragmentov DNA. V insektnih celicah potekajo vse posttranslacijske modifikacije kot pri višjih organizmih, vendar se lahko glikozilacijski profil razlikuje.

Insektne celice Sf9 so okužili z bakulovirusom z zapisom za človeški preprokatepsin B in jih gojili 96 do 120 ur. Katepsin B so očistili s kationsko izmenjevalno ter afinitetno kromatografijo. Tako pripravljen encim ni bil glikoziliran. (Steed in sod., 1998)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL IN NAPRAVE

3.1.1 Reagenti

	Proizvajalec
Abz-GIVRAK(Dnp)-OH	Bachem
Akrilamid/bis-akrilamid, 40 %	Sigma, Sigma-Aldrich
Amonijev persulfat	Fluka, Sigma-Aldrich
Ampicilin, natrijeva sol	Fluka, Sigma-Aldrich
Bromfenol modro	Fluka
L-cistein	Aldrich, Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue	Fluka
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Thermo Scientific
DAB	Sigma, Sigma-Aldrich
Dimetil sulfoksid, brezvodni	Sigma-Aldrich
D,L-ditiotreitol	Fluka, Sigma-Aldrich
E-64	Sigma
EDTA-dinatrijeva	Serva
Etanol, absolutni	Carlo Erba Reagenti
Glicerol, brezvodni	Fluka, Sigma-Aldrich
Glicin	Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich
Goveji serumski albumin	Sigma, Sigma-Aldrich
Izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG)	Promega
Kloramfenikol	Sigma, Sigma-Aldrich
Klorovodikova kislina, 37 % (HCl)	Carlo Erba Reagenti
Kunčja poliklonska protitelesa proti katepsinu B	Krka, d.d.
LB Broth Base (Lennox L Broth Base)	Invitrogen
Metanol	Carlo Erba Reagenti
Mleko v prahu	Pomurske mlekarne
Natrijev acetat, brezvodni	Merck
Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Fluka
Natrijev dodecil sulfat (NaDS)	Fluka, Sigma-Aldrich
Dinatrijev hidrogen fosfat, brezvodni (Na_2HPO_4)	Fluka
Natrijev hidroksid (NaOH)	Carlo Erba Reagenti
Natrijev klorid (NaCl)	Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich
Nizkomolekularne sintezne spojine (priloga A):	
spojine 1–12	Asinex
spojine 13–22	ChemBridge Corporation
Ocetna kislina, 100 %	Merck

Ovčja proti-kunčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Dianova
Pepsin	Sigma
Polietilen glikol 4000	Serva
Rekombinantni katepsin B	Institut "Jožef Stefan"
Saharoza	Sigma
SeeBlue [®] Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma, Sigma-Aldrich
Tris(hidroksimetil)-aminometan	Serva
Triton X-100	Serva
Tween	Sigma, Sigma-Aldrich
Urea	Merck
Vodikov peroksid, 30 % (H ₂ O ₂)	Belinka
Z-Arg-Arg-AMC	Calbiochem

3.1.2 Naprave in druga oprema

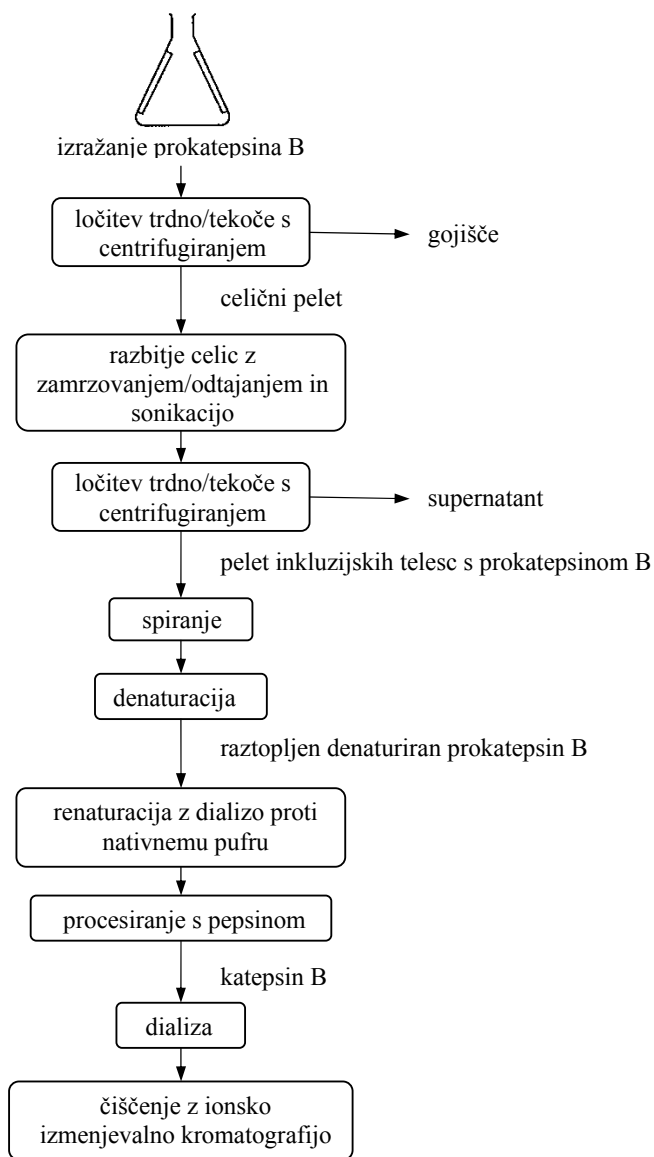
Analitska tehnica	Proizvajalec, model
Aparatura za prenos western	Mettler Toledo, AB104
Aparat za fotografiranje gelov	Biometra, Fast-Blot B 34
Avtoklav	Uvitec
Brezprašna komora	Systec, 2540EL
Centrifuge	Iskra PIO, LFVP 12
	DuPont, Sorvall RC 5C Plus
	Eppendorf, 5804 R
	Eppendorf, 5415 R
	Tecan, Safire ²
Čitalec mikrotitrskih plošč	Serva, Servapor 12000–14000 Da
Dializno črevo	UniEquip, Unihood 650
Inkubator	Bio Rad, Mini-PROTEAN 3 Cell
Kadička za NaDS-PAGE	Healthcare
Kromatografska kolona SP Sepharose Fast Flow	Tehtnica, Rotamix 550 MMH
Magnetno mešalo	Amicon, YM 10
Membrana za ultrafiltracijo	nunc, Thermo Fischer Scientific
Mikrotitrške plošče za merjenje fluorescence	TPP Techno Plastic Products AG
Mikrotitrške plošče z ravnim dnom	Amicon
Naprava za ultrafiltracijo	Cole-Parmer Ultrasonic Processor
Sonikator	NanoDrop, ND-1000
Spektrofotometer	Tehtnica, Vibromix 403 EVT
Stresalnik	WTB binder
Tehtnica	Tehtnica, EXACTA 610 EB

3.1.3 Organizem

Ekspresijski sev: *Escherichia coli*, sev BL21(DE3)pLysS, transformiran s plazmidom pET-3a z vstavljenjo cDNA človeškega prokatepsina B

Kontrolni sev: *Escherichia coli*, sev BL21(DE3)pLysS, transformiran s praznim plazmidom pET-3a

3.2 PRIPRAVA KATEPSINA B



Slika 3: Hodogram priprave rekombinantnega katepsina B

Pri pripravi katepsina B smo se z nekaj odstopanji držali postopka, ki so ga opisali Kuhelj in sod. (1995).

3.2.1 Izražanje prokatepsina B

Gojišče Luria-Bertani (LB) (dvakrat po 500 ml) z dodanim ampicilinom (100 µg/ml) in kloramfenikolom (25 µg/ml) smo inokulirali s 5 ml prekončne kulture ekspresijskega seva bakterije *E. coli* z zapisom za človeški prokatepsin B. Kot kontrolo smo 200 ml enakega gojišča inokulirali z 2 ml kontrolnega seva. Kontrolni sev je bil enak ekspresijskemu sevu, le da je bil transformiran s praznim ekspresijskim vektorjem. Po približno treh urah inkubacije pri 37° C in stresanju 200 rpm, ko je optična gostota kulture pri 600 nm (OD_{600}) dosegla vrednost 0,6–1, smo inducirali izražanje prokatepsina B z dodatkom izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) v končni koncentraciji 0,4 mM in inkubirali kulturo pri enakih pogojih še nadaljnje 3 ure. Nato smo s centrifugiranjem (10 min pri 6000 g in 4° C) ločili celice od gojišča. Vsa nadaljnja centrifugiranja smo izvedli pri enakih pogojih. Supernatant smo zavrgli, celični pelet pa ponovno suspendirali v 10 ml 50 mM pufru Tris (pH 8,0) s 5 mM etilendiamintetraocetno kislino (EDTA) in 5 % saharoze. Suspenzijo smo zamrznili na – 80° C.

3.2.2 Izolacija inkluzijskih telesc s prokatepsinom B

Celično suspenzijo smo dvakrat zamrznili in odtajali ter jo izpostavili ultrazvoku. Uporabili smo Cole-Parmer Ultrasonic Processor. Sonicirali smo 3 min 30 s z nastavitvami: pulz 5 s in premor 9,9 s. Nato smo vzorec centrifugirali 10 min pri 6000 g in 4° C. Supernatant smo zavrgli. Pelet z inkluzijskimi telesi smo sprali z 10 ml 50 mM Tris (pH 8,0), 5 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 in še dvakrat z 10 ml 50 mM Tris (pH 8,0), 5 mM EDTA, 2 M urea. Po vsakem spiranju smo suspenzijo centrifugirali pri enakih, zgoraj navedenih pogojih. Sledilo je ponovno suspendiranje peleta v 10 mL sterilne dH₂O in centrifugiranje, nato pa ponovno suspendiranje peleta v 10 ml 8 M uree z 0,1 M Tris (pH 8,0) in 10 mM ditiotreitolom (DTT) pri 37° C in močnem stresanju za 1 h, pri čemer so se inkluzijska telesa raztopila – prokatepsin se je denaturiral in reduciral.

3.2.3 Renaturacija prokatepsina B

Denaturiran prokatepsin B smo z 8 M ureo, 0,1 M Tris (pH 8,0), 5 mM EDTA razredčili do koncentracije 30 µg/ml. Po 50 ml razredčenega prokatepsina B smo dializirali proti 2 l 0,1 M Na-fosfata (pH 7) s 5 mM EDTA in 5 mM cisteinom dvakrat po približno 4 h, tretjo dializo pa smo pustili čez noč. Sledila je dializa proti 2 l enakega pufru, vendar brez cisteina, za 2 h. Vse dialize (tudi nadaljnje) smo izvedli v hladilniku pri približno 4° C.

