

Statiner hemmer aktivitet av den lysosomale cysteinproteasen legumain –Spiller legumain en rolle i apoptose?

Islam Mohammed Yaseen



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematiske-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

15. mai 2011

Statiner hemmer aktivitet av den lysosomale cysteinproteasen legumain –Spiller legumain en rolle i apoptose?

Islam Mohammed Yaseen



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematiske-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Veiledere:

Professor Rigmor Solberg

Professor Harald Thidemann Johansen

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo i perioden august 2010 til mai 2011.

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til mine veiledere; professor Rigmor Solberg og professor Harald Thidemann Johannsen for all hjelp de har gitt meg under masterarbeidet. De har alltid vært villige til å hjelpe med eksperimentelle arbeid og under skriveprosessen.

Jeg vil videre takke avdelingsingeniør Hilde Nilsen for god opplæring på labben, tilgjengeligheten når jeg trengte hjelp og ikke minst for de siste forsøkene hun har gjort for meg. Jeg vil også takke avdelingsingeniør Åse-Karine Fjelheim for å ha laget stabile transfektanter av HEK 293 celler (M38L-celler). Takk til stipendiat Robert Smith for godt samarbeid i cellelabben. Takk til Professor Eva Skovlund for statistikk innspill.

Jeg ønsker å takke Eyassu Tewolde, andre medstudenter og alle ansatter på avdelingen for en hyggelig og koselig periode.

Til slutt vil jeg takke familien min og venner for støtte og motivasjon gjennom hele studiet.

Oslo, 15.mai.2011

Islam M. Yaseen

Innhold

Forord	3
Innhold	4
Forkortelser og forklaringer	6
Sammendrag	8
1. Innledning	9
1.1 Statiner.....	9
1.1.1 <i>Simvastatin</i>	11
1.1.2 <i>Atorvastatin</i>	12
1.2 Celledød.....	12
1.2.1 <i>Nekrose</i>	13
1.2.2 <i>Autofagi</i>	13
1.2.3 <i>Apoptose</i>	13
1.3 Apoptose-indusere	16
1.3.1 <i>Staurosporin</i>	16
1.3.2 <i>Leu-Leu-OMe</i>	16
1.3.3 <i>Brefeldin A</i>	16
1.3.4 <i>Bafilomycin A1</i>	16
1.4 Proteaser	17
1.4.1 <i>Caspaser</i>	17
1.4.2 <i>Legumain</i>	18
1.5 Mål med oppgaven	19
2. Materialer og metode	20
2.1 Kjemikalier og reagenser.....	20
2.2 Utstyr	21
2.3 Cellelinjer	22
2.3.1 <i>HEK 293 celler</i>	22
2.3.2 <i>Tining</i>	22
2.3.3 <i>Dyrking, splitting og telling</i>	23
2.3.4 <i>Stabil transfeksjon av HEK 293</i>	23
2.4 Høsting og enzymaktivitetsmåling	23

2.4.1	<i>Legumain</i>	23
2.4.2	<i>Caspase-3</i>	24
2.5	Totalproteinmåling	25
2.6	Viabilitetsmåling.....	25
2.7	Statistikk	26
3.	Resultater	27
3.1	Atorvastatin og simvastatin (syre- og laktonformer) reduserer legumainaktivitet i HEK 293- og M38L-celler	27
3.2	Effekt av ulike apoptoseinduserende stoffer på HEK 293- og M38L-celler	31
3.3	Caspase-3-aktivitet i HEK 293- og M38L-celler etter stimulering med simvastatin laktonform eller staurosporin	32
4.	Diskusjon	34
4.1	Cellemodeller og metoder.....	34
4.2	Statiner reduserer legumainaktiviteten	35
4.3	Effekt av statiner og apoptoseinduserende stoffer på celledød i HEK 293- og M38L-celler.....	37
5.	Konklusjon	40
6.	Kildeliste	41
7.	Vedlegg	45
7.1	Oppløsninger.....	45

Forkortelser og forklaringer

Forkorting	Forklaring (norsk/engelsk)
Apaf-1	apoptoseaktiverende faktor 1
Asn	aspargin
BFA	Brefeldin A
dH ₂ O	destillert vann
CAD	caspase-aktivert DNase
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl) dimethylammonio) propane sulfat
CTLs	cytotoksiske T lymfoctter
DD	dødsdomene
DDD	Definert døgndose
DISC	død-indusert signal-kompleks
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DR	dødsreseptor
DTT	ditiotreitot
ER	endoplasmatisk retikulum
FADD	Fas-assosiert protein med dødsdomen
GB	glioblastom
HBr	Hydrobromide acid
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic

HMG-CoA	3-hydroksy-3-metyl-glutaryl-coenzym A
ICAD	inhibitor av caspase-aktivert DNase
LAF	Laminar air flow
LDL	Low density lipoprotein
Leu-Leu-OMe	L-leucyl-L-leucine metylester
M38L	Legumain-tranfekterte HEK 293 celler
nM	nanomolar
PARP	poly-(ADP-ribose) polymerase
PBS	fosfatbufret saltvann
PCD	programmert celledød
PKC	protein kinase C
PLA2	fosfolipase A2
tBid	truncated Bid
rpm	omdreininger per minutt
SMC	glatte muskelceller
Tp53	tumorsuppressor protein 53
V-ATPase	vakuol H ⁺ ATPase
VSMC	vaskulære glatte muskelceller

Sammendrag

Apoptose eller programmert celledød er en viktig fysiologisk prosess helt fra fosterutviklingen for å eliminere ødelagte eller unormale celler. Caspaser har en viktig rolle i regulering av apoptose og legumain ligner på disse i struktur og aminosyresekvens. Apoptose kan også skje ved frigjøring av lysosomale enzymer som cathepsiner til cytosol og flere cathepsiner er substrat for legumain. Legumain er overuttrykt i ustabile aterosklerotiske plakk og i mange kreftcelletyper. Atorvastatin er vist å nedregulere legumain mRNA-uttrykket og i denne oppgaven var målet å undersøke om statiner fører til endret aktivitet av legumain og celledød og dermed om legumain kan spille en rolle i dødsprosessen.

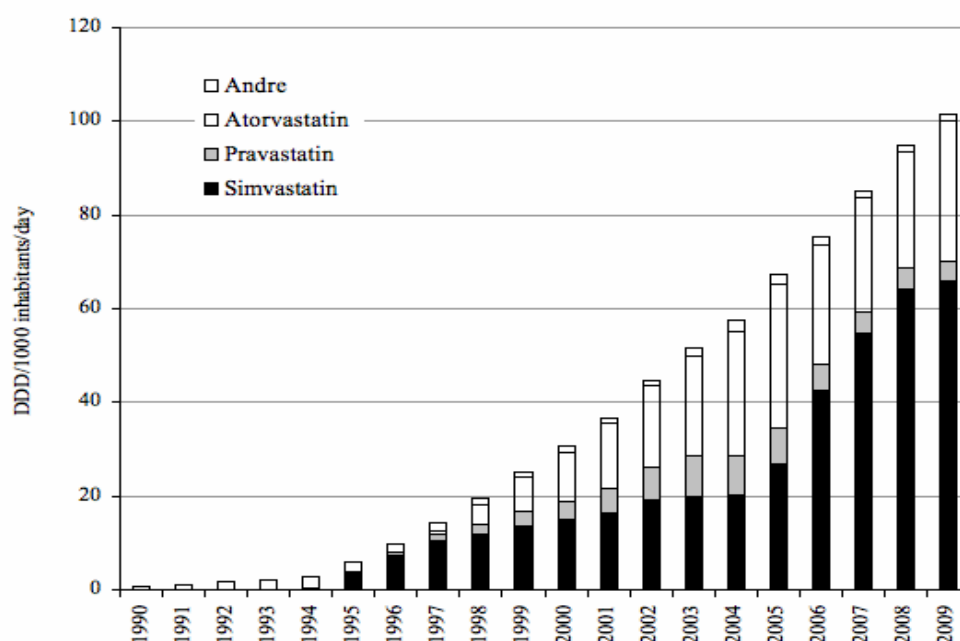
HEK 293 celler som basalt inneholder lite legumain og M38L-celler som overuttrykker legumain ble dyrket i ett døgn før de ble stimulert med statiner (syre- og laktonformen av atorva- og simvastatin) i ulike konsentrasjoner (10-400 μM) i 24 timer. Legumain- og caspase-3-aktivitet var målt ved hjelp av spesifikke fluorescerende substrater. Celleviabilitet ble målt med MTS-reagens etter at begge celletypene ble stimulert med statiner eller ulike apoptose-induserende stoffer (brefeldin A, bafilomycin A1, Leu-Leu-OMe og staurosporin) i 24 timer.

Legumainaktiviteten ble redusert med økende konsentrasjoner av både atorva- og simvastatin (syre- og laktonformen), men laktonformene hadde signifikant større hemmingseffekt på enzymaktiviteten i forhold til tilsvarende syreformer. Sammenligning av de to celletypene viste at simvastatin syreform hemmer legumain mer i M38L-celler enn i HEK 293 celler. Etter at HEK 293- og M38L-celler var behandlet med ulike apoptose-induserende stoffer viste resultatene ingen signifikant forskjell på celleviabiliteten mellom de to ulike celletypene. Vi observerte aktivering av caspase-3 når cellene ble stimulert med statiner. På grunn av stor spredning i resultatene var det vanskelig å trekke en konklusjon om de to ulike celletypene responderte forskjellig. Flere studier er nødvendig for å se om endret legumainaktivitet kan påvirke utviklingen av apoptose etter stimulering med staurosporin eller simvastatin laktonformen.

1. Innledning

1.1 Statiner

Statiner tilhører en kolesterolsenkende legemiddelgruppe. Flere epidemiologiske studier gjort i mange land har vist at for høyt kolesterolnivå i blodet, spesielt i form av ”low density lipoprotein” (LDL), er en viktig risikofaktor for hjerte- og karsykdommer. Risikoen for hjerteinfarkt økes gradvis med økende kolesterolnivå, særlig når det overstiger 200 mg/dl. Undersøkelser har også vist at lavt LDL-nivå reduserer forekomsten av hjerte- og karsykdommer [1-3]. Data fra reseptregisteret viser at 452 603 individer (ca. 9 % av befolkningen) hentet minst en resept på et statin i løpet av 2009. Det totale forbruket ligger på 104 definerte døgndoser per 1000 innbyggere per døgn (DDD) (figur 1.1) og Norge ligger på toppen for salg av statiner i Europa (www.reseptregisteret.no, www.legemiddelforbruk.no).