3.2.4 Procesiranje in aktivacija

Po dializi smo raztopino prokatepsina B centrifugirali 10 min pri 6000 g, da smo odstranili oborjeni protein. Supernatant smo prelili v stekleno čašo in s HCl uravnali pH na 3,5. Dodali smo pepsin v molarnem razmerju pepsin:prokatepsin B 1:100 in pustili reakcijo potekati 4 ure pri 37° C z rahlim mešanjem. Ob koncu smo zopet odstranili oborjeni protein s centrifugiranjem (10 min pri 6000 g) ter z 10 M NaOH povišali pH na 6,0. Nato smo raztopino trikrat dializirali proti 2 l 20 mM Na-acetata, pH 4,5, in sicer prvič približno 4 h, drugič preko noči in zadnjič 2–3 h.

3.2.5 Čiščenje katepsina B z ionsko izmenjevalno kromatografijo

Uporabili smo ionsko izmenjevalno kromatografijo s kationskim izmenjevalcem SP Sepharose Fast Flow, uravnoteženo z 20 mM Na-acetatom (pH 4,5). Po nanosu vzorca smo kolono sprali z enakim puffrom (trikratni volumen kolone), da je vrednost absorbance pri 280 nm (A_{280}) padla pod 0,1. Nato smo izprali vezani protein z 0,5 M NaCl v Na-acetatnem puffru. Zbirali smo frakcije po 5 ml. Prisotnost proteinov v frakcijah smo določali spektrofotometrično z merjenjem A_{280} . V frakcijah, kjer smo zaznali proteine, smo preverili prisotnost katepsina B po spodaj opisani metodi. Katepsin B vsebujoče frakcije smo združili in skoncentrirali z ultrafiltracijo.

3.3 DETEKCIJA KATEPSINA B

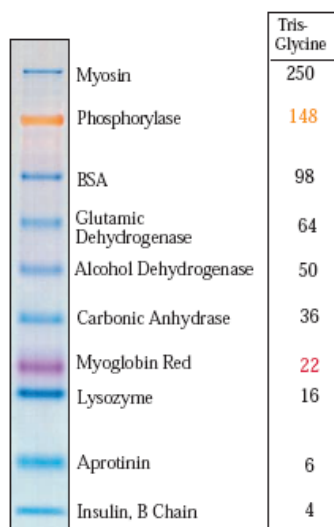
3.3.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE)

Za nanos na gel smo po 10 μ l vzorca zmešali s 5,3 μ l nanašalnega pufru (sestava v preglednici 1) in 2,7 μ l 1 M DTT ter ga 10 minut inkubirali pri 100° C.

V primeru vzorcev bakterijskih celic, ki smo jih pridobili med izražanjem prokatepsina B, in sicer pred indukcijo z IPTG ter ob zaključku izražanja, smo po 5 ml vzorca centrifugirali 10 min pri 6000 g in pelet suspendirali v 1 ml pufru s sestavo 50 mM Tris (pH 8,0), 5 mM EDTA in 0,1 % Triton X-100. Suspenzije smo trikrat zamrznili in odtajali, nato pa sonicirali 3 min 30 s z nastavitvami pulz 5 s in premor 9,9 s. Nato smo vsakega razdelili na dva alikvota. Eden je predstavljal celotni celični lizat, drugega pa smo še centrifugirali pri zgoraj navedenih pogojih. Supernatant je predstavljal topno fazo celičnega lizata. 10 μ l lizata smo nato dodali nanašalni pufer in DTT ter ga prekuhali enako kot ostale vzorce.

Kot označevalec velikosti smo uporabili 3 μ l SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen; slika 4).

Elektroforeze smo izvedli na 15 % poliakrilamidnem gelu (sestava v preglednici 2) pri napetosti 100 V. Gele smo barvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue ali pa smo naredili prenos western ter imunski odtis.



Slika 4: Približne molekulske mase proteinskih lis označevalca velikosti SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)

Preglednica 1: Sestava elektroforeznega in nanašalnega pufru

10-kratni elektroforezni pufer	Nanašalni pufer
29,0 g Tris baza	2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
144,0 g glicin	2,0 ml glicerol
10 g NaDS	4,0 ml 10 % NaDS
dH ₂ O do 1 l	0,5 ml 0,1 % bromfenol modro
pH = 8,3	1,0 ml dH ₂ O

Preglednica 2: Sestavine za pripravo poliakrilamidnega elektroforeznega gela

Reagent	Količina za 15 % separacijski gel	Količina za 5 % koncentracijski gel
40 % akrilamid/bis-akrilamid	1,5 ml	188 µl
1,5 M Tris (pH 8,8)	1 ml	195 µl
Destilirana voda (dH ₂ O)	1,4 ml	1 ml
10 % NaDS	50 µl	15 µl
10 % amonijev persulfat	50 µl	15 µl
TEMED	1,7 µl	1,5 µl

3.3.1.1 Barvanje proteinov z barvilom Coomassie Brilliant Blue

Gele smo barvali ob rahlem stresanju v raztopini barvila približno eno uro, nato pa razbarvali ob rahlem stresanju v raztopini za razbarvanje približno uro in pol oziroma dokler se ni gel zadostno razbarval.

Preglednica 3: Priprava založne raztopine barvila in raztopine za razbarvanje

Barvilo	Raztopina za razbarvanje
5 ml očetne kisline	60 ml absolutnega etanola
0,5 g Coomassie Brilliant Blue	20 ml očetne kisline
200 ml metanola	dH ₂ O do 200 ml
dH ₂ O do 500 ml	

3.3.2 Prenos western in vezava protiteles

Izvedli smo polsuhi prenos razvitih proteinov iz elektroforeznega gela na nitrocelulozno membrano pri 60 mA. Uporabili smo pufer za prenos (pH 8,3) s sestavo 25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % metanol. Prenos je potekal 2 uri.

Vezavo protiteles in detekcijo smo izvedli po naslednjem postopku:

- Inkubacija membrane 1 uro v 5 % mleku v PBS. Ta in vse nadaljnje inkubacije ter spiranja so bili izvedeni ob rahlem stresanju na sobni temperaturi.
- Spiranje trikrat 10 minut v PBS z 0,05 % Tween (PBST).
- Inkubacija 1 uro v 5 ml raztopine primarnih protiteles s koncentracijo 10 µg/ml (kunčja poliklonska protitelesa proti katepsinu B) v PBST.
- Spiranje trikrat 10 minut v PBST.
- Inkubacija 45 min v 5 ml sekundarnih protiteles (ovčja proti-kunčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo), redčena 1:1000 v PBST.
- Spiranje trikrat 15 minut v PBST.
- Detekcija z 0,05 % substratom DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid) v 20 ml 50 mM Tris (pH 7,5) z 0,015 % H₂O₂ do razvitja lis.

3.4 DOLOČITEV KONCENTRACIJE IN AKTIVNEGA DELEŽA KATEPSINA B

3.4.1 Spektrofotometrična metoda

Koncentracijo prokatepsina in katepsina B smo določali z merjenjem absorbance pri 280 nm (A_{280}) z NanoDrop spektrofotometrom z upoštevanjem vrednosti ekstinkcijskega koeficienta $\epsilon_{280}^{1\%}$ 20 L/gcm za prokatepsin B oziroma 18 L/gcm za katepsin B.

3.4.2 Metoda po Bradfordu

Umeritveno krivuljo smo pripravili z redčitveno lestvico govejega serumskega albumina (BSA) v vodi. V luknjice mikrotitrne ploščice z ravnim dnom smo nanegli po 10 μ l vzorca oziroma BSA v dveh ponovitvah, nato pa smo z multikanalno pipeto dodali po 200 μ l reagenta Coomassie Plus Protein Assay Reagent. Po 15 do 20 minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo izmerili A_{280} s čitalcem Tecan ter iz zveze odvisnosti absorbance od koncentracije BSA določili koncentracijo katepsina B v vzorcu.

3.4.3 Titracija katepsina B

Na mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami smo v posamezne luknjice nanegli 40 μ l 100 nM katepsina B v aktivacijskem pufru za katepsin B. Pri redčenju katepsina smo kot izhodno koncentracijo upoštevali spektrofotometrično določeno koncentracijo. Kot negativno kontrolo smo nanegli 40 μ l aktivacijskega pufra brez encima. Po 5 minutni inkubaciji pri 37° C smo v luknjice dodali po 10 μ l inhibitorja E-64 v naraščajočih koncentracijah od 0–120 nM v osnovnem pufru za katepsin B. Po 20 minutni inkubaciji na 30° C smo z multikanalno pipeto dodali še po 50 μ l 10 μ M substrata Z-Arg-Arg-AMC, redčenega z osnovnim pufrom. Nato smo takoj začeli meriti sproščanje produkta. S čitalcem Tecan smo pri 30° C kontinuirno merili fluorescenco pri 460 nm. Valovna dolžina ekscitacije je bila 380 nm. S pridobljenimi podatki smo določili začetno hitrost reakcije kot spremembo relativne enote fluorescence (RFU) na enoto časa v začetnem linearnem delu reakcij in izrisali diagram odvisnosti začetne hitrosti od razmerja med molarno koncentracijo inhibitorja ter molarno koncentracijo encima ($[I]/[E]$). Z ekstrapolacijo dobljene premice smo določili njeno sečišče z abscisno osjo, ki predstavlja delež aktivnega encima v vzorcu, saj naj bi bila začetna hitrost enaka 0, kadar je molarno razmerje inhibitorja in encima v sistemu enako 1.

3.5 PUFRI ZA MERJENJE ENCIMSKE KINETIKE KATEPSINA B

Osnovni pufer za titracijo katepsina B in testiranje inhibicije endopeptidazne aktivnosti

0,4 M fosfatni pufer
0,1 % politetilen glikol (PEG)
pH = 6,8

Aktivacijski pufer za katepsin B

Vedno smo pripravili svež aktivacijski pufer iz osnovnega pufra, kateremu smo dodali:
1,5 mM EDTA

5 mM DTT (za titracijo katepsina B) oziroma 5 mM cistein (za testiranje inhibicije)
0,01 % Triton-X 100

3.6 REŠETANJE NIZKOMOLEKULARNIH SPOJIN

Testirali smo 22 komercialno dostopnih molekul (priloga) za morebitno sposobnost inhibicije endo- in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B. Obe testiranji smo izvedli v najmanj 6 ponovitvah za vsako posamezno testno spojino (v nadaljevanju uporabljam izraz inhibitor). Tiste, ki so kazali odstopanje od kontrolnega poskusa brez inhibitorja, smo testirali večkrat.

Testiranje smo izvedli na mikrotitrskih ploščicah s 96 luknjicami za merjenje fluorescence. V posamezne luknjice smo odpipetirali 5 μ l substrata, 5 μ l inhibitorja in 90 μ l katepsina B, ki smo ga predhodno 5 minut inkubirali v aktivacijskem pufru na 37° C. Substrat smo redčili z osnovnim pufrom, inhibitor z dimetilsulfoksidom (DMSO), encim pa z aktivacijskim pufrom. Na vsaki ploščici smo naredili tudi več meritev aktivnosti katepsina B v odsotnosti inhibitorja (pozitivna kontrola). V tem primeru smo namesto inhibitorja dodali DMSO. Vsakokrat smo za vsak posamezni inhibitor in pozitivno kontrolo naredili tudi po dve ponovitvi brez encima (negativna kontrola). Namesto encima smo dodali aktivacijski pufer.

Takoj po dodatku encima smo s čitalcem Tecan začeli kontinuirno meriti fluorescenco. Meritve smo izvedli pri 37° C. Od podatkov posameznih meritev smo odšteli pripadajoče negativne kontrole. V linearnem območju naraščanja RFU smo določili spremembo RFU na enoto časa oziroma začetno hitrost reakcije za vsako ponovitev. Zbrane podatke začetnih hitrosti posameznega inhibitorja smo statistično primerjali z začetnimi hitrostmi pozitivne kontrole.

Odstotek inhibicije smo izračunali po formuli 1, pri čemer v_i predstavlja začetno hitrost reakcije v prisotnosti inhibitorja, v_0 pa začetno hitrost reakcije brez inhibitorja oziroma začetno hitrost reakcije pozitivne kontrole.

$$\text{inhibicija (\%)} = 100 \cdot \frac{v_0 - v_i}{v_0} \quad \dots(1)$$

Testiranji inhibicije endopeptidazne aktivnosti in inhibicije eksopeptidazne aktivnosti sta se med seboj razlikovali v uporabljenih substratih, pufrih, koncentracijah v testnem sistemu ter v valovnih dolžinah, pri katerih smo izvajali meritve.

3.6.1 Testiranje inhibicije endopeptidazne aktivnosti

Inhibicijo endopeptidazne aktivnosti katepsina B smo preizkusili na petih mikrotitrskih ploščah. Na posamezni plošči so bili uporabljeni različni inhibitorji v najmanj 6 luknjicah – ena luknjica je predstavljala eno ponovitev. Isti inhibitor je bil uporabljen na največ treh ploščah in najmanj na eni plošči.

Uporabili smo substrat Z-Arg-Arg-AMC ter enak osnovni pufer kot pri titraciji katepsina B (poglavje 3.5).

Končne koncentracije v testnem sistemu:

- 5 μ M substrat,
- 50 μ M inhibitor,
- 5 nM katepsin B.

Valovna dolžina ekscitacije je bila 380 nm, emisije pa 460 nm.

3.6.2 Testiranje inhibicije eksopeptidazne aktivnosti

Testiranje eksopeptidazne aktivnosti katepsina B smo izvedli na štirih mikrotitrskih ploščah. Tudi v tem primeru so bili na posamezni plošči uporabljeni različni inhibitorji, ponovitev znotraj plošč pa je bilo tokrat za določene inhibitorje manjše (v najmanj 2 luknjicah). Isti inhibitor je bil uporabljen na največ treh ploščah in najmanj na dveh ploščah.

Uporabili smo substrat Abz-GIVRAK(Dnp)-OH, ki smo ga redčili z osnovnim pufrom s sledečo sestavo:

- 60 mM Na-acetat,
- 0,1 % PEG 4000,
- pH = 5,0.

Aktivacijski pufer smo pripravili iz zgoraj opisanega osnovnega pufra.

Končne koncentracije v testnem sistemu:

- 1 μ M substrat,
- 50 μ M inhibitor,
- 0,5 nM encim.

Fluorescenco smo merili pri 420 nm, medtem ko je bila valovna dolžina ekscitacije 320 nm.

3.6.3 Statistična analiza

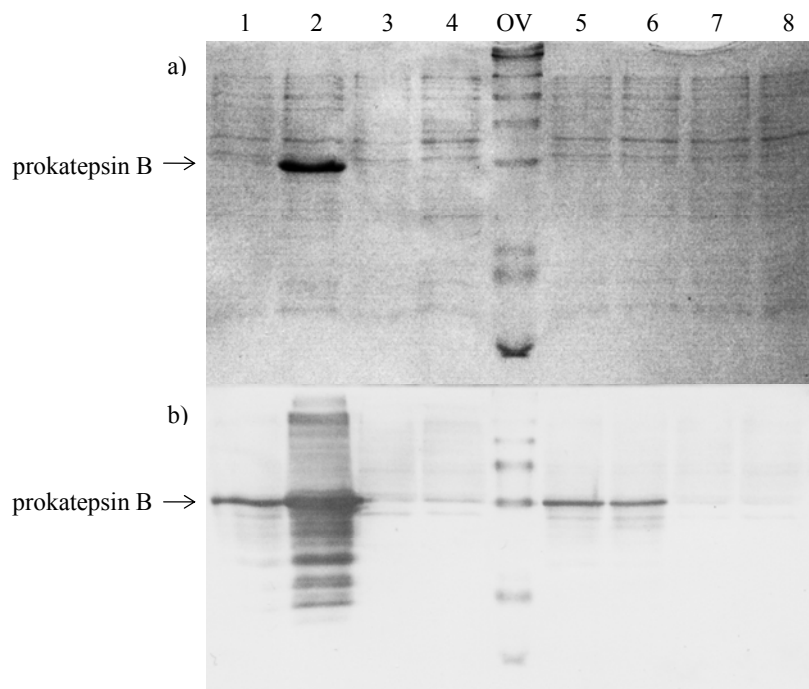
Z analizo variance mešanega linearnega modela smo preverili ničelno domnevo o enakosti povprečne začetne hitrosti reakcije oziroma spremembe RFU na enoto časa v prisotnosti 22 nizkomolekularnih spojin in povprečne začetne hitrosti pozitivne kontrole. Za primerjavo posameznih reakcij z inhibitorji s kontrolo smo uporabili mnogotere primerjave vseh obravnavanj s kontrolo s t-testom. Z mešanim linearnim modelom smo ocenili tudi deleže variabilnosti začetne hitrosti, ki pripada razlikam med ploščami in delež, ki pripada razlikam med ponovitvami znotraj plošče (posamezne luknjice). Uporabili smo programski paket R (R Development Core Team, 2010).

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA KATEPSINA B

4.1.1 Izražanje prokatepsina B

Izražanje proobliske katepsina B je bilo uspešno. Iz proteinskih profilov bakterijskih lizatov na sliki 5 je razvidno, da se je prokatepsin B nakopičil v celicah v netopni obliki – v obliki inkluzijskih telesc, zaznali pa smo tudi nekaj topne oblike. Nekaj prokatepsina B se je izrazilo že pred indukcijo z IPTG.



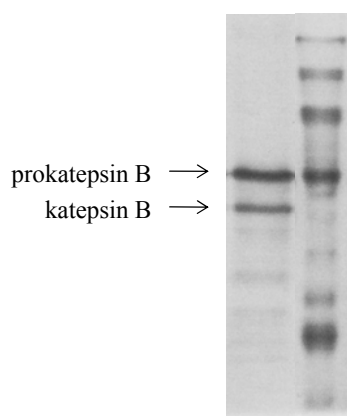
Slika 5: Elektroforezni gel, barvan z barvilom Coomassie Brilliant Blue (a) ter imunski odtis (b) bakterijskih lizatov ekspresijskega in kontrolnega seva pred indukcijo in ob zaključku ekspresije.

- 1 – celotni celični lizat ekspresijskega seva pred indukcijo izražanja z IPTG
- 2 – celotni celični lizat ekspresijskega seva ob koncu izražanja
- 3 – celotni celični lizat kontrolnega seva pred indukcijo izražanja z IPTG
- 4 – celotni celični lizat kontrolnega seva ob koncu izražanja
- OV – označevalec velikosti
- 5 – topna faza celičnega lizata ekspresijskega seva pred indukcijo izražanja z IPTG
- 6 – topna faza celičnega lizata ekspresijskega seva ob koncu izražanja
- 7 – topna faza celičnega lizata kontrolnega seva pred indukcijo z IPTG
- 8 – topna faza celičnega lizata kontrolnega seva ob koncu izražanja

Postopek renaturacije, procesiranja in čiščenja katepsina B smo najprej poskusno izvedli v celoti, pri čemer smo na različnih stopnjah zbirali vzorce, ki smo jih razvili z NaDS-PAGE. Nadaljnje 50 ml alikvote prokatepsina B s koncentracijo 30 $\mu\text{g/ml}$ pa smo po dializiranju proti Na-acetatu shranili na -80°C , potem pa smo jih združili v dve seriji, ki smo ju skoncentrirali z ultrafiltracijo in nanegli na ionsko izmenjevalno kolono.

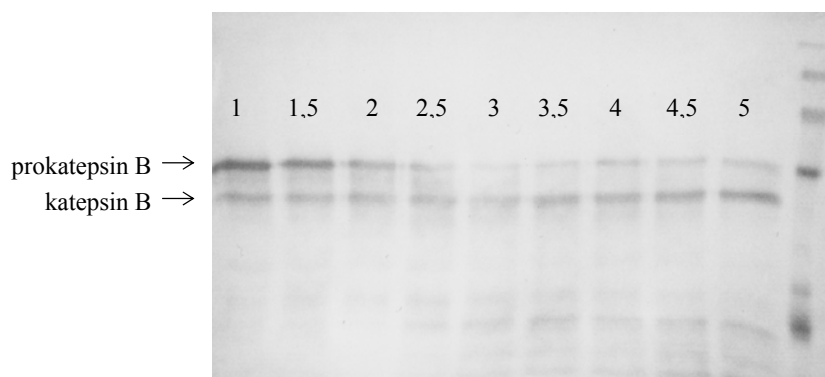
4.1.2 Renaturacija in procesiranje prokatepsina B

Med dializiranjem proti Na-fosfatu se je že začelo avtoprocesiranje prokatepsina B (slika 6).



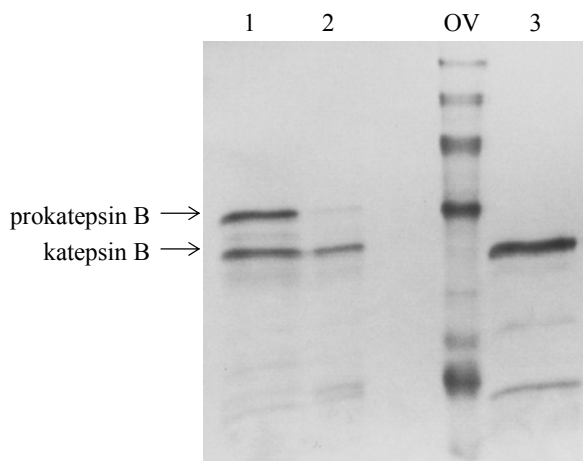
Slika 6: Imunski odtis vzorca pred procesiranjem s pepsinom

Na podlagi poskusa, pri katerem smo med procesiranjem prokatepsina B s pepsinom v polurnih intervalih jemali vzorce ter jih nanegli na NaDS-PAGE, smo se odločili za štiriurno inkubacijo s pepsinom, saj smo vizualno določili (slika 7), da se v tem času pretvori večina proencima, nadaljnja inkubacija pa ne prinaša bistvenih sprememb.



Slika 7: Imunski odtis vzorcev med inkubacijo s pepsinom. Označen je čas inkubacije v urah.

Iz slike 8 je razvidno, da se je procesiranje prokatepsina B nadaljevalo med dializiranjem proti Na-acetatu s pH 4,5.