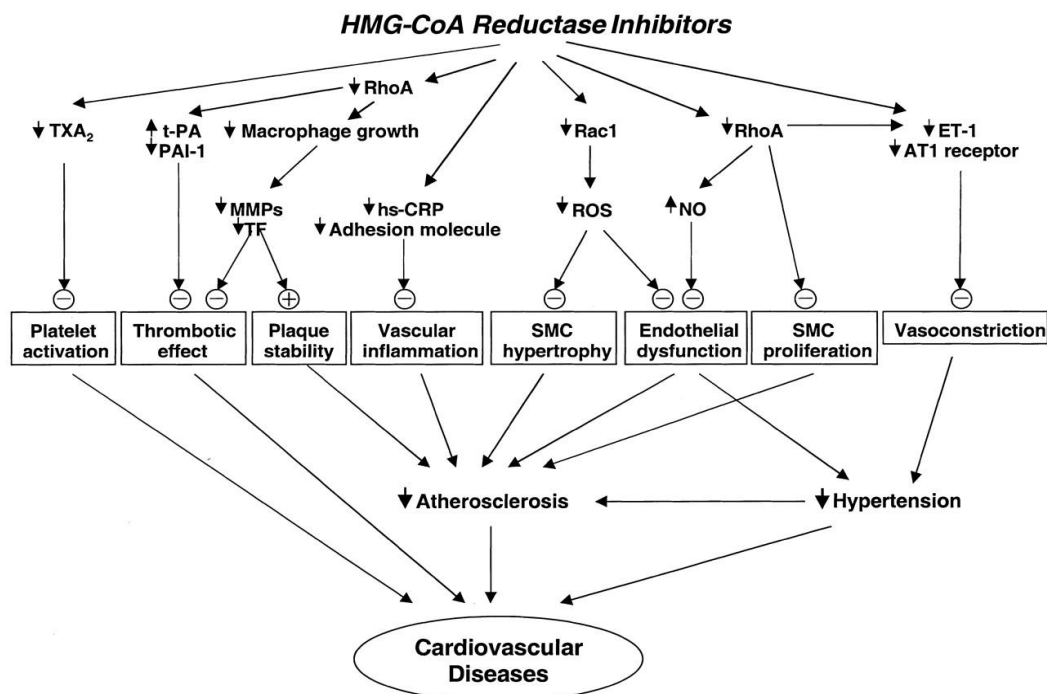


Figur 1.1 Salg av statiner (HMG-CoA reduktasehemmere) i perioden 1990-2009 angitt i DDD/1000 innbyggere/døgn (www.legemiddelforbruk.no).

Interessen for å utvikle et nytt kolesterolsenkende legemiddel har vært veldig stor og flere forskere engasjerte seg i slike prosjekter på 1950- og 60-tallet. Disse ulike stoffene ble undersøkt: nikotinsyre, kolestyramin, klofibrat, neomysin, plantesterol, triparanol, D-tyroksin

og østrogener. Nikotinsyre reduserte lipoproteinsyntesen som igjen reduserte LDL-kolesterolnivået. Dette stoffet hadde flere uønskede bivirkninger, som hudvasodilatasjon, utslett, økt mengde urinsyre i blodet, gastrointestinale forstyrrelser, hyperglykemi og leverdysfunksjon [2]. I 1971 begynte to japanske forskere, Akira Endo og Masao Kuroda å søke etter bedre legemidler i behandling av høyt kolesterol, og de oppdaget i 1976 en potent HMG-CoA reduktasehemmer, som ble kalt mevastatin (tidligere kalt ML-236B eller kompaktin) [4]. Senere var det flere forskere som jobbet for å finne mevastatin-analoger og på 1980-tallet ble tre nye statiner oppdaget; lovastatin (tidligere kalt mevinolin), pravastatin og simvastatin [2].

Statiner hemmer det hastighetsbegrensede enzymet HMG-CoA-reduktase kompetitivt. Resultatet blir en reduksjon av den hepatiske kolesterolkonsentrasjonen. Dette fører til økt antall LDL-reseptorer i leveren og større opptak og metabolisme av LDL-kolesterol [5]. Langtidsbehandling av simvastatin er trygt og forbedrer overlevelse blant pasienter med hjerte- og karsykdommer [6]. I tillegg har eksperimenter og kliniske studier vist at statiner har såkalte pleiotrope effekter: for eksempel forbedrer endotelfunksjon, forsterker stabilitet av aterosklerotiske plakk, reduserer oksidativt stress og vaskulær inflammasjon (figur 1.2) [7, 8].

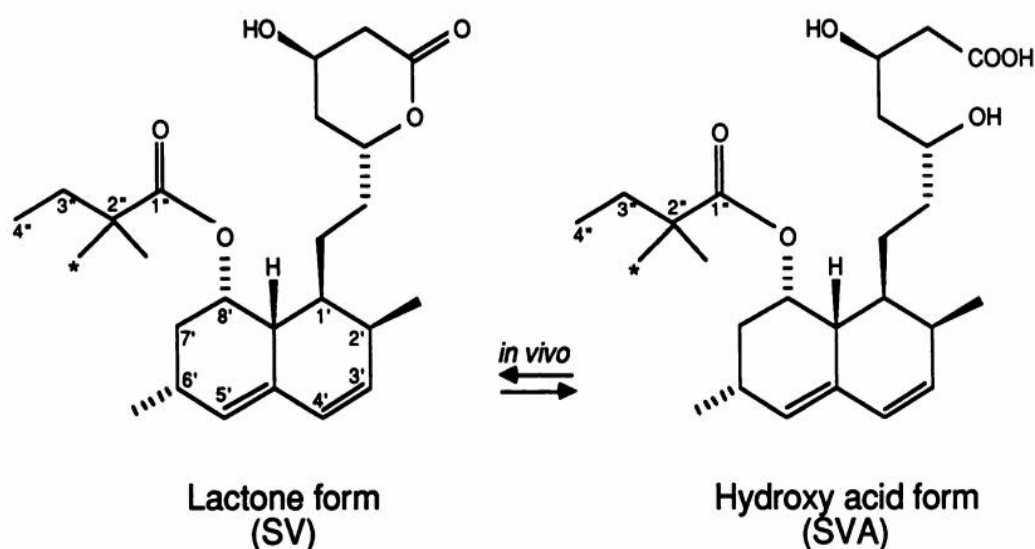


Figur 1.2 Oversikt over statiners kolesterol-uavhengige (pleiotrope) effekter på vaskulær cellevegg. For eksempel forbedrer statiner endotelfunksjonen, forsterker stabilitet av aterosklerotiske plakk, reduserer oksidativt stress og undertrykker vaskulær inflammasjon [7].

Bruk av statiner er godt tolerert, men myotoksisitet kan forekomme. Av pasienter som ble behandlet med statiner som monoterapi, fikk cirka 0,44 per 10.000 pasienter i året rabdomyolyse [9].

1.1.1 Simvastatin

Simvastatin blir fremstilt ved syntetisk modifisering av lovastatin [10]. Simvastatin laktonformen er en prodrug og gjennomgår reversibel metabolisme til syreformen (figur 1.3), som er en sterk hemmer av HMG-CoA. Simvastatin er godt absorbert hos rotter, hund og mennesker [11].



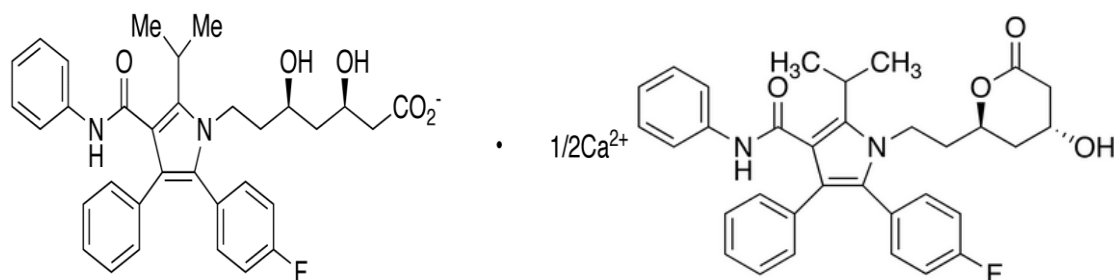
Figur 1.3 Struktur av simvastatin: Laktonform (SV) og hydrokysyreform (SVA) (modifisert fra [11]).

Det er observert høye nivåer av statiner i laktonform hos pasienter med statinindusert myopati. Dette ble undersøkt nærmere på skjelettmuskelceller i kultur som ble stimulert med forskjellige konsentrasjoner (0, 100, 200, 300 og 400 μM) av simvastatin (syre- eller laktonform) i 72 timer. Resultatet viste at simvastatin laktonformen var mer potent til å indusere celledød i forhold til syreformen [12].

Flere studier har vist at simvastatin reduserer proliferasjon og indusere apoptose i ulike celletyper, inkludert vaskulær glattmuskelceller (VSMC), men mekanismen er ikke kartlagt. Ved Western blotting analyse ble omdanning av pro-caspase-3 (32-kDa) til aktivform (20-kDa) observert etter 12 timers inkubering med simvastatin (30 μM) [13].

1.1.2 Atorvastatin

Atorvastatin administreres i aktiv syreform peroralt, gjennomgår første passasje metabolisme og har en biotilgjengelighet på ca. 12 %. Syreformen omdannes *in vivo* reversibelt til mer lipofil og inaktiv atorvastatin laktonform. Begge formene metaboliseres av CYP3A4 [14].



Figur 1.5 Atorvastatin molekylstruktur: Syreform (til venstre) og laktonform (til høyre).

I studien nevnt tidligere var atorvastatin laktonform mer potent til å indusere skjelettmuskelcelledød i forhold til syreformen [12].