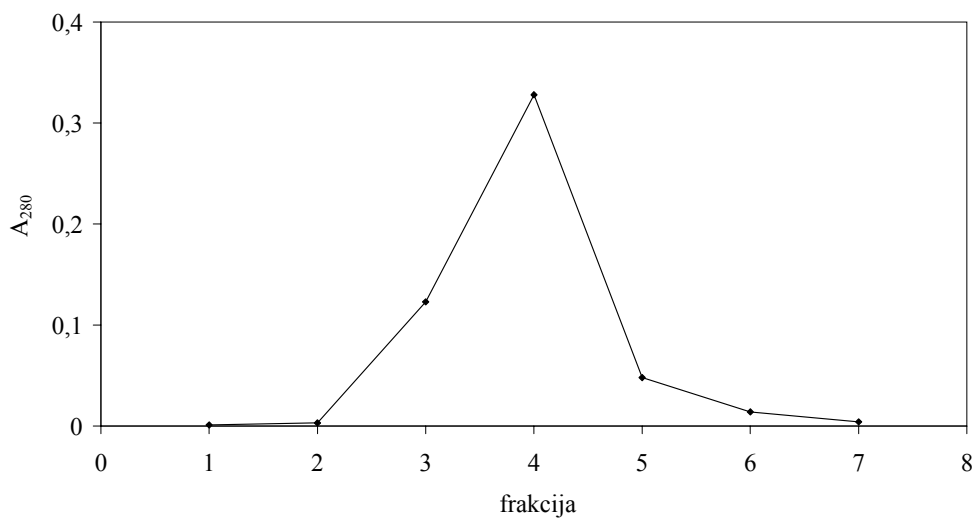


Slika 8: Imunski odtis.

- 1 – po procesiranju s pepsinom
- 2 – po dializiranju z Na-acetatom (pH 4,5)
- OV – označevalec velikosti
- 3 – katepsin B, eluiran z ionsko izmenjevalne kolone (SP Sepharose Fast Flow)

4.1.3 Ionsko izmenjevalna kromatografija

Katepsin B se je eluiral z enim vrhom (slika 9).



Slika 9: Elucijski profil katepsina B

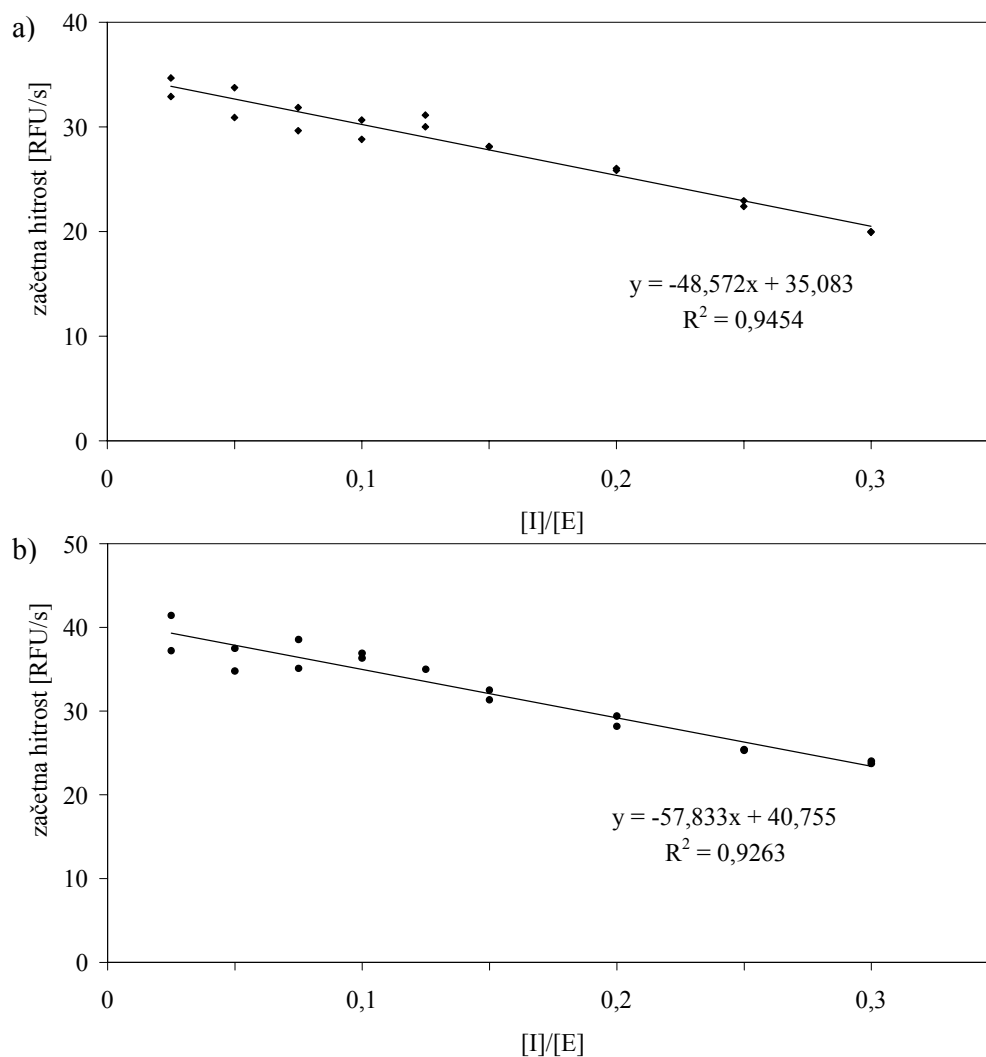
4.1.4 Koncentracija in aktivni delež katepsina B

Z metodo po Bradfordu smo določili višjo koncentracijo katepsina B kot s spektrofotometrično metodo (preglednica 4). Slednja je verjetno točnejša, saj smo upoštevali ekstinkcijski koeficient katepsina B.

Preglednica 4: Koncentracije prokatepsina in katepsina B v mg/ml, določene z dvema metodama

Vzorec	Spektrofotometrična metoda	Metoda po Bradfordu
Denaturiran prokatepsin B	5,86	/
Katepsin B, serija 1	0,15	0,25
Katepsin B, serija 2	0,51	0,78

Ozirajoč se na koncentracijo, ki smo jo določili s spektrofotometrično metodo, smo uspeli izolirati in raztopiti 58,6 mg prokatepsina B, končno pa smo pridobili približno 1,4 mg katepsina B, kar znaša približno 2 % izoliranega prokatepsina. S titracijo smo določili, da je aktivnega približno 72 % katepsina B serije 1 in 70 % katepsina B serije 2 (slika 10).



Slika 10: Titracijski krivulji dveh serij čiščenja katepsina B (a – serija 1, b – serija 2)

4.2 TESTIRANJE INHIBICIJE

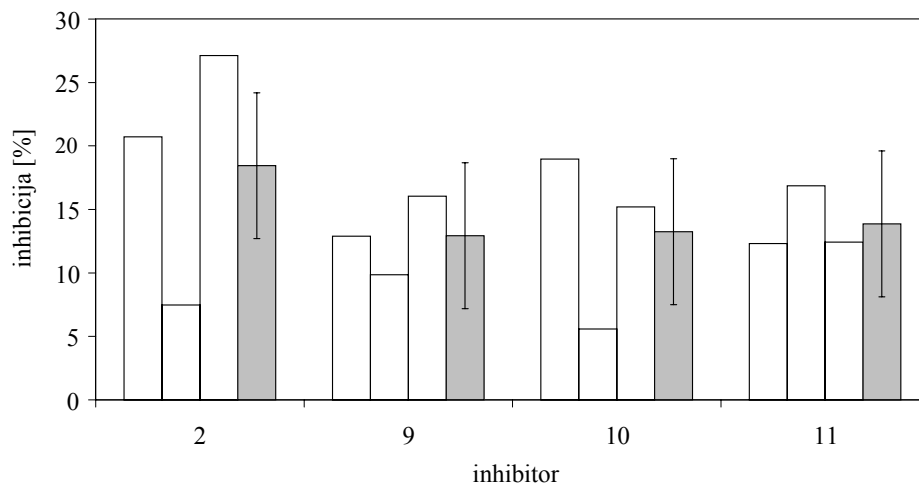
Pri testiranju endopeptidazne inhibicije katepsina B se je pokazalo, da se povprečne začetne hitrosti reakcij z inhibitorji in kontrolnih reakcij med seboj ne razlikujejo statistično značilno ($p = 0,99$). Delež variabilnosti začetne hitrosti, pripadajoč razlikam med ploščami, je bil precej večji od tistega, ki pripada razlikam med ponovitvami znotraj plošče.

Pri testiranju eksopeptidazne aktivnosti rezultati nakazujejo razliko med povprečnimi začetnimi hitrostmi reakcij z inhibitorji oziroma brez inhibitorjev ($p = 0,0649$). Za inhibitorje 2, 9, 10 in 11 smo zabeležili p-vrednosti t-testa, ki so bile nižje ali enake 0,05

(preglednica 5). Inhibicija eksopeptidazne aktivnosti katepsina B teh spojin je bila nižja od 20 % (preglednica 5, slika 11). Tudi v tem primeru je bil delež variabilnosti začetne hitrosti, ki pripada razlikam med ploščami, veliko večji od tistega, ki pripada razlikam med ponovitvami znotraj plošč.

Preglednica 5: Povprečna inhibicija eksopeptidazne aktivnosti katepsina B z 22 nizkomolekularnimi inhibitorji s pripadajočo napako ter p-vrednosti prilagojenega t-testa za primerjavo s kontrolo

Oznaka spojine	Povprečna inhibicija	Standardna napaka	p-vrednost
1	-1,42	6,74	0,8166
2	18,44	5,74	0,0084
3	0,59	6,62	0,5337
4	3,75	6,61	0,2515
5	0,46	5,74	0,8895
6	3,66	6,61	0,1530
7	1,27	5,74	0,4762
8	-2,92	6,61	0,9159
9	12,93	5,74	0,0370
10	13,24	5,75	0,0525
11	13,86	5,74	0,0163
12	3,83	6,62	0,5842
13	6,54	5,74	0,3437
14	4,58	6,62	0,4677
15	-5,60	6,62	0,1804
16	9,59	5,74	0,2897
17	0,82	6,62	0,9411
18	-4,57	6,62	0,2461
19	-1,86	6,62	0,5738
20	5,72	5,74	0,4531
21	-3,49	5,74	0,3270
22	6,66	6,62	0,2422



Slika 11: Primerjava povprečnih inhibicij eksopeptidazne aktivnosti nekaj inhibitorjev ($p \leq 0,05$) na posameznih ploščah (beli stolpci) in skupne povprečne inhibicije s standardno napako (sivi stolpci)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 PRIPRAVA KATEPSINA B

Sistem pET-3a za izražanje proteinov v bakteriji *Escherichia coli* sev BL21(DE3)pLysS je zelo uspešen v smislu dobitka želenega proteina glede na ostale proteine v celici. To se je pokazalo tudi v našem primeru, saj smo lahko iz proteinskega profila bakterijskega lizata (slika 5) razbrali, da se je prokatepsin B po indukciji z IPTG zelo močno izrazil in predstavljal zelo visok delež med vsemi celičnimi proteini. Nekaj se ga je izrazilo že pred indukcijo (slika 5b), kar pa, vsaj na videz, ni oviralo rasti celic, kot se je zgodilo v primeru izražanja s sevom BL21(DE3) (Chan in Fong, 1988). Izražanje je bilo verjetno dovolj nizko. Bakterije so se v predvidenem času namnožile do ustrezne gostote, natančnih meritev rasti pa nismo izvedli.

Žal se prokatepsin B v bakteriji *E. coli* ne zvije pravilno. Posledično se tvorijo agregati, encim se nakopiči v celicah v netopni obliki – v obliki inkluzijskih telesc. To po eni strani sicer olajša njegovo izolacijo, saj se v enem koraku ločitve netopne od topne celične frakcije znebimo večine preostalih proteinov, vendar pa moramo tak protein *in vitro* renaturirati oziroma vzpostaviti ustrezno zvitje, ki je bistveno za delovanje vsakega encima, kar pa prinaša nemalo težav.

V nasprotju s Kuhljem in sod. (1995), ki niso uspeli zaznati topnega prokatepsina B v bakterijah, smo mi z imunskim odtisom odkrili nekaj topnega encima (slika 5b), vendar pa ta ni predstavljal znatnega deleža glede na druge celične proteine, zato se za izolacijo nismo odločili.

Po razbitju celic z zamrzovanjem in odtajanjem ter s sonikacijo, smo s centrifugiranjem izolirali netopna inkluzijska telesca. Sledilo je čiščenje s trikratnim spiranjem peleta v prisotnosti blagega detergenta Triton X-100 in 2 M uree, ki v danih pogojih še ne raztopi inkluzijskih telesc.

Za vzpostavitev ustreznega zvitja nepravilno zvitega proteina moramo le-tega najprej denaturirati, da porušimo njegovo terciarno strukturo. To dosežemo z uporabo denaturantov, kot sta urea ali gvanidinijev klorid. Denaturiran protein nato izpostavimo nativnim pogojem, pri katerih se uspe protein bolj ali manj uspešno zviti v pravilno nativno obliko. V našem primeru smo prokatepsin denaturirali v 8 M urei. Pri tej koncentraciji se inkluzijska telesca uspešno raztopijo in struktura proteina se popolnoma poruši. V denaturacijski raztopini je bil prisoten tudi DTT, ki je reducent in poruši morebitne disulfidne vezi.

Uspešnost renaturacije prokatepsina B je odvisna od različnih dejavnikov, to so koncentracija proteina, pH renaturacijskega puфра, temperatura ter prisotnost reducirajočih in oksidirajočih sredstev. Pri izbiri pogojev smo se zgledovali po ugotovitvah študije Kuhlja in sod. (1995). Optimalna vrednost pH je 7,0. V bolj alkalnih pufrih uspešnost postopno upada do pH 8,5, potem pa strmo upade in pri pH 9 predstavlja manj kot 10 % glede na uspešnost pri optimalnem pH. Prav tako strmo upade tudi v bolj kislem okolju, pri pH 6,0 je približno 25-odstotna. Temperatura mora biti čim nižja, najprimernejša je 4° C, pri 20° C je dobitok pravilno zvitega encima že pol manjši, kar je razumljivo tudi s stališča stabilnosti proteinov. Vpliv prisotnosti redoks para so proučili na primeru razmerja med cisteinom in cistinom. Najboljši rezultat daje 5 mM cistein v odsotnosti cistina. Izjemnega pomena je tudi koncentracija prokatepsina B med renaturacijo. Da je le-ta uspešna, mora biti koncentracija čim nižja, najbolje med 10 in 20 µg/ml, pri višjih koncentracijah pa uspešnost eksponentno upade in je pri 100 µg/ml le še nekaj več kot 50-odstotna.

Potrebo po delu s tako nizko koncentracijo encima smo mi občutili kot največjo težavo pri pripravi rekombinantnega katepsina B v *E. coli*. Prokatepsin B je potrebno pred dializo močno razredčiti, zaradi česar imamo opravka z zelo velikimi volumni. V našem primeru smo imeli 10 ml prokatepsina s koncentracijo 5,86 mg/ml, kar je pomenilo optimalno razredčitev na slabe 3 do 6 litrov. Dializo je s tako velikim volumnom v laboratoriju praktično nemogoče izvesti, zato smo morali vzorec razdeliti. Poskusili smo dializo s 50 µg/ml, vendar smo opazili veliko oborjenega proteina, zato smo se pri nadaljnjih ponovitvah odločili za koncentracijo 30 µg/ml. Ker nismo imeli razpoložljivih možnosti za delo z večjimi volumni, se je sama renaturacija prokatepsina le ene šarže izražanja v *E. coli* izkazala za zelo zamudno delo. Tudi Kuhelj (1998) je v svoji doktorski disertaciji zahtevo po nizki koncentraciji označil kot problem, zapisal pa je še, da je ob tem večji tudi vpliv izgub zaradi nespecifične vezave proteina na dializno membrano in stene steklovine.

Renaturaciji je sledilo procesiranje prokatepsina v zreli katepsin. Opazili smo, da se je znaten delež encima pretvoril že med dializo, kar gre pripisati avtokatalitični aktivnosti. Postopek procesiranja s pepsinom smo nekoliko priredili glede na opisanega (Kuhelj in sod., 1995). pH smo uravnavali s HCl in NaOH namesto s formatom in fosfatnim pufrom, da smo se izognili dodatnemu povečevanju volumna. Poleg tega smo pepsin pustili delovati štiri ure namesto dveh. Zdi se, da je bilo procesiranje s pepsinom nepotreben korak, saj se niti v tem času ni pretvoril ves prokatepsin, medtem ko po sledečem dializiranju v Na-acetatnem pufru pri pH 4,5 lise prokatepsina na imunskem odtisu (slika 8) skoraj nismo več zaznali. Omenjeni pH je sicer optimalen za dokazano uspešno avtoprocesiranje prokatepsina (Mach in sod., 1994).

Posamezne vzorce smo po renaturaciji in procesiranju shranili na -80°C . Pred čiščenjem z ionsko izmenjevalno kromatografijo smo jih združili in skoncentrirali z ultrafiltracijo. Večino pripravljene katepsina smo tako očistili v dveh serijah kromatografije.

Končni izkoristek pripravljene rekombinantnega katepsina B v *E. coli* je znašal približno 1,4 mg iz 1 l gojišča, kar je precej manj kot so poročali avtorji postopka priprave, ki so v enakem volumnu uspeli pripraviti 3 mg (Kuhelj in sod., 1995) oziroma 4,24 mg (Kuhelj, 1998) rekombinantnega katepsina B. V drugem primeru so delali s 50 $\mu\text{g/ml}$ prokatepsina B namesto z 10 $\mu\text{g/ml}$ ter procesiranje s pepsinom nadomestili z avtoprocesiranjem.

Pri našem delu smo iz opisanega postopka priprave izpustili korak S-sulfoniranja prokatepsina B pred renaturacijo, ker nismo imeli pogojev za njegovo izvedbo. Tiolne skupine denaturiranega proteina v raztopini pogosto tvorijo intra- in intermolekulske disulfidne vezi, kar lahko privede do tvorbe neželenih kovalentnih agregatov, ki preprečujejo renaturacijo. V izogib je potrebno tiolne skupine vzdrževati v reduciranem stanju. To lahko dosežemo z dodatkom reducentov, kot sta 2-merkaptoetanol ali DTT, ki smo ga uporabili mi, ali pa s kovalentno modifikacijo skupin. S-sulfonacija je reverzibilna kovalentna modifikacija, med renaturacijo je tako omogočena tvorba ustreznih intramolekulskih disulfidov. Ugotovljeno je bilo, da je uspeh renaturacije prokatepsina B brez predhodnega S-sulfoniranja 30 % nižji (Kuhelj in sod., 1995), kar pa še vedno ne pojasni v celoti našega nižjega izkoristka.

Možno je, da na dobiček vpliva tudi način procesiranja. Mi smo v želji, da bi dosegli pretvorbo čim večje količine prokatepsina, čas procesiranja podaljšali. S tem smo ne le podaljšali čas delovanja pepsina, pač pa tudi izpostavljenost encima višji temperaturi, saj je procesiranje potekalo pri 37°C . Daljša izpostavljenost pepsinu morda slabo vpliva na dobiček katepsina, morebiti z napačno cepitvijo ali razgradnjo, čeprav z NaDS-PAGE analizo tega nismo zaznali.

Po drugi strani pa ima, kot sem že opisala, temperatura neposreden in celo zelo močan vpliv na uspešnost renaturacije prokatepsina B. Dialize smo vedno izvajali v hladilniku, temperature dializnega pufra pa nismo preverjali. Zaradi prostorske stiske pufra pogosto nismo shranili v hladilniku toliko prej, da bi lahko trdili, da je bil pred pričetkom dialize dovolj ohlajen. Ob predpostavki, da so avtorji postopka izvedli renaturacijo z dializo proti predhodno ustrezno ohlajenemu pufri, lahko to pojasni precejšen delež našega nižjega izkoristka katepsina B, vendar pa o tem niso poročali (Kuhelj in sod., 1995, Kuhelj, 1998).

Nenazadnje pa se lahko vzrok za razliko v doseženih izkoristkih skriva tudi v samem uspehu izražanja v *E. coli* in izolaciji inkluzijskih telesc, saj ti dobitki niso vedno enaki. V nobeni od teh dveh objav ne poročajo, koliko prokatepsina so izolirali.

V literaturi najdemo tudi opise drugih sistemov za izražanje in pripravo rekombinantnega katepsina B. V kvasovkah se prokatepsin pravilno zvije. Z izražanjem prokatepsina v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* so uspeli pripraviti 10 mg/l gojišča podganjega katepsina B (Rowan in sod., 1992). Izražanje humanega encima je bilo občutno manj uspešno, dosežen je bil izkoristek 250 µg/l gojišča (Mach in sod., 1993). Kvasovke izločajo prokatepsin v gojišče, kislina narava le-tega pa spodbuja avtoprocesiranje. Tako se večina latentne oblike encima pretvori v zrel katepsin B že med samim gojenjem kvasovk. Če želimo pripraviti zrel encim, je to seveda zelo dobrodošlo, ker se izognemo dodatnemu koraku procesiranja. Če pa želimo izolirati prokatepsin B, pa je avtoprocesiranje nezaželeno. Poročali so o izolaciji komaj 75 µg humanega prokatepsina B iz enega litra gojišča (Mach in sod., 1994).

Težava izražanja v *S. cerevisiae* je heterogena glikozilacija prokatepsina B, ki se zgodi v območju zaporne zanke, zato je aktivnost takega produkta nižja. Temu se lahko izognemo s pripravo mutante Ser¹¹⁵-Ala brez glikozilacijskega mesta. Tak encim je enako aktiven kot naravni (Hasnain in sod., 1992).