Pasienter med aterosklerose ble inkludert i en studie for å undersøke pleiotrope effekter av atorvastatin i monocytter/makrofager. De ble behandlet i 6 og 12 uker med atorvastatin 20 eller 80 mg per dag. Resultatene viste at etter 12 ukers behandling fikk begge gruppene forbedret sin lipidprofil, og en signifikant reduksjon i genekspressjon av lipoprotein-assosiert fosfolipase A2 (PLA2), CD13, leptinreseptor, matriks metallprotease-1, legumain og prolyl oligopeptidase. Økning av tumor protein 53 (Tp53) ble observert i den gruppen som fikk 80 mg atorvastatin per dag etter 12 uker [15].

1.2 Celledød

Celledød er et irreversibelt tap av plasmaintegritet. Historisk sett er celledød delt inn i to typer og skilles etter morfologiske endringer i pattedyrceller; nekrose og apoptose, men autofagi kan også føre til celledød [16]. I motsetning til nekrose er apoptose en regulert og energiavhengig form for celledød og cellulære rester blir spist av fagocytter [17]. Dersom mitose fortsatte uten celledød, ville en person på 80 år ha hatt to tonn med benmarg og lymfkjertler, og en 16 kilometer lang tarm [18].

1.2.1 Nekrose

Patologer har sett på celledød med lys- eller elektronmikroskop for å kartlegge morfologien av døde celler ved nekrose [19]. I starten ble begrepet nekrose brukt for å beskrive irreversibel vevskade når cellen allerede var dødd. Etter hvert ble begrepet brukt for ikke programmert eller tilfeldig celledød. Nekrose er en energig-uavhengig celledød og skjer for eksempel ved varmessstress eller giftige stoffer. Morfologien til cellene ved nekrose starter med at cellemembranen blir tidlig permeabel og sveller, organeller kan utvides og ribosomer kan frigjøres fra endoplasmatiske retikulum (ER). Senere blir kjernen oppløst og kromatin kondenseres. I løpet av tidlig cellulær lekkasje blir det massiv inflammasjon i disse vevene [17]. Nekrose skjer gjennom to forskjellige mekanismer: Enten ved forstyrrelse av energiforsyningen til cellene eller når cellemembranen blir direkte skadet [20].

1.2.2 Autofagi

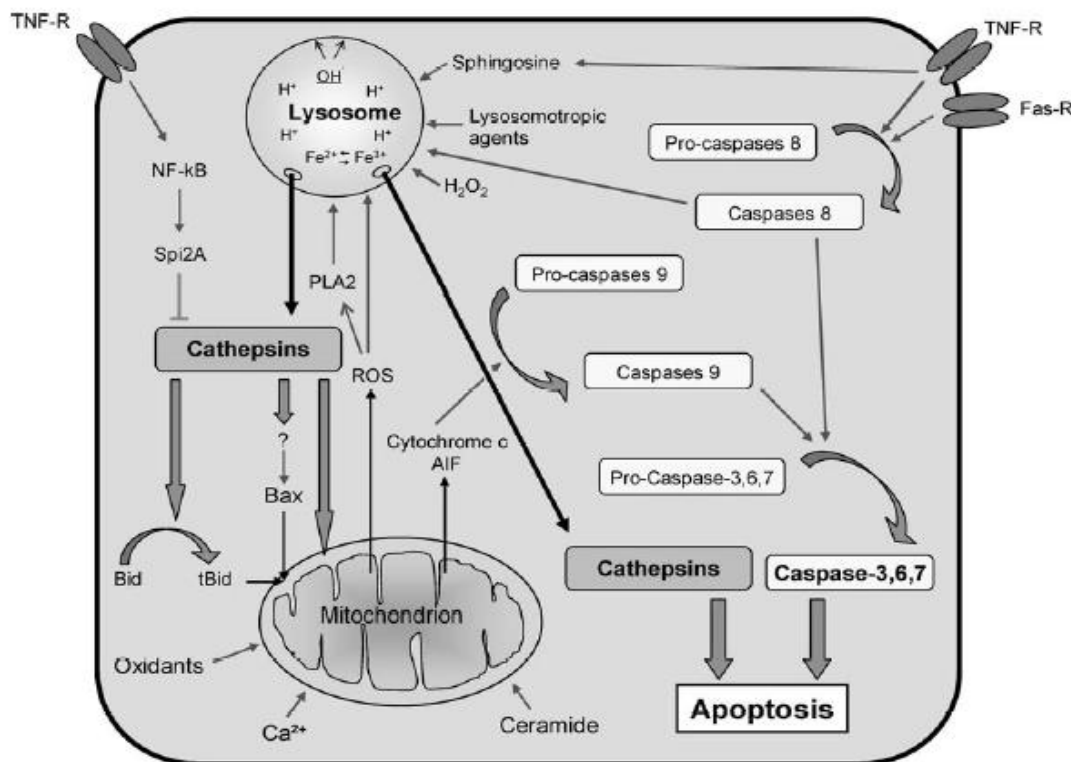
Autofagi er en viktig cellulær homeostase prosess som ”rydder opp” i celler på en regulert måte. I denne prosessen resirkuleres næringsstoffer, overflødige eller ødelagte organeller og makromolekyler. Denne funksjonen opprettholdes i alle eukaryoter fra gjær til mennesker. Funksjonen er sentral både hos friske og ved sykdomstilstander. Autofagi er involvert i undertrykking av kreftutvikling og hindrer neurodegenerasjon. Autofagi er også ansvarlig for å eliminere intracellulære patogener inkludert virus, parasitter, og bakterier [21].

1.2.3 Apoptose

Begrepet apoptose ble først brukt av Kerr og medarbeider i 1972 [22]. Apoptose eller programmert celledød (PCD) er en fysiologisk prosess og er regulert av et sammensatt molekylært signalsystem. Prosessen settes i gang for å eliminere ødelagte eller unormale celler. Den spiller en viktig rolle i embryogenese, hvor normale celler gjennomgår apoptose. PCD er en energiavhengig prosess hvor celler gjennomgår enzymatisk nedbrytning til molekylære fragmenter, DNA fragmenteres, kromatin kondenseres, membranen lager blemmer (”blebbing”), cellen krymper og organeller mister sin plass i cytoplasma [23]. Balansen mellom levende og døde celler er genetisk styrt og mange av ekstracellulære signaler og intracellulære mediatorer er ansvarlige for å opprettholde denne balansen. Dersom denne balansen ikke er nøye regulert vil det føre til sykdommer [24].

Mekanismen for apoptose er et veldig kompleks og energiavhengig kaskade av molekylære hendelser. Det er to hovedveier for apoptose: den dødsreseptorinduserte signalveien ("extrinsic") og den mitokondrielle signalveien ("intrinsic"). Disse to veiene kan påvirke hverandre og kommer til samme terminal eller effektorfase. Denne fasen starter med spaltning av caspase-3 og forårsaker DNA-fragmentering, degradering av cytoskjelettet og kjerneproteiner, dannelse av apoptotiske legemer og til slutt tas disse opp av fagocytiske celler [20].

Caspaser er proteolytiske enzymer som spalter proteiner ved karboksylgruppen av aspargin (Asn) og disse har en sentral rolle i apoptose. Caspaser inndeles i flere kategorier: initiatorer (caspase-2, -8, -9, -10), effektor (caspase-3, -6, -7) og inflammatoriske caspaser (caspase-1, -4, -5). Flere andre caspaser er identifisert: caspase-11 er rapportert å regulere apoptose og cytokinmodning gjennom septisk sjokk; caspase-12 er involvert i endoplasmatisk-spesifikk apoptose og caspase-13 er foreslått å være okselignende gen og caspase-14 er overuttrykt i embryonalt vev. Apoptose kan også bli utløst ved omfattende kryssbindinger av proteiner fulgt av uttrykk og aktivering av transglutaminase. DNA nedbrytes av Ca^{2+} - og Mg^{2+} -avhengig endonukleaser [20].



Figur 1.6 Oversikt over apoptose signalveier: Ulike caspaser og cathepsiner er involvert i regulering av pro-apoptotisk signalkaskade [25].

Den mitokondrielle signalveien starter med positive eller negative intracellulære signaler. Negative signaler reduserer viktige vekstfaktorer, hormoner og cytokiner som kan hemme apoptose, mens positive stimuli kan være stråling, giftstoffer, oksygenmangel, feber, virusinfeksjon og frie radikaler. Disse stimuli forårsaker økt mitokondriell permeabilitet og at pro-apoptotiske proteiner lekker ut i cytosol. Mange pro-apoptotiske mediatorer frigjøres fra mitokondria som aktiverer den caspaseavhengige mitokondrielle signalveien (Figur 1.6). Blant annet cytokrom c frigjøres og bindes til apoptoseaktiverende faktor (Apaf-1) og dermed danner den såkalte apoptosom som igjen aktiverer procaspase-9. Deretter blir caspase-3 aktivert og påvirker morfologiske endringer ved apoptose som membranblemmer, cellekrymping og DNA-fragmentering [20, 25].

Proteiner som tilhører Bcl-2 familien er ansvarlige for regulering av den mitokondrielle apoptose signalveien. *p53* har en viktig rolle i regulering av Bcl-2 proteiner, men mekanismen er ikke helt kartlagt. Bcl-2 proteiner styrer mitokondrie-membranpermeabilitet og kan enten være pro-apoptotisk (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bikk og Blk) eller anti-apoptotisk (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, BclXS, Bcl-w, BAG). Alle disse regulerer frigjøring av cytokrom c fra mitokondria ved endring av permeabilitet [20].

Dødsreseptorindusert signalvei kan utløses ved signalisering fra dødsreseptorer (DR), for eksempel tumornekrosefaktorreseptor (TNFR) og Fas-reseptor. Når reseptoren har bundet ligand blir en rekke molekyler rekruttert til dødsdomenet (DD). Ligander/DR som er best beskrevet ved apoptose er FasL/FasR og TNF- α /TNFR1, og disse bindes til proteiner med lignende DD. FasL/FasR bindes til Fas-assosiert dødsdomene (FADD). Reseptorkomplekset og FADD assosieres med procaspase-8 ved dimerisering og det blir dannet døds-induserende signalkompleks (DISC), og resultatet blir autoaktivering av procaspase-8. Caspase-8 kan deretter aktivere procaspase-3. En kobling mellom den mitokondrielle og dødsreseptorinduserte signalveien kan skje når caspase-8 spalter Bid til "truncated" Bid (tBid). tBid er i stand til å translokere fra cytosol til den mitokondrielle membranen, som forsterker oligomeriseringen av Bax og aktiverer den mitokondrielle signalveien [20, 25, 26].