Kuhelj in sod. (1995) so svoj dosežen izkoristek humanega rekombinantnega katepsina B označili kot uspeh v primerjavi z izkoristki v *S. cerevisiae*, kar je bil do tedaj edini drug uporabljen ekspresijski sistem. Moje mnenje pa je, da so premalo poudarili problem zahtevanih nizkih koncentracij ob renaturaciji. Dobitek v *S. cerevisiae* se zdi na prvi pogled res slabši od tega v *E. coli*, ko pa primerjamo zahtevnost in obseg dela za doseg omenjenega rezultata, pa lahko že močno podvomimo o tej trditvi. Kvasovke je potrebno gojiti tri dni, izolacija in čiščenje proteina pa obsegata centrifugiranje brozge za odstranitev biomase, koncentriranje gojišča, dializiranje, ki ni omejeno s koncentracijo proteina, ionsko izmenjevalno kromatografijo ter končno koncentriranje frakcij s katepsinom (Mach in sod., 1994). Domnevno bi lahko enako količino katepsina, kot smo ga pripravili z *E. coli*, v *S. cerevisiae* pridobili v najmanj štirikrat krajšem času.

Preizkušeni so bili tudi donosnejši sistemi izražanja. Z izražanjem podganjega prokatepsina B v kvasovki *Pichia pastoris* so dosegli izkoristke do 20 mg/l gojišča (Sivarman in sod., 1996). Izražanje humane različice encima je bilo zopet manj uspešno, zabeležili so dobiček okrog 10 mg/l (Illy in sod., 1997). Ugotovljeno je bilo tudi, da izkoristki v *P. pastoris* zelo variirajo (Steed in sod., 1998).

Humani prokatepsin B so izrazili tudi v sesalskih celicah. Izolirali so približno 1 mg čistega prokatepsina B na 5×10^8 celic, kar naj bi bilo nekako vmes med donosoma izražanj humanega (Mach in sod., 1994) ter podganjega (Rowan in sod., 1992) prokatepsina v *S. cerevisiae*. Kot najdonosnejše se je izkazalo izražanje z bakulovirusom v

insektnih celicah, kjer izkoristek humanega katepsina B presega 25 mg/l gojišča (Steed in sod., 1998).

Z ozirom na donose, dosežene z drugimi sistemi izražanja, se priprava katepsina B z izražanjem v *E. coli* po opisanem postopku ne izplača. Glede na sicer visoko stopnjo samega izražanja prokatepsina in enostavnost rokovanja z *E. coli* pa bi bilo morda vredno poizkusiti še izboljšati postopek renaturacije, ki predstavlja kritični korak. V dostopni literaturi nismo zasledili, da bi kdo preizkusil kako drugo metodo renaturacije prokatepsina B. Morda bi se izkazala za uspešnejšo s stališča dobitka nativnega prokatepsina.

Univerzalnega recepta za uspešno renaturacijo ni. Različni proteini zahtevajo različno tretiranje. Med dializiranjem se koncentracija denaturanta zelo počasi znižuje. Nekateri proteini tvorijo med zvijanjem med temi vmesnimi koncentracijami denaturanta intermediate, ki so zelo dovzetni za agregacijo. V tem primeru je bolje, da denaturant odstranimo s hitro razredčitvijo denaturiranega proteina z renaturacijskim pufrom namesto z dializiranjem. Nadgradnjo te metode predstavlja tako imenovana pulzna renaturacija, kjer v renaturacijski pufer v zaporednih časovnih intervalih dodajamo majhne količine raztopljenega denaturiranega proteina (Kato in Kato, 2000). Ideja temelji na dejstvu, da protein, ko se pretvori v nativno stanje, ne tvori agregatov z nezvitim proteinom. Tako lahko v enem volumnu renaturacijskega pufera renaturiramo večje količine proteina.

Uspešno renaturacijo lahko dosežemo tudi z uporabo kromatografskih kolon, pri čemer se izognemo velikim delovnim volumnom. Ta način je primeren za renaturacijo visokih koncentracij proteina. Z ustrezno velikostno izključitveno kromatografsko kolono lahko fizično ločimo različna vmesna stanja zvijanja in tako zmanjšamo tvorbo agregatov (Batas in Chaudhuri, 1996). Medmolekulske interakcije lahko zmanjšamo tudi z vezavo denaturiranega proteina na nosilec ionsko izmenjevalne kromatografije. Do renaturacije pride ob postopnem zmanjševanju koncentracije prisotnega denaturanta med spiranjem kolone z renaturacijskim pufrom (Li in sod., 2002).

Večji izkoristek renaturacije pa je bil dosežen tudi z raztopitvijo inkluzijskih telesc pri milejših denaturacijskih pogojih (Patra in sod., 2000). Ob popolni denaturaciji se oblikuje naključna struktura. Pri tem se hidrofobne regije popolnoma izpostavijo okolju, zato tak protein teži k agregaciji, ki tekmuje z renaturacijo, kar predstavlja največjo oviro za njeno uspešnost. Nekateri proteini v inkluzijskih telescih imajo že oblikovan znaten delež sekundarne strukture, ki je podobna nativni (Oberg in sod., 1994; Patra in sod., 2000). Če inkluzijska telesa raztopimo tako, da ne porušimo teh struktur, je tak protein manj nagnjen k agregaciji. Posledično je lahko renaturacija uspešnejša.

Poizkusili bi lahko tudi povsem drugačno strategijo izločanja izraženega rekombinantnega prokatepsina B iz citosola v periplazmo ali v gojišče. Spremeniti bi morali že sam genski konstrukt, saj bi morali genu za prokatepsin dodati signalno sekvenco, ki protein usmeri v izločanje. Z izločanjem bi morda dosegli pravilno zvitje prokatepsina, ker so v periplazmi *E. coli* prisotni nekateri encimi, ki pripomorejo k pravilnemu zvijanju proteinov s tiolnimi skupinami. (Mergulhão in sod., 2005)

5.2 TESTIRANJE INHIBITORNE AKTIVNOSTI NIZKOMOLEKULARNIH SPOJIN

Testirali smo 22 nizkomolekularnih sinteznih spojin. V aktivacijskem pufru smo namesto DTT uporabili cistein, da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom. Smith in sod. (2002) so pri rešetanju inhibitorjev cisteinske proteaze kaspaze-8 opazili, da lahko nekatere spojine v raztopini pri aerobnih pogojih skupaj z DTT vstopijo v redoks krog in pri tem nastanejo reaktivne kisikove spojine, kot je H_2O_2 . Ta reagira s cisteinom v aktivnem mestu encima in ga s tem inaktivira. Manjša aktivnost encima, ki jo pri tem opazimo, ni posledica vezave inhibitorja. Lažno pozitivna inhibicija ob prisotnosti DTT je bila opažena tudi pri katepsinu B (AID 820, 2010).

Nezaželene rezultate lahko dobimo tudi s promiskuitetnimi inhibitorji, ki kažejo inhibitorno vedenje do zelo različnih tarč. Nespecifična inhibicija je lahko posledica tvorbe agregatov spojine (McGovern in sod., 2002). Pokazali so, da se encim adsorbira na agregate, zaradi česar se njegova aktivnost zmanjša, in da se je temu učinku moč izogniti z uporabo detergentov, kot je Triton X-100 (McGovern in sod., 2003), ki smo ga tudi dodali v aktivacijski pufer.

Pri testiranju smo uporabili substrat Z-Arg-Arg-AMC, ki se v večini študij uporablja za določanje endopeptidazne aktivnosti, in eksopeptidazni substrat Abz-GIVRAK(Dnp)-OH. V slednjem deluje 2,4-dinitrofenil (Dnp) kot dušilec fluorescence orto-aminobenzojske kisline (Abz). Po odcepitvi dipeptida AK(Dnp)-OH, ki jo katalizira katepsin B (Cotrin in sod., 2004), je fluorescenca omogočena. Z merjenjem fluorescence produkta sledimo potek reakcije. Fluorescirajoči produkt endopeptidaznega substrata je aminometil kumarin (AMC).

Ponovitve reakcij z istimi spojinami smo imeli znotraj plošče in tudi na različnih ploščah. Meritve ponovitev na posameznih ploščah so si bile zelo podobne, medtem ko smo med ploščami opazili precej večjo variabilnost. Iz tega izhaja tudi večja standardna napaka začetne hitrosti. Manjšo napako bi lahko dosegli, če bi naredili ponovitve na še več ploščah oziroma če bi znotraj posamezne plošče uporabili več različnih inhibitorjev v manj ponovitvah.

Pri endopeptidaznem testiranju se začetne hitrosti nastajanja produkta med seboj niso statistično značilno razlikovale ($p = 0,99$). Tak rezultat je lahko tudi posledica izvedbe neuravnoteženega poskusa. Za nekaj inhibitorjev imamo na razpolago samo ponovitve znotraj ene poskusne plošče. Če bi naredili ponovitve poskusa s posameznim inhibitorjem na več ploščah, bi morda dosegli statistično boljše rezultate.

Pri eksopeptidaznem testiranju se je nakazala razlika med začetnimi hitrostmi reakcij ($p = 0,0649$). Za potrditev bi morali napraviti še več ponovitev. V slednjem poskusu je nekaj posameznih spojin kazalo statistično značilne rezultate ($p \leq 0,05$), vendar pa je bila njihova nakazana inhibicija manjša od 20 %. Upoštevajoč uporabljeno koncentracijo (50 μM), je to preslab učinek, da bi bili zanimivi in uporabni kot novi inhibitorji. Pri HTS, ki so ga izvedli na Penn centru za molekularna odkritja (AID 453, 2010), so pri podobni izvedbi testiranja postavili spodnjo mejo 20 % inhibicije, da so neko spojino označili kot aktivno.

Vseeno pa je zanimivo, da rezultati nakazujejo učinek, čeprav nizek, na eksopeptidazno aktivnost, medtem ko na endopeptidazno aktivnost testirane spojine nimajo vpliva. Sklepamo lahko, da je možno oblikovati inhibitor, ki cilja samo eno aktivnost, kar je lahko uporabno, če je vloga katepsina B pri nekem patološkem procesu pogojena samo z enim načinom cepitve polipeptidov.

Zaključimo lahko, da so naši rezultati ovrgli z virtualnim rešetanjem podprto domnevo o inhibitorski aktivnosti dvaindvajsetih testiranih nizkomolekularnih sinteznih spojin proti katepsinu B.

6 POVZETEK

Katepsin B je najboljše proučena lizosomska cisteinska proteaza z ekso- in endopeptidazno aktivnostjo. Nastane kot proencim, pri nizkem pH pride do procesiranja in aktivacije do zrele oblike encima. Prostorska struktura katepsina B je podobna ostalim cisteinskim proteazam papainske družine, ima pa eno posebnost, to je zaporna zanka. Le-ta je gibljiva in ima pomembno vlogo pri proteolitični aktivnosti katepsina B. Je odgovorna za sprejem substrata pri eksopeptidazni aktivnosti in ovira endopeptidazno aktivnost. Enako ovira tudi vezavo inhibitorjev, kot so cistatini, ki se vežejo na aktivna mesta cisteinskih proteaz.

Katepsin B deluje pri razgradnji proteinov v lizosomih, sodeluje pa tudi pri nekaterih drugih fizioloških procesih, kot so procesiranje antigenov, aktivacija tiroglobulina in zorenje β -galaktozidaze. Včasih ga najdemo izven lizosomov in zunajcelično, kar je večinoma povezano z različnimi patološkimi procesi. Povezali so ga z invazivnostjo in metastaziranjem pri raku, revmatoidnim artritisom, Alzheimerjevo boleznijo, vlogo pa ima tudi pri nekaterih virusnih okužbah. Raziskovanje regulacije aktivnosti katepsina B je zato obetajoče področje v iskanju novih zdravil.

Pripravili smo rekombinantni humani katepsin B. V bakteriji *Escherichia coli* smo izrazili prokatepsin B. Le-ta se je v celicah nakopičil v obliki inkluzijskih telesc. Celice smo razbili in z ločitvijo trdno/tekoče izolirali inkluzijska telesa. Ta smo očistili s spiranjem nato pa jih z denaturacijo raztopili. Renaturacijo smo vzpostavili z dializiranjem denaturiranega prokatepsina B proti nativnemu pufru. Renaturiran prokatepsin B smo izpostavili procesiranju s pepsinom. Zreli katepsin B smo očistili z ionsko izmenjevalno kromatografijo.

Izkoristek zrelega katepsina B je bil glede na količino denaturiranega prokatepsina B slab, komaj 2 %. Pridobili smo približno 1,4 mg katepsina B s 70 % deležem aktivnega encima. Kritičen korak priprave predstavlja renaturacija, ker je katepsin B med zvijanjem zelo občutljiv na pogoje, kot so koncentracija proteina, temperatura, pH, sestava renaturacijskega pufra, prisotnost redoks spojin, ter podvržen agregaciji. Z drugačno izvedbo renaturacije, na primer s pulzno renaturacijo, renaturacijo z uporabo gelske velikostno izključitvene ali ionsko izmenjevalne kromatografije, ali pa z milejšo denaturacijo prokatepsina B, bi morda bilo možno doseči večji končni donos katepsina B. Alternativno pa bi lahko poskusili tudi z usmerjeno sekrecijo izraženega prokatepsina.

Donosnejša priprava humanega katepsina B je bila opisana z izražanjem v kvasovki *Pichia pastoris*, sesalskih celicah in z bakulovirusom v insektnih celicah.

Preverili in zavrnili smo domnevo o inhibitornem učinku dvaindvajsetih nizkomolekularnih sinteznih spojin, ki jih je virtualno rešetanje, ki ga je predhodno izvedla raziskovalna skupina Fakultete za farmacijo, predlagalo kot možne inhibitorje katepsina B. Testirali smo jih tako za inhibicijo endo- kot eksopeptidazne aktivnosti katepsina B. Merili smo fluorescenco produktov proteolitične razgradnje substratov v prisotnosti posameznih spojin in brez dodane spojine. Določili smo začetne hitrosti reakcij. Te smo med seboj statistično primerjali z analizo varianc ter s t-testom mnogoterih primerjav. Pri testiranju endopeptidazne aktivnosti se začetne hitrosti reakcij v prisotnosti testnih spojin in kontrolne reakcije med seboj niso statistično značilno razlikovale ($p = 0,99$), pri testiranju eksopeptidazne aktivnosti pa se je nakazala razlika ($p = 0,0649$). Pri slednjem testiranju je nekaj spojin kazalo statistično značilne rezultate ($p \leq 0,05$), vendar pa je njihova nakazana inhibicija (manj kot 20 %) prenizka, da bi bile zanimive.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

AID 453 – PubChem BioAssay Summary.

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=453&loc=ea_ras (10. junij 2010)

AID 820 – PubChem BioAssay Summary.

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=820&loc=ea_ras (10. junij 2010)

Batas B., Chaudhuri J. B. 1996. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 16–23

Campo E., Muñoz J., Miquel R., Palacín A., Cardesa A., Sloane B. F., Emmert-Buck M. R. 1994. Cathepsin B Expression in Colorectal Carcinomas Correlates with Tumor Progression and Shortened Patient Survival. *American Journal of Pathology*, 145, 2: 301–309

Chan M. M.-Y., Fong D. 1988. Expression of human cathepsin B protein in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 239, 2: 219–222

Chan S. J., Segundo B., McCormick M. B., Steiner D. F. 1986. Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 7721–7725

Chandran K., Sullivan N. J., Felbor U., Whelan S. P., Cunningham J. M. 2005. Endosomal proteolysis of the ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science*, 308, 1643–1645

Cotrin S. S., Puzer L., de Souza Judice W. A., Juliano L., Carmona A. K., Juliano M. A. 2004. Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides to define substrate specificity of carboxydipeptidases: assays with human cathepsin B. *Analytical Biochemistry*, 335, 244–252

Cygler M., Sivaraman J., Grochulski P., Coulombe R., Storer A. C., Mort J. S. 1996. Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure*, 4, 4: 405–416

- Esposito E. X., Hopfinger A. J., Madura J. D. 2004. Methods for applying the quantitative structure–activity relationship paradigm. *Methods in Molecular Biology*, 275, 131–214
- Farinati F., Herszényi L., Plebani M., Carraro P., De Paoli M., Cardin R., Roveroni G., Ruge M., Nitti D., Grigioni W. F., D'Errico A., Naccarato R. 1996. Increased levels of cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 17, 12: 2581–2587
- Foghsgaard L., Wissing D, Mauch D., Lademann U., Bastholm L., Boes M., Elling F., Leist M., Jäättelä M. 2001. Cathepsin B Acts as a Dominant Execution Protease in Tumor Cell Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor. *The Journal of Cell Biology*, 153, 5: 999–1009
- Fox T, de Miguel E., Mort J. S., Storer A. C. 1992. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry*, 31, 12571–12576
- Friedrichs B., Tepel C., Reinheckel T., Deussing J., von Figura K., Herzog V., Peters C., Saftig P., Brix K. 2003. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *The Journal of Clinical Investigation*, 111, 11: 1733–1745
- Gan L., Ye S., Chu A., Anton K., Yi S., Vincent V. A., von Schack D., Chin D., Murray J., Lohr S., Pathy L., Gonzalez-Zulueta M., Nikolich K., Urfer R. 2004. Identification of cathepsin B as a mediator of neuronal death induced by A β -activated microglial cells using a functional genomics approach. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 7, 5565–5572
- Hasnain S, Hirma T., Tam A., Mort J. S. 1992. Characterization of recombinant rat cathepsin B and nonglycosylated mutants expressed in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 7: 4713–4721
- Illy C., Quraishi O., Wang J., Purisima E., Vernet T., Mort J. S. 1997. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 2: 1197–1202
- Katoh S., Katoh Y. 2000. Continuous refolding of lysozyme with fed-batch addition of denatured protein solution. *Process Biochemistry*, 35, 1119–1124
- Kaznelson D. W., Bruun S., Monrad A., Gjerløv S., Birk J., Röpke C., Nørrild B. 2004. Simultaneous human papilloma virus type 16 E7 and cdk inhibitor p21 expression induces apoptosis and cathepsin B activation. *Virology*, 320, 2: 301–312

- Klarić M., Tao S., Stoka V., Turk B., Turk V. 2009. Cysteine cathepsins are not critical for TNF- α -induced cell death in T98G and U937 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794, 9: 1372–1377
- Krupa J. C., Hasnain S., Nägler D. K., Ménard R., Mort J. S. 2002. S₂' substrate specificity and the role of His¹¹⁰ and His¹¹¹ in the exopeptidase activity of human cathepsin B. *Biochemical Journal*, 361, 613–619
- Kuhelj R. 1998. Ekspresija človeškega katepsina B v bakteriji *Escherichia coli*, njegova renaturacija in mutageneza: doktorska disertacija. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 99 str.
- Kuhelj R., Dolinar M., Pungerčar J., Turk V. 1995. The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *European Journal of Biochemistry*, 229, 533–539
- Lee X., Ahmed F. R., Hiramata T., Huber C. P., Rose D. R., To R., Hasnain S. 1990. Crystallization of recombinant rat cathepsin B. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 11: 5950–5951
- Li M., Zhang G., Su Z. 2002. Dual gradient ion-exchange chromatography improved refolding yield of lysozyme. *Journal of Chromatography A*, 959, 1–2: 113–120
- Mach L., Mort J. S., Glössl J. 1994. Maturation of human procathepsin B. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 17: 13030–13035
- Mach L., Schwihla H., Stüwe K., Rowan A. D., Mort J. S., Glössl J. 1993. Activation of procathepsin B in human hepatoma cells: the conversion into the mature enzyme relies on the action of cathepsin B itself. *Biochemical Journal*, 293, 437–442
- Mason J. S., Good A. C., Martin E. J. 2001. 3-D pharmacophores in drug discovery. *Current Pharmaceutical Design*, 7, 7: 567–597
- Matsunaga Y., Saibara T., Kido H., Katunuma N. 1993. Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II. *FEBS Letters*, 324, 3: 325–330
- McGovern S. L., Caselli E., Grigorieff N., Shoichet B. K. 2002. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 1712–1722

- McGovern S. L., Helfand B. T., Feng B., Shoichet B. K. 2003. A specofoc mechanism of nonspecific inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 4265–4272
- Mergulhão F. J. M., Summers D. K., Monteiro G. A. 2005. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 23, 177–202
- Mort J. S., Tam A., Steiner D. F., Chan S. J. 1988. Expression of Rat and Mouse Cathepsin B Precursors in *Escherichia coli*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 369, 163–167
- Mueller-Steiner S, Zhou Y., Arai H., Roberson E. D., Sun B., Chen J., Wang X., Yu G., Esposito L., Mucke L., Gan L. 2006. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron*, 51, 703–714
- Musil D., Zucic D., Turk D., Engh R. A., Mayr I., Huber R., Popovic T., Turk V., Towatari T., Katunuma N., Bode W. 1991. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *The EMBO Journal*, 10, 9: 2321–2330
- Nägler D. K., Storer A. C., Portaro F. C. V., Carmona E., Juliano L., Ménard R. 1997. Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry*, 36, 41: 12608–12615
- Nycander M., Estrada S., Mort J. S., Abrahamson M., Björk I. 1998. Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. *FEBS Letters*, 422, 1: 61–64
- Oberg K., Chrnyk B. A., Wetzel R., Fink A. L. 1994. Native-like secondary structure in interleukin-1 β inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR. *Biochemistry*, 33, 9: 2628–2634
- Okamura-Oho Y, Zhang S., Callahan J. W., Murata M., Oshima A., Suzuki Y. 1997. Maturation and degradation of β -galactosidase in the post-Golgi compartment are regulated by cathepsin B and a non-cysteine protease. *FEBS Letters*, 419, 2–3: 231–234
- Patra A. K., Mukhopadhyay R., Mukhija R., Krishnan A., Garg L. C., Panda A. K. 2000. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 18, 182–192