Effektorfasen blir styrt av caspase-3 som igjen aktiveres av initiator-caspaser (caspase-8, -9 eller -10; Figur 1.6). Caspase-3 aktiverer den spesifikke endonukleasen kalt caspase-aktivert DNase (CAD). Vanligvis er CAD i et kompleks med sin inhibitor ICAD. Når caspase-3 blir aktivert i apoptotiske celler spalter den ICAD, og CAD blir dermed frigjort. CAD degraderer DNA i kjernen og forårsaker kromatinkondensering [20].

1.3 Apoptose-indusere

1.3.1 Staurosporin

Staurosporin er et alkaloid som ble isolert fra bakterien *Streptomyces staurosporeus* i 1977 [27]. Den hovedbiologiske aktivitet av staurosporin er hemming av proteinkinase C (PKC). PKC er en familie av fosforylerende enzymer som spiller viktige roller i signaltransduksjon og andre cellulære prosesser [28]. Staurosporin beskrives som en sterk apoptoseinduser i mange celletyper og induserer apoptose i stor grad ved den mitokondrielle apoptosesignalveien. Staurosporin induserer apoptose i melanomceller når konsentrasjonen er så lav som 100 nM og effekten er størst ved 1 μ M [29]. Etter at HEK 293 celler ble stimulert av staurosporin (0, 250 og 500 nM) i løpet av 14 timer, viste resultater fra Western blotting gelbånd av caspase-3 i aktivform etter 4 timers stimulering ved konsentrasjon 500 nM [30].

1.3.2 Leu-Leu-OMe

Leu-Leu-OMe er en lysosomotropisk (trenger inn i lysosomer ved endocytose) stoff som konverteres til en membranolytisk komponent (LeuLeu)_n-OMe ($n > 3$) av dipeptidylpeptidase I og dreper human leukocytter som T-celler og monocytter. Leu-Leu-OMe har vært attraktiv for sin selektive cytotoksiske aktivitet og kan være et alternativ til immunsuppressive stoffer [31]. Det er rapportert at dannelse av (LeuLeu)_n-OMe er nødvendig for DNA-fragmentering og cellemembran-ødeleggelse i Leu-Leu-OMe-indusert apoptose. Det er foreløpig ikke kartlagt hvordan lysosomal skade fører til DNA-fragmentering [32].

1.3.3 Brefeldin A

Brefeldin A (BFA) er en sopp metabolitt som ødelegger struktur og funksjon av golgiapparatet. BFA har vist å indusere apoptose i ulike humane cellelinjer, leukemiske celler eller kreftceller. BFA ble testet på cellelinjer fra glioblastom (cerebral tumor) sammenlignet med ustimulerte kontrollceller. Omtrent 60 % hemming av cellevekst ble observert etter behandling med BFA (100 ng/ml) i 24 timer [33].

1.3.4 Bafilomycin A1

Bafilomycin A1 er et makrolid antibiotikum isolert fra *Streptomyces sp.* Den er en svært spesifikk hemmer av vakuoler H⁺-ATPase (V-ATPase) [34]. V-ATPase finnes i membraner av ER, golgiapparat og vakuoler, og den genererer elektrokjemisk gradient for protoner som

er nødvendig i transport av metabolitter og pH-regulering. V-ATPase hemmes delvis av bafilomycin A1 (10 nM) og ved høyere konsentrasjoner som 500 nM hemmes cellevekst og apoptose induseres [35, 36].

1.4 Proteaser

Proteaser er enzymer som hydrolyserer peptidbindinger. Disse blir klassifisert etter deres katalytiske mekanismer og inndeles i seks ulike grupper: Asparat-, cystein-, glutamat-, metallo-, serin- og treoninprotease. Disse blir igjen delt i eksopeptidaser, som spalter nær terminalen av en polypeptidekjede, og endopeptidaser, som spalter peptidbindinger inne i målproteiner [25].

Cysteinproteaser er en stor gruppe proteolytiske enzymer som blir delt i omtrent 30 forskjellige familier basert på molekylstruktur. Fire familier av cysteinproteaser er kjent i pattedyr. Den største er papain-familien (C1) som inkluderer cathepsin B, H, L, S med flere. Disse er lysosomale enzymer som er ansvarlige for protolyse i det lysosomale- og endosomale system. De blir også skilt ut av cellene og virker ekstracellulært. I cytosolfraksjonen er det to andre familier av cysteinendopeptidaser: Calpain (C2) og caspaser (C14). Legumain er lysosomal enzym som tilhører familie C13 i lista over cysteinendopeptidaser fra pattedyr. Legumain hydrolyserer spesifikt karboksyterminalt for aminosyren aspargin [37].

1.4.1 Caspaser

Caspaser er en gruppe proteaser involvert i regulering og gjennomføring av apoptose. Disse er cysteinproteaser av CD14 familien. Caspaser er hovedsaklig lokalisert i cytoplasma og hemmes ikke av cysteinproteasehemmeren E64 [25]. Caspaser er uttrykt som inaktive proenzymer og blir aktivert ved spalting i aminosyre aspartat når cellen får et apoptotisk signal. Det er beskrevet 14 caspaser fra pattedyr. Caspase-2, -8, -9 og -10 består av et langt N-terminalt prodomene og initierer celledød. Disse aktiverer effektorcaspasene, caspase-3, -6 og -7, som har et kort prodomene. Sistnevnte forårsaker apoptose ved spalting av viktige cellulære substrater. Blant annet er poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) et reparasjonsenzym som blir spaltet av caspase-3 og -7, og dette utløser apoptotisk celledød. I tillegg blir komponenter av kjernelamina fortrinnsvis spaltet av caspase-6, som fører til apoptose. Caspaser kan aktivere hverandre og forsterke en proteasekaskade [38, 39].

1.4.2 Legumain

Legumain er en cysteinprotease i C13-familien og spalter peptidbindinger i karboksylgruppen av aspargin (Asn). Den ble først funnet i plantefrøet fra *Vicia sativa L.* (1982) og ble kalt for protease B [40]. I 1997 ble legumain klonet og sekvensert fra human placenta og grisnyrer [37]. Undersøkelser på mus og rotte viste at legumain er lokalisert i lysosomer og aktiviteten observeres etter at organellen er ødelagt. Enzymet ble funnet uttrykt i alle undersøkte musevev, men mest i nyrer og placenta [41].

Proenzymet av legumain foreligger enzymatisk inaktiv på 56 kDa ved nøytral pH, og autoaktiveres til 46 kDa ved sur pH 4,5 [42]. Videre spaltning til den aktive formen av legumain på 36 kDa kan skje av ukjente proteaser [43].

Studier har vist at progelatinase A (proMMP-2) er et substrat av legumain, og som er viktig i utvikling av kreft ved angiogenese og metastase. Legumain er sett i flere typer tumorer for eksempel tykktarm-, prostata- og brystkreft [37, 44]. Hos pattedyr er legumain identifisert som en hemmer av osteoklastdannelse og er forbundet med benresorpsjon [45]. Studier har vist at legumain er uttrykt i både murine og humane aterosklerotiske lesjoner. Makrofagspesifikt uttrykk av legumain *in vivo* og evnen legumain har til å indusere kjemotakse av monocytter og endotelceller *in vitro* foreslår at legumain kan påvirke aterosklerose [46]. Legumain kan spille en viktig rolle i prosessering av antigener til vevstypekomplekset MHC klasse II [47]. Det finnes ulike proteaser i hjernen som forårsaker hjerneslag og legumain ble også observert etter eksperimentelt hjerneslag i rotter [48]. Nylig er det vist at legumain er nødvendig for normal nyrefysiologi og homeostase [49]. Det er flere andre legumainsubstrater enn proMMP-2 som er identifisert; ekstracellulært matriksprotein fibronektin, procathepsin B, L, H, og α -thymosin [48]. Cathepsiner tilhører cysteinprotease C1-familien. Frigjøring av cathepsiner fra lysosomer til cytoplasma er nødvendig for regulering av apoptose. Studier har vist at cathepsin B, L og D er involvert i regulering av apoptose (figur 1.6) ved forskjellige mekanismer: direkte påvirker mitokondria og gi cytokrom c-frigjøring eller danne reaktive oksygen "species" (ROS) som direkte eller via fosfolipase A2 (PLA2). Dette fører til destabilisering av membranen av intracellulære organeller som lysosomer og mitokondria ved degradering av membranfosfolipider [25].

Legumainaktivitet blir hemmet med både cystatin isolert fra egghvite fra kylling og human cystatin C, men ikke av E-64 som er en potent hemmer av de fleste lysosomale cathepsiner

[41]. Den mest potente endogene hemmeren av legumain er cystatin E/M med K_i på 0,00016 nM [50].

1.5 Mål med oppgaven

Apoptose er en viktig fysiologisk prosess som settes i gang for å fjerne unormale eller ødelagte celler. Caspaser er cytosoliske cysteinproteaser med sentrale roller i apoptose [20]. Cathepsiner er lysosomale enzymer som regulerer apoptose når de frisettes fra lysosomer til cytosol [25]. Legumain ligner på caspaser i struktur og aminosyresekvens [51] og er også et lysosomalt enzym, men funksjonen til dette enzymet er mindre kjent.

Studier har vist at statiner reduserer proliferasjon og induserer apoptose i ulike celletyper [13] og atorvastatin er vist å nedregulere legumain mRNA [15]. Denne studien ønsker å belyse en eventuell sammenheng mellom legumain og apoptose. Ved hjelp av cellemodeller som enten uttrykker lave nivåer av legumain (HEK 293 celler) eller som overuttrykker legumain (legumain-transfekteerte monoklonale HEK 293-M38L celler) vil følgende bli studert og sammenlignet:

- Effekt av atorvastatin og simvastatin (syre- og laktonform) på legumainaktivitet.
- Celleviabilitet (celledød) etter stimulering av statiner og andre apoptoseinduserende stoffer.
- Caspase-3-aktivitet som mål på apoptose etter stimulering med simvastatin laktonform eller staurosporin.

2. Materialer og metode

2.1 Kjemikalier og reagenser

Atorvastatin kalsiumsalt (A791750)	Toronto Research Chemicals (TRC), North York, Ontario, Canada
Atorvastatin-lakton (A791780)	Toronto Research Chemicals (TRC), North York, Ontario, Canada
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006)	Bachem, Bubendorf, Sveits
Bafilomycin A1 (B1793)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Brefeldin A (B 5936)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Bovint serumalbumin, BSA (23209)	Thermo Scientific, Rockford, USA
CHAPS, C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S (C3023-IG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, MTS (G3580)	Promega, Madison, Wiscosin, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), art nr. 41966-052	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dinatrium-EDTA, Na ₂ C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ (00 064)	Ferak Berlin, Tyskland
DMSO, dimetylsulfoksid (D 2650)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
DTT, ditiotretitol, C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂ (438117)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Føtalt kalveserum, FBS gold (PAA A15-649)	PAA Laboratorie, Paching, Australia
G418 disulfatsalt (G8168)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Glyserol 99,5 %, C ₃ H ₅ (OH) ₃ , (24388.249)	R.P. Normapur AR-Prolabo, Fontenays S/Bois, Frankrike
HEPES, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S (H0887)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
L-leucyl-L-leucin metylester, H-Leu-Leu-OMe·HBr (G-2550)	Bachem, Bubendorf, Sveits
Metanol, CH ₃ OH (1.06018.2500)	Merck, Darmstadt, Tyskland
N-acetyl-aspartat-glutamat-valin-aspartat-7-amino-4-metylkumarin, Ac-DEVD-AMC (I- 1660)	Bachem, Bubendorf, Sveits

Na ₂ EDTA	Chemi-Technique, Berlin, Tyskland
Natriumdihydrogenfosfat, NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumhydroksid, NaOH (6495)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid, NaCl (1.06404.1000)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natiumpyruvat (11360-039)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Penicillin (100 U/ml)-Streptomycin (100 µg/ml) PAA, P11-010	PAA Laboratorie, Paching, Australia
Simvastatin-lakton (S485000)	Toronto Research Chemicals (TRC), North York, Ontario, Canada
Simvastatin hydroksysyre (S485020)	Toronto Research Chemicals (TRC), North York, Ontario, Canada
Sitronsyre, C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O (1.00244.1000)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Staurosporin (S 6942)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Trypanblått (17262-25)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Z-Ala-Ala-Asn-NHMec, legumainsubstrat	Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK

2.2 Utstyr

Esco class II type A2 Biohazard safety LAF-benk	Esco, Singapore
Celleskraper 24 cm (99002)	TPP, Sveits
Countess, automatisk celleteller (C10227)	Invitrogen, CA, USA
Corning 75 cm ² dyrkningsflaske (3275)	Corning, NY, USA
Costar 6-brønners Brett (3506)	Corning, NY, USA
Costar 96-brønners mikrotiterplate, svart (3915)	Corning, NY, USA

Dri-Block DB-2A	Techne, Cambridge, Storbritania
Holten Lamin Air LAF-benk	Medinor, Oslo, Norge
Inkubatorskap (modell 3548)	Forma Scientific, Ohio, USA
Kubota 2010 sentrifuge	Medinor, Oslo, Norge
Leica DMLS mikroskop	Leica Mikroskopie & Systeme, Wetzlar, Portugal
Nunc 96-brønners mikrotiterplate (260836)	Nunc, Roskilde, Danmark
Olympus CKX41 lysmikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
VibraCell sonikator	Sonics & materials, Danbury, CT, USA
Universal 32 R sentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
Wallac 1420 Victor ³ Multilabel counter, mikroplateleser	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA
Wallac WorkOut programvare	PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA

2.3 Cellelinjer

2.3.1 HEK 293 celler

”Human embryonic kidney” 293 (HEK 293; American Type Culture Collection, CRL-1573) er adherente celler ved 37 °C. Under hele laboratoriearbeidet ble det benyttet aseptisk teknikk og LAF-benk for å hindre kontaminering. HEK 293 vekstmedium (vedlegg A) var DMEM tilsatt 10 % føtalt bovint serum (FBS), 1 % penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 µg/ml) og 1 % natriumpyruvat (110 mg/L).

2.3.2 Tining

HEK 293 celler var oppbevart nedfrosset i flytende nitrogen, og ble tint i vannbad ved 37 °C i cirka ett minutt. Deretter ble cellesuspensjonen overført til 12 ml vekstmedium i en Corning 75 cm² dyrkningsflaske og satt til inkubering ved 37 °C og 5 % CO₂. Mediet ble skiftet dagen etter for å fjerne rester av DMSO (5 % i frysemediet).

2.3.3 Dyrking, splitting og telling

HEK 293 celler ble dyrket i en Corning 75 cm² dyrkningsflaske ved 37 °C og 5 % CO₂, og nytt vekstmedium ble tilsatt omtrent hver 3. dag.

Cellene ble splittet en gang i uken når de var omtrent 80-90 % konfluente. Vekstmedium ble sugd av og cellene vasket med DMEM (uten tilsetninger). For å løsne cellene ble 2 ml trypsin-EDTA (0,5 % i serumfritt DMEM; vedlegg B) tilsatt. Deretter ble 10 ml vekstmedium med 10 % FBS tilsatt for å deaktivere trypsin. Cellene ble sentrifugert (800 rpm i 5 minutter) og cellepelleten resuspendert med 5 ml nytt vekstmedium. Cellekonsentrasjon i flasken ble bestemt ved hjelp av celleteller (Countess counter). Cellesuspensjon (10 µl) ble blandet med 10 µl 0,4 % sterilfiltrert tryptanblått. Celletelleren ga verdi for totalt antall celler, som ble grunnlag for beregningen av uttak til celleforsøk. Cirka 1x10⁶ celler ble overført til 10 ml vekstmedium i en ny Corning 75 cm² dyrkningsflaske og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.3.4 Stabil transfeksjon av HEK 293

HEK 293 cellelinjen ble brukt til å lage stabile transfektanter som overutrykte legumain og metoden ble i hovedsak utført av avdelingsingeniør Åse-Karine Fjeldheim. Transfeksjonsmetoden som ble brukt baserte seg på liposom-mediert transfeksjon ved hjelp av Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Plasmidene som ble brukt var kontrollplasmid pcDNA3.1 (Invitrogen) og LGMN-pcDNA3 som inneholder humant legumain cDNA (mottatt av Daniel Keppler, College of Pharmacy, Touro University, CA, USA). Gentamycin (G418 disulfatsalt) ble brukt som seleksjonsantibiotika. Monoklonal klon 38 (M38L) viste høyest legumainaktivitet i cellelysatet av alle enkeltklonene som ble selektert og denne klonen ble valgt til videre studier og er brukt i denne oppgaven.

2.4 Høsting og enzymaktivitetsmåling

2.4.1 Legumain

Høsting: Vekstmedium ble sugd av og hver brønn vasket forsiktig med 1 ml 1x fosfatbufret saltvann (PBS; vedlegg C). Vaskebufferen ble fjernet og hver brønn ble tilsatt 0,5 ml lysisbuffer (vedlegg D) og lysatet overført til merkede eppendorfrør. Lysatene ble raskt nedfrost og tint i henholdsvis -70 og +30 °C, i tre syklus, før de ble sentrifugert ved 10 000 G

og 4 °C i 5 minutter. Til slutt ble supernatanten overført til nye og merkede eppendorfrør og oppbevart nedfrost før analyse.

Enzymaktivitetsmåling: Det benyttes et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-NH₂Mec) for å måle legumainaktivitet. Peptidsubstratet blir spaltet av legumain, og den fluorescerende ”leaving”-gruppen NH₂Mec gir økning i fluorescens og dette måles kinetisk over tid i en mikroplateleser (Wallac 1420 Victor³ multilable counter). Legumain assaybuffer (vedlegg E) blir tilsatt reduksjonsmiddel ditiotreitoll (DTT; vedlegg F) som gjør cysteinproteaser aktive [52].

En svart 96-brønners mikrotiterplate ble brukt og 20 µl av cellelysatprøver og blankprøve (lysisbuffer) ble fordelt i triplikater. Mikrotiterplaten ble satt i plateleseren og autoinjektor nr. 1 og 2 injiserte henholdsvis legumain assaybuffer tilsatt DTT og legumain substratløsning (vedlegg G). WorkOut programvaren ble innstilt på følgende parametre: 1) temperatur 30 °C, 2) tilsetning av 100 µl assaybuffer, risting og venting i 10 minutter for å sikre at reduksjonsmiddel (DTT) gjorde at cysteinproteaser var aktive, og 3) rett før måling ble 50 µl substratløsning tilsatt slik at sluttkonsentrasjon var 10 µM. Endring i fluorescens (ΔF/s) ble målt 10 ganger med ett minutt pause mellom hver måling ved 360 nm eksitasjon og 460 nm emisjon.

2.4.2 Caspase-3

Høsting: Cellene ble forsiktig skrapet løse i vekstmedium. Deretter ble hele løsningen overført til merkede eppendorfrør og sentrifugert ved 800 rpm og romtemperatur i 5 minutter. Videre ble supernatanten kastet og cellepeletten tilsatt 0,5 ml caspasebuffer med DTT (vedlegg H og I), mens eppendorfrørene stod på is. Cellene ble lysert ved sonikering med amplitude 40 i 20 sekunder og lysatet ble sentrifugert ved 10 000 G og 4 °C i 5 minutter. Supernatantene ble overført til nye og merkede eppendorfrør og oppbevart nedfrost før analyse.

Enzymaktivitetsmåling: Denne metoden er svært lik målingen av legumainaktivitet, bortsett fra at det blir brukt en annen buffer (caspasebuffer) og en annen substratløsning (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC; vedlegg J).

En svart 96-brønners mikrotiterplate ble benyttet og 120 µl av cellelysatprøver og blankprøve (caspasebuffer) ble fordelt i triplikater. Kun injektor nr. 2 i plateleseren ble brukt og den

tilsatte 50 μl substratløsning (sluttkonsentrasjon 20 μM) rett før måling. Endring i fluorescens ($\Delta F/s$) ble målt 10 ganger med 3 minutter mellom hver måling ved en eksitasjon bølgelengde på 380 nm og emisjon bølgelengde på 460 nm.

2.5 Totalproteinmåling

Metoden går ut på at Coomassie-fargestoff i sur løsning bindes til proteiner. Bindingen til proteiner fører til en absorpsjonsendring fra 465 til 595 nm og absorbans ved 595 nm blir målt i en mikroplateleser [53].

Standard var en fortykning av bovint serumalbumin i relevante buffere (lysisbuffer eller caspasebuffer) i konsentrasjonsområdet 0-300 $\mu\text{g/ml}$. Et volum på 10 μl av standard eller cellelysatprøver i duplikater ble tilsatt en transparent 96-brønners mikrotiterplate. Fargestoffet (Protein Assay Dye Reagent Concentrate) var fortyknet (1:5) i destillert vann (vedlegg K) og 200 μl av denne fargeløsningen ble tilsatt hver brønn ved romtemperatur i cirka 5 minutter før måling. Det ble laget en standardkurve av albuminfortynninger og den ble brukt for å finne ut totalproteinkonsentrasjonen i cellelysatprøvene. En lavere albuminstandardkurve (0-150 $\mu\text{g/ml}$) ble benyttet ved prøver med lavere enn 50 $\mu\text{g/ml}$ totalproteinverdier. Da ble det fordelt 20 μl i duplikater av cellelysatprøver og tilsetning av 200 μl fortyknet fargestoff.

2.6 Viabilitetsmåling

Denne metoden går ut på måling av metabolske aktive celler, der NADPH eller NADH blir dannet av dehydrogenase-enzymmer. Dette fører til en reduksjon av MTS-reagens (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay) til farget formazon. Absorbansmåling av formazon i en mikroplateleser ved 490 nm er direkte proporsjonalt med antall levende celler [54].

HEK 293 celler ble sådd ut og stimulert med ulike apoptoseinduserende stoffer i transparente 96-brønners brett. Ved tidspunkt for måling av celleviabilitet ble cellene tilsatt 20 μl av MTS-reagens direkte i det kondisjonerte mediet og inkubert i 1 time ved 37 °C og 5 % CO₂, før absorbans ble avlest ved 490 nm med programvaren WorkOut. Prøveverdiene ble fratrukket blankprøveverdien, hvor blankprøven bestod av vekstmedium uten eller med 0,5 % DMSO

for eventuelt å korrigere løsningsmiddelets effekt for de aktuelle apoptoseinduserende stoffene.

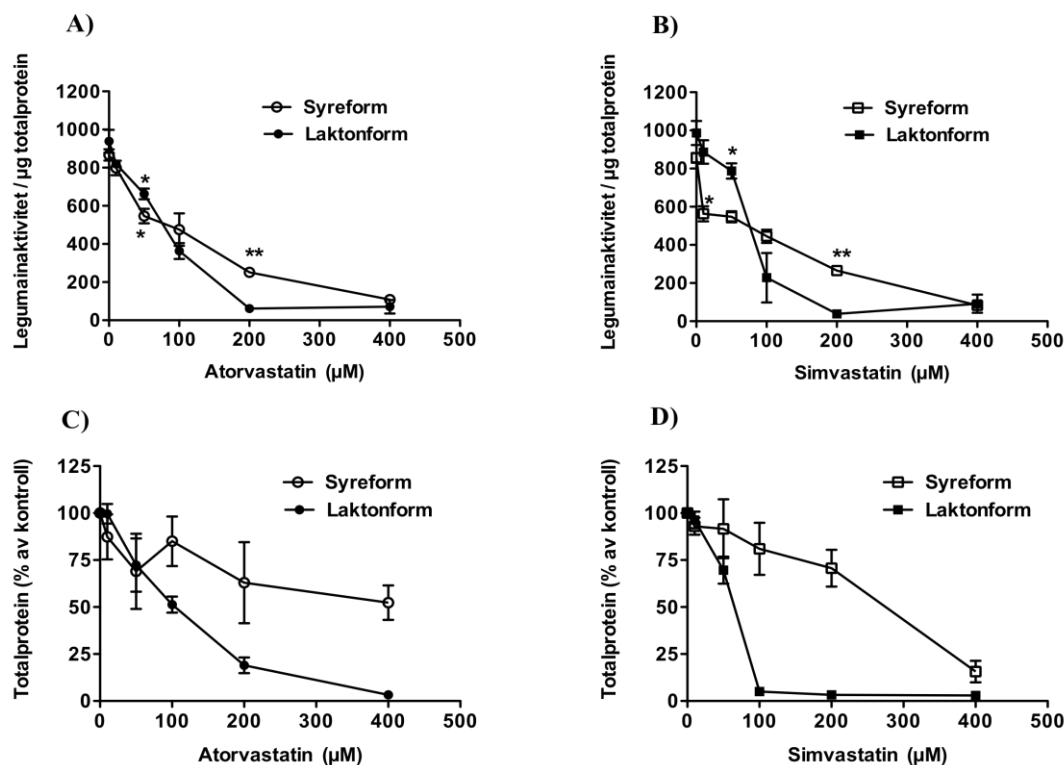
2.7 Statistikk

Det ble brukt tre forskjellige statistiske metoder for å analysere resultatene. Wilcoxon test ble brukt for å sammenligne prøver med kontrollceller og er merket av i figurene med en stjerne (*). Mann-Whitney test ble benyttet for å sammenligne samme konsentrasjoner av to ulike former av statiner og er merket av i figurene med to stjerner (**). I tillegg ble det brukt lineær regresjon for å analysere resultater som grafisk fremstilt ga tilnærmet rette linjer. IC₅₀-verdiene er beregnet etter gjennomsnitt av tre forsøk á to paralleller ved hjelp av det statistiske programmet GraphPad. I denne oppgaven ble det valg et signifikansnivå på 5 %, dvs. $p < 0,05$.

3. Resultater

3.1 Atorvastatin og simvastatin (syre- og laktonformer) reduserer legumainaktivitet i HEK 293- og M38L-celler

Statiner er kolesterolsenkende legemidler som hemmer det hastighetsbegrensede enzymet HMG-CoA-reduktase i kolesterolsyntesen.



Figur 3.1 Legumainaktivitet (A, B) og totalprotein (C, D) i M38L-celler etter behandling med ulike konsentrasjoner av syre- eller laktonform av atorvastatin (A, C) eller simvastatin (B, D). M38L-celler ($2,5 \times 10^5$) som overuttrykker legumain ble sådd ut og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før nytt vekstmedium ble tilsatt med atorvastatin eller simvastatin (syre- eller laktonform; 10, 50, 100, 200 og 400 µM). Celler med begge laktonformene og tilhørende kontrollceller ble tilsatt 0,5 % DMSO. Etter 24 timers inkubering ble cellene høstet i lysisbuffer. Cellelysaten ble analysert for legumainaktivitet ($\Delta F/s$) med et fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-NHMec) og aktivitet beregnet i forhold til µg totalprotein +/- SEM (n=3 á to paralleller). **A, B.:** Legumainaktivitet per µg totalprotein. **C, D.:** Normaliserte verdier av totalprotein i forhold til ubehandlede kontrollceller (100 %). * viser $p < 0,05$ i forhold til kontroll (Wilcoxon test), ** $p < 0,05$; forskjell mellom tilsvarende konsentrasjon av statinformene (Mann-Whitney test).

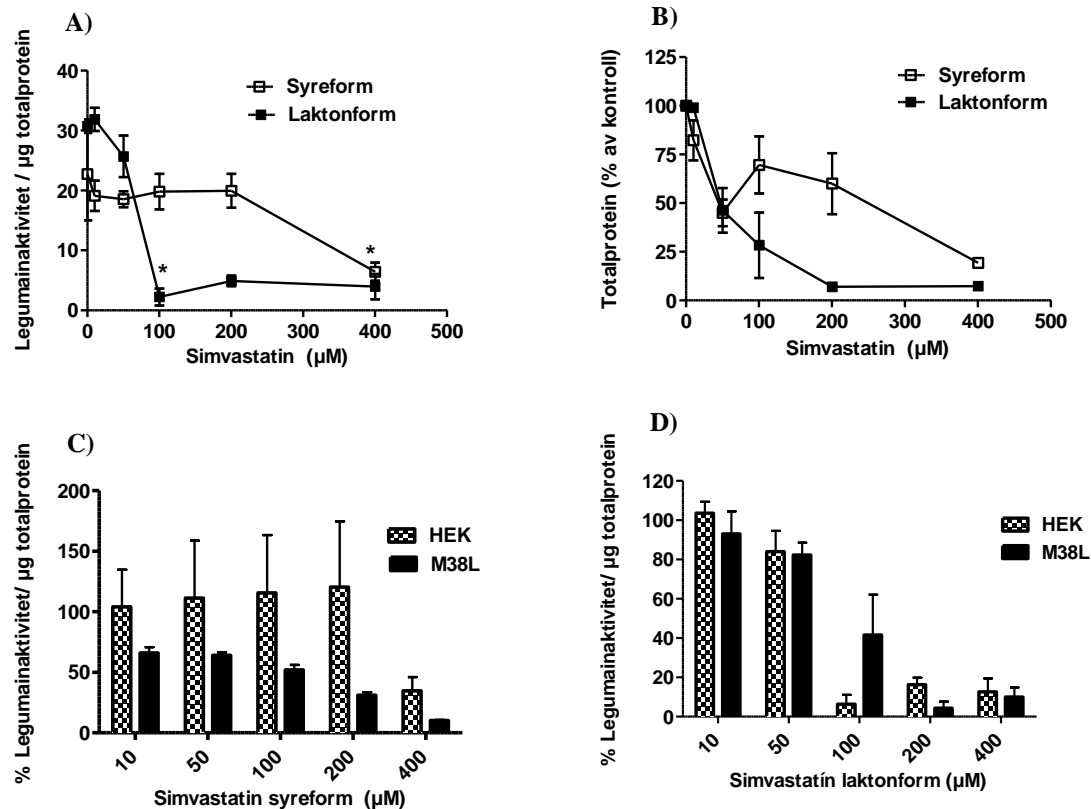
Studier har vist at statiner har pleiotrope effekter, blant annet ved å nedregulere legumain mRNA i aterosklerotiske ustabile plakk [15]. Derfor var det ønskelig å undersøke om statiner

også kan påvirke aktiviteten av legumain, og dette ble studert i legumaintransfektete HEK 293 celler (M38L).

M38L-celler som overuttrykker legumain ble stimulert med atorvastatin og simvastatin i 24 timer. Konsentrasjoner på 50 μM og over viste en signifikant reduksjon av legumainaktivitet av begge statiner, både syre- og laktonform. Også 10 μM simvastatinsyre ga en signifikant redusert aktivitet sammenlignet med ubehandlede kontrollceller (figur 3.1A og B). En analyse ved hjelp av lineær regresjon av alle resultater mellom 0 og 200 μM atorvastatin viste en signifikant reduksjon ($p < 0,0001$) i legumainaktivitet både for syreformen (stigningstall: $-2,94 \pm 0,3191$) og for laktonformen (stigningstall: $-4,306 \pm 0,2468$). Atorvastatin syreform hemmet 50 % av legumainaktiviteten ved en beregnet konsentrasjon på 93 μM (IC_{50}) og atorvastatin laktonform ga IC_{50} på 65 μM (tabell I). Tilsvarende viste resultatene for simvastatin (0-200 μM) også en signifikant reduksjon av legumainaktiviteten ($p < 0,0001$) både for syreformen (stigningstall: $-2,328 \pm 0,2881$) og for laktonformen (stigningstall: $-4,788 \pm 0,5572$). I tillegg ble det beregnet at simvastatin syreform hadde en IC_{50} på 79 μM , mens laktonformen hadde IC_{50} på 62 μM (tabell I). Resultatene viste at begge laktonformene hemmer 50 % legumainaktivitet ved en lavere konsentrasjon (IC_{50}) enn syreformen. Ved konsentrasjonen 200 μM ble det for begge statiner observert en signifikant større reduksjon av legumainaktivitet ved behandling med laktonformen sammenlignet med syreformen (Fig 3.1A og B).

Tabell I: IC_{50}-verdier for legumain i HEK 293- og M38L-celler etter behandling med statiner i 24 timer.			
Cellelinjer	Statiner	Form	IC_{50} (μM)
HEK 293	Simvastatin	Syre	185
		Lakton	63
M38L	Atorvastatin	Syre	93
		Lakton	65
	Simvastatin	Syre	79
		Lakton	62

Vi observert også en nedgang i totalproteinverdiene med økende konsentrasjon av statinene (figur 3.1C og D). Resultatene viste en klart større effekt på totalproteininnholdet av laktonformene enn av syreformene for begge statiner (figur 3.1C).

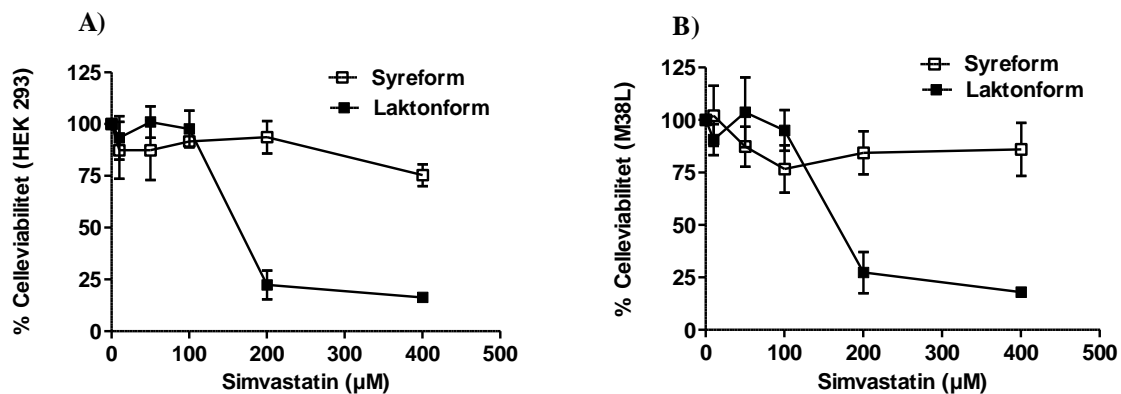


Figur 3.2 Legumainaktivitet (A), totalprotein (B) i utransferte HEK 293 celler og legumainaktivitet i prosent (C, D) både i HEK 293- og M38L-celler etter behandling med ulike konsentrasjoner og former av simvastatin. HEK 293- og M38L-celler ($2,5 \times 10^5$) ble sådd ut og inkubert ved 37°C og 5% CO_2 i 24 timer før nytt vekstmedium ble tilsatt med simvastatin (syre- eller laktonform; 10, 50, 100, 200 og 400 μM). Laktonformen og tilhørende kontrollceller var tilsatt 0,5 % DMSO. Etter 24 timers inkubering ble cellene høstet i lysisbuffer. Cellelysaten ble analysert for legumainaktivitet ($\Delta\text{F}/\text{s}$) med et fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-NHMec) og beregnet i forhold til μg totalprotein \pm SEM ($n=3$ á to paralleller). B. Normaliserte verdier av totalprotein. C,D. Normaliserte verdier som angir legumainaktivitet i prosent per (μg) totalprotein i forhold til ubehandlede kontrollceller (100 %). * viser signifikant forskjell i forhold til kontroll (Wilcoxon test).

Videre ble det studert hvordan utransferte HEK 293 celler responderte på tilsvarende konsentrasjoner av statiner. De videre studiene ble begrenset til simvastatin syre- og laktonform. En signifikant reduksjon av legumainaktivitet i forhold til kontrollceller ble observert av simvastatin i laktonformen ved konsentrasjoner på 100-400 μM (figur 3.2A). For syreformen ble redusert aktivitet bare observert ved 400 μM (figur 3.2A). I tillegg viste resultatene at simvastatin i laktonformen reduserte totalproteinmengden mer enn syreformen (figur 3.2B). Ved HEK 293 hadde simvastatin syreformen hemmet 50 % av legumainaktiviteten ved en beregnet konsentrasjon på 185 μM (IC_{50}) og laktonformen ga IC_{50} på 63 μM (tabell I).

For å sammenligne hvordan HEK 293- og M38L-celler responderte på simvastatin i syre- og laktonform, ble dataene fra figur 3.1 og 3.2 brukt. Resultatene indikerte at M38L-cellene var mer ”følsomme” for effekt av simvastatin enn HEK 293 celler, og at syreformen påvirket mer enn laktonformen på bakgrunn av prosentvis lavere legumainaktivitet enn tilsvarende kontroll (figur 3.2C) og lavere IC₅₀-verdi (tabell I). For simvastatin laktonform responderte de to celletypene likt (unntatt 100 µM; figur 3.2D) og IC₅₀-verdiene for begge var nesten like (tabell I).

Under lysmikroskop ble endret morfologi observert som løse celler etter behandling med simvastatin (syre- og laktonform ≥100 µM) både i HEK 293- og M38L-celler i 24 timer.

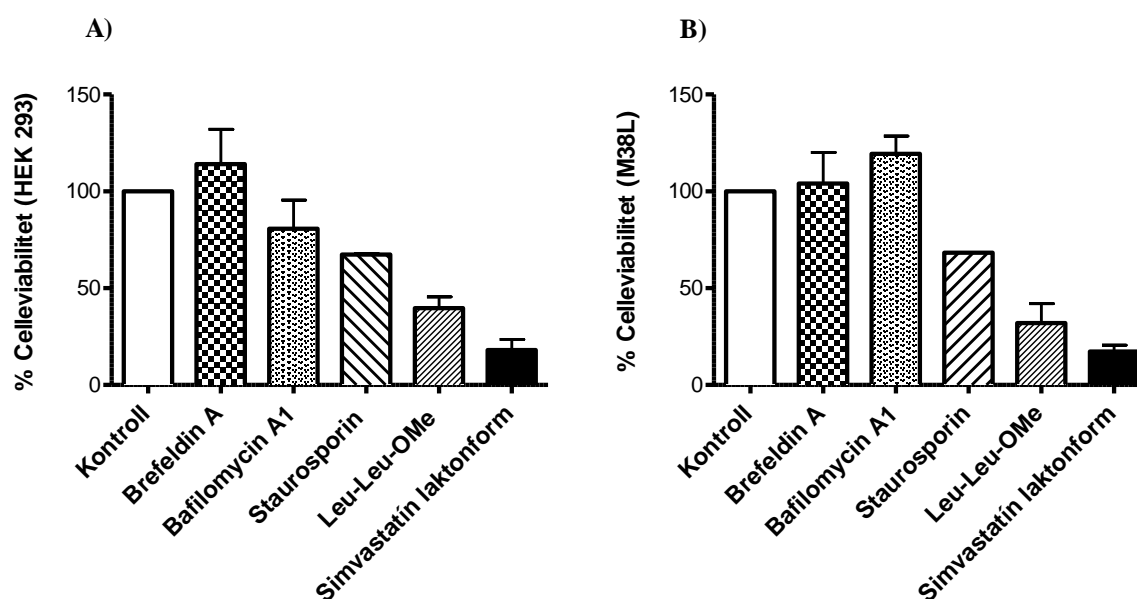


Figur 3.3 Effekt av simvastatin på celleviabilitet av HEK 293- (A) og M38L-celler (B). HEK 293- og M38L-celler ($1,0 \times 10^5$) ble sådd ut og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før nytt vekstmedium ble tilsatt med simvastatin (syre- eller laktonform; 10, 50, 100, 200 og 400 µM). Laktonformen og tilhørende kontrollceller var tilsatt 0,5 % DMSO. Etter ytterligere 24 timers inkubering ble cellene tilsatt MTS-reagens og absorbanse (490 nm) ble målt etter en time. Figurene angir normaliserte verdier i forhold til ubehandlede kontrollceller (100 %) og viser gjennomsnitt +/- SEM (n=3 á tre paralleller).

MTS-assay ble benyttet for å måle celleviabilitet både av HEK 293- og M38L-celler etter behandling med begge former av simvastatin i ulike konsentrasjoner (figur 3.3A og B). Resultatene viste at celleviabiliteten ble redusert av simvastatin laktonform i konsentrasjoner på 200-400 µM for begge celletyper. Reduksjon i celleviabilitet var ved 200 µM laktonform henholdsvis 77 % (HEK 293) og 72 % (M38L). Derimot var det liten effekt på celleviabilitet ved stimulering med simvastatin syreform i begge celletypene. Det ble ikke observert signifikante forskjeller på celleviabilitet mellom HEK 293- og M38L-celler.

3.2 Effekt av ulike apoptoseinduserende stoffer på HEK 293- og M38L-celler

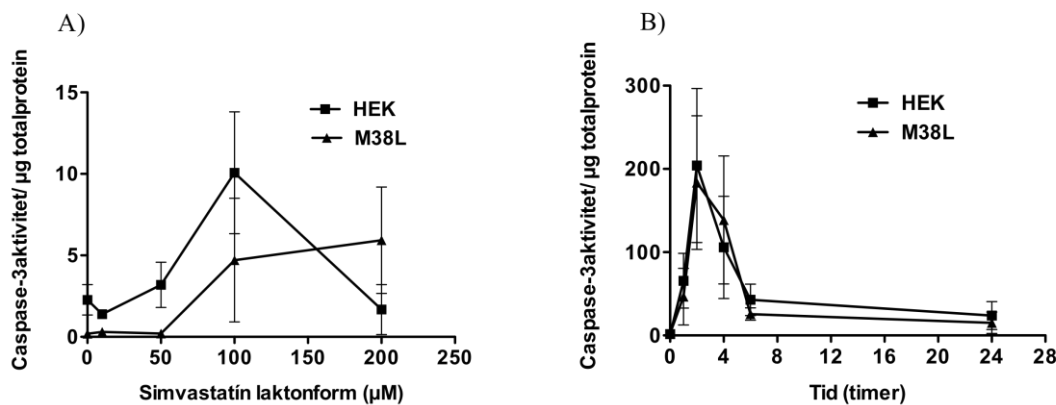
HEK 293- og M38L-celler ble stimulert med ulike apoptoseinduserende stoffer i 24 timer: brefeldin A (10 µg/ml), bafilomycin A1 (25 nM), staurosporin (500 nM), Leu-Leu-OMe (3 mM) og simvastatin laktonform (200 µM). MTS-assay ble brukt for å måle celleviabilitet. Resultatene viste at brefeldin A (10 µg/ml) ikke reduserte celleviabilitet verken til HEK 293 (figur 3.4A) eller M38L-celler (figur 3.4B). Bafilomycin A1 (25 nM) viste 20 % reduksjon i celleviabilitet av HEK 293 celler, men derimot en økning på 20 % i M38L-celleviabilitet. Staurosporin (500 nM) reduserte i gjennomsnitt ca. 32 % celleviabilitet i forhold til kontrollceller for både HEK 293- og M38L-celler. Etter stimulering med Leu-Leu-OMe (3 mM) ble celleviabiliteten redusert 60 % (HEK 293) og 68 % (M38L). Størst effekt hadde simvastatin laktonformen som reduserte celleviabiliteten med 80 % for begge celletypene. Ingen av de observerte forskjellene mellom celletypene var signifikante.



Figur 3.4 Effekt av apoptoseinduserende stoffer på celleviabilitet av HEK 293- (A) og M38L-celler (B). HEK 293- og M38L-celler ($1,0 \times 10^5$) ble sådd ut og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før nytt vekstmedium ble tilsatt 10 µg/ml brefeldin A, 25 nM bafilomycin A1, 500 nM staurosporin, 3 mM Leu-Leu-Ome eller 200 µM simvastatin laktonform. Alle stoffene og tilhørende kontrollceller unntatt Leu-Leu-OMe ble tilsatt 0,5 % DMSO. Etter 24 timers stimulering ble cellene tilsatt MTS-reagens og absorbans (490 nm) ble målt etter en time. Normaliserte verdier i forhold til ubehandlede kontrollceller (100 %) er vist som gjennomsnitt +/- SEM (n=2-3 á tre paralleller).

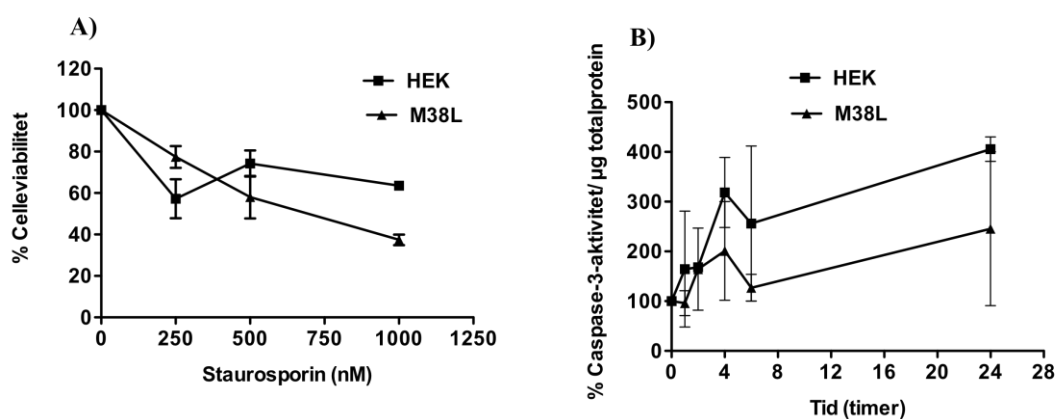
3.3 Caspase-3-aktivitet i HEK 293- og M38L-celler etter stimulering med simvastatin laktonform eller staurosporin

Caspaser har en sentral rolle i aktivering av apoptose, og caspase-3 er en effektorcaspase som blir aktivert av initiator-caspaser (caspase-8, -9 eller -10). Deretter aktiverer caspase-3 den spesifikke endonukleasen CAD som degraderer DNA i kjernen [20]. Caspase-3-aktivitet ble målt ved hjelp av et fluorescerende peptidsubstrat (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) og studert etter 6 timers stimulering med simvastatin laktonform (10, 50, 100 og 200 μM) på HEK 293- og M38L-celler (figur 3.5A). Resultatene viste ganske stor spredning i caspase-3-aktiviteten ved alle konsentrasjonene, men den så ut til å være høyest etter stimulering med 100 μM simvastatin laktonform for HEK 293. Generelt så det ut til å være mindre caspase-3-aktivitet i cellene som overuttrykker legumain (M38L) unntatt ved 200 μM simvastatin lakronform. Det ble videre undersøkt hvilken effekt simvastatin laktonform hadde på caspase-3-aktivitet i løpet av 24 timer (figur 3.5B). Aktivitetsdataene viste også her stor spredning, men aktiviteten var sammenfallende for begge celletyper og størst etter 2 timers stimulering. Dataene gir en indikasjon, men det var umulig å trekke konklusjon på grunn av stor spredning på målingene og for få forsøk.



Figur 3.5 Caspase-3-aktivitet etter behandling med simvastatin laktonform i (A) ulike konsentrasjoner (dose-respons) eller (B) ulike tider (tids-respons). HEK 293- eller M38L-celler ($2,5 \times 10^5$) ble sådd ut og inkubert ved 37 °C og 5 % CO_2 i 24 timer før nytt vekstmedium ble tilsatt med (A) simvastatin laktonform (0, 10, 50, 100, og 200 μM) i 6 timer eller (B) simvastatin laktonform (100 μM) i 0, 1, 2, 4, 6 og 24 timer. Kontrollcellene ble behandlet med 0,5 % DMSO. Cellene ble lysert ved sonikering og cellelysaten ble analysert for caspase-3-aktivitet ($\Delta F/s$) med et fluorescerende peptidsubstrat (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) og beregnet i forhold til μg totalprotein \pm SEM ($n=1-2$ å to paralleller).

Staurosporin er en velkjent apoptoseinduser og effekten av forskjellige doser (0, 250, 500 og 1000 nM) på celleviabilitet av HEK 293- og M38L-celler ble undersøkt. Staurosporin på 250 nM hemmet celleviabilitet mer av HEK 293- enn av M38L-celler, men ved høyere doser ble profilen motsatt (figur 3.6A). Spesielt ved 1000 nM staurosporin var celleviabilitet av M38L-celler hemmet med 62,5 %, mens celleviabiliteten av HEK 293 var redusert med 37,5 %. I tillegg var det interessant å se om og hvordan caspase-3-aktiviteten ble regulert i disse cellelinjene etter behandling med staurosporin. Cellene ble stimulert med staurosporin (500 nM) i ulike tider (0, 1, 2, 4, 6 og 24 timer) og generelt ble det observert økt caspase-3-aktivitet i HEK 293 celler ved lengre tids inkubering (fig. 3.6B). Resultatene viste stor spredning, og det var ikke mulig å fastslå om det forelå signifikante forskjeller mellom de to celletypene, men det var en tendens til at staurosporinstimulering ga mindre caspase-3-aktivitet i cellelinjen som overuttrykte legumain (M38L) i forhold til kontrollceller (HEK 293).



Figur 3.6 Caspase-3-aktivitet etter behandling med staurosporin (A) i ulike konsentrasjoner eller (B) ulike tider. HEK 293- eller M38L-celler ($2,5 \times 10^5$) ble sådd ut og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før nytt vekstmedium ble tilsatt med staurosporin i ulike konsentrasjoner (0, 250, 500 og 1000 nM; A) og staurosporin 500 nM i ulike tider (0, 1, 2, 4, 6 og 24 timer; B). Cellene ble lysert ved sonikering og cellelysaten ble analysert for caspase-3-aktivitet ($\Delta F/s$) med et fluorescerende peptidsubstrat (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) og beregnet i forhold til μg totalprotein. Data er normalisert i forhold til ubehandlede kontrollceller (100 %) +/- SEM ($n=1-2$ á to-tre paralleller).

4. Diskusjon

4.1 Cellemodeller og metoder

HEK 293 celler er transformert med adenovirus 5 DNA, vokser rask, transfekteres enkelt og brukes mye til transfeksjoneksperimenter i forskningslaboratorier. (www.hek293.com). I denne oppgaven ble HEK 293 celler brukt som kontroll og sammenlignet med M38L-celler, en stabil monoklonal cellelinje som overuttrykker legumain etter transfeksjon med human LGMN cDNA.

MTS-assay ble benyttet for å måle celleviabilitet. Levende celler reduserer MTS-reagens (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay) til farget farmazon som blir