- Pavlova A., Krupa J. C., Mort J. S., Abrahamson M., Björk I. 2000. Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration by release of loop anchoring through mutation of His110. *FEBS Letters*, 487, 2: 156–160
- R Development Core Team. 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
<http://www.R-project.org>
- Rempel A. S., Rosenblum M. L., Mikkelsen T., Yan P.-S., Ellis K. D., Golembieski W. A., Sameni M., Rozhin J., Ziegler G., Sloane B. F. 1994. Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion. *Cancer Research*, 54, 6027–6031
- Ren W.-P., Fridman R., Zabrecky J. R., Morris L. D., Day N. A., Sloane B. F. 1996. Expression of functional recombinant human procathepsin B in mammalian cells. *Biochemical Journal*, 319, 793–800
- Rowan A. D., Mason P., Mach L., Mort J. S. 1992. Rat procathepsin B. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 22: 15993–15999
- Schenker P., Alfarano P., Kolb P., Caflisch A., Baici A. 2008. A double-headed cathepsin B inhibitor devoid of warhead. *Protein Science*, 17, 12: 2145–2155
- Singh A. 2007. Use of alpha factor sequences in yeast expression systems. United States patent US 7 198 919 B1
- Sivaraman J., Coloumbe R., Magny M.-C., Mason P., Mort J. S., Cygler M. 1996. Crystallization of rat procathepsin B. *Acta Crystallographica Section D*, 52, 874–875
- Smith G. K., Barrett D. G., Blackburn K., Cory M., Dallas W. S., Davis R., Hassler D., McConnell R., Moyer M., Weaver K. 2002. Expression, Preparation, and high-throughput screening of caspase-8: Discovery of redox-based and steroid diacid inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399, 2, 195–205
- Steed P. M., Lasala D., Liebman J., Wigg A., Clark K., Knap A. K. 1998. Characterization of recombinant human cathepsin B expressed at high levels in baculovirus. *Protein Science*, 7, 9: 2033–2037
- Sukoh N., Abe S., Ogura S., Isobe H., Takekawa H., Inoue K., Kawakami Y. 1994. Immunohistochemical study of cathepsin B. Prognostic significance in human lung cancer. *Cancer*, 74, 1: 46–51

Sumiya S., Yoneda T., Kitamura K., Murata M., Yokoo C., Tamai M., Yamamoto A., Inoue M., Ishida T. 1992. Molecular design of potent inhibitor specific for cathepsin B based on tertiary structure prediction. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40, 2: 299–303

Turk D., Podobnik M., Kuhelj R., Dolinar M., Turk V. 1996. Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Å resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Letters*, 384, 211–214

Vigneswaran N., Zhao W., Dassanayake A., Muller S., Miller D. M., Zacharias W. 2000. Variable expression of cathepsin B and D correlates with highly invasive and metastatic phenotype of oral cancer. *Human Pathology*, 31, 8: 931–937

7.2 DRUGI VIRI

Bajorath J. 2002. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 11: 882–894

BoxShade Server.

http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html (23. junij 2010)

Brix K., Dunkhorst A., Mayer K., Jordans S. 2008. Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions. *Biochimie*, 90, 2, 194–207

ClustalW2. EMBL-EBI.

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2> (23. junij 2010)

Duffy M. J. 1992. The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 10, 145–155

Espacenet.

<http://ep.espacenet.com> (12. junij 2010)

Rai M., Padh H. 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. *Current Science*, 80, 9: 1121–1128

Rainer R., Hauke L. 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB Journal*, 10, 1: 49–56

Singh S. M., Panda A. K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 4: 303–310

UniProt.

<http://www.uniprot.org> (23. junij 2010)

ZAHVALA

Iskrena in prisrčna hvala

prof. dr. Janku Kosu za mentorstvo, potrpežljivost in pomoč;

somentorici mag. Urši Pečar Fonović za prijaznost, dostopnost, posredovanje znanja in izkušenj, nasvete in podporo;

Bojani Mirković za pomoč in nasvete pri encimski kinetiki;

dr. Damijani Kastelec za nepogrešljivo pomoč pri statistični obdelavi podatkov;

prijatelju Žigu za pomoč pri obdelavi fotografij;

prof. dr. Nataši Poklar Ulrich za recenzijo diplomskega dela;

mami za brezmejno ljubezen, zaupanje, podporo in odrekanje lastnim željam, da mi je omogočila študij;

prijateljici in sošolki Ajdi za spodbudo, motiviranje, mnoge študijske diskusije tekom študija in diplomskega dela ter izmenjavo izkušenj;

Boštjanu B. za pomoč ob vsakem času;

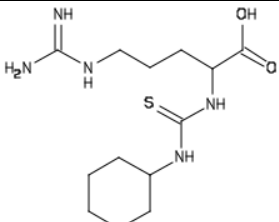
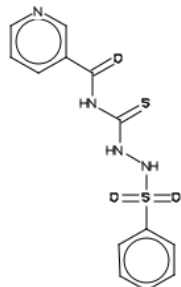
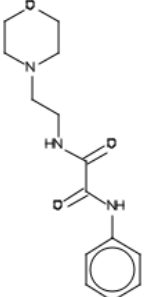
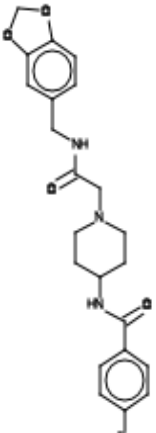
prijateljicam Ivi in Evi za nenadomestljivo oporo v vseh trenutkih ter

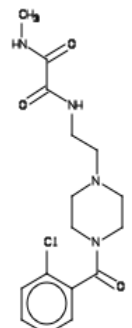
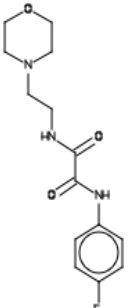
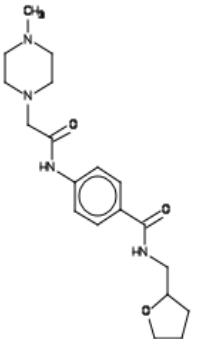
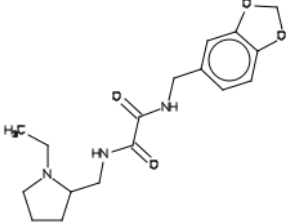
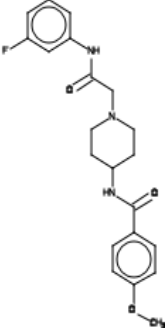
sodelavcem Katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo za prijaznost.

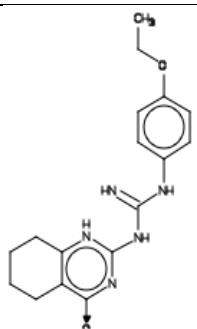
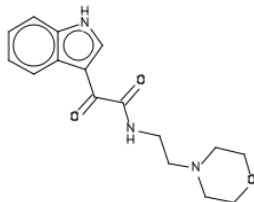
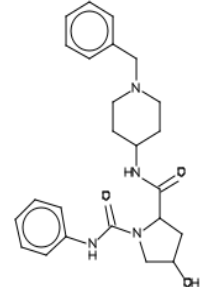
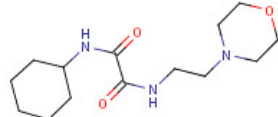
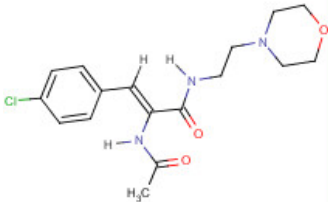
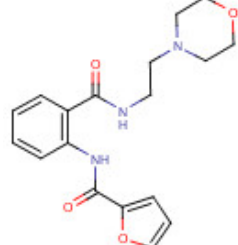
PRILOGE

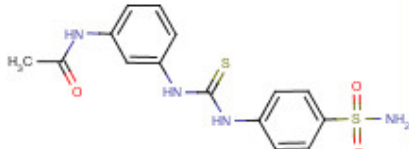
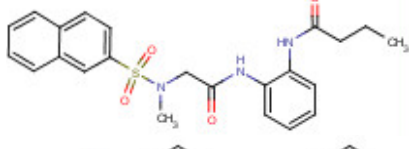
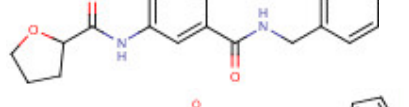
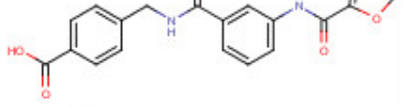
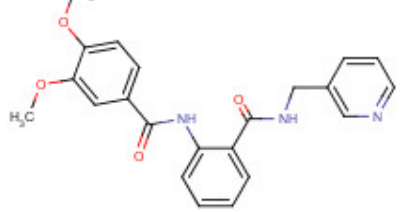
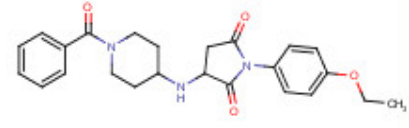
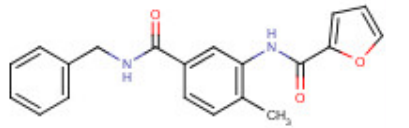
Priloga A

SEZNAM TESTNIH NIZKOMOLEKULARNIH SINTEZNIH SPOJIN

Oznaka	Strukturna formula	Molekulska formula	Molekulska masa [Da]	Oznaka proizvajalca
1		$C_{13}H_{25}N_5O_2S$	315,44	BAS 02912684
2		$C_{13}H_{12}N_4O_3S_2$	336,39	BAS 01555875
3		$C_{14}H_{19}N_3O_3$	277,32	BAS 03712342
4		$C_{22}H_{24}FN_3O_4$	413,45	ASN 06468109

Oznaka	Strukturna formula	Molekulska formula	Molekulska masa [Da]	Oznaka proizvajalca
5		$C_{16}H_{21}ClN_4O_3$	352,82	BAS 04841101
6		$C_{14}H_{18}FN_3O_3$	295,31	BAS 06314374
7		$C_{19}H_{28}N_4O_3$	360,46	ASN 08239667
8		$C_{17}H_{23}N_3O_4$	333,39	BAS 07564541
9		$C_{21}H_{24}FN_3O_3$	385,44	ASN 06465848

Oznaka	Strukturna formula	Molekulska formula	Molekulska masa [Da]	Oznaka proizvajalca
10		$C_{17}H_{21}N_5O_2$	327,39	BAS 06575950
11		$C_{16}H_{19}N_3O_3$	301,34	BAS 12927364
12		$C_{24}H_{30}N_4O_3$	422,53	ASN 09583935
13		$C_{14}H_{25}N_3O_3$	283	5858705
14		$C_{17}H_{22}ClN_3O_3$	352	5879630
15		$C_{18}H_{21}N_3O_4$	343	7498242

Oznaka	Strukturna formula	Molekulska formula	Molekulska masa [Da]	Oznaka proizvajalca
16		$C_{15}H_{16}N_4O_3S_2$	364	7833862
17		$C_{23}H_{25}N_3O_4S$	440	7893295
18		$C_{19}H_{20}N_2O_3$	324	7947922
19		$C_{20}H_{16}N_2O_5$	364	7969465
20		$C_{22}H_{21}N_3O_4$	391	9018358
21		$C_{24}H_{27}N_3O_4$	421	9019039
22		$C_{20}H_{18}N_2O_3$	334	9024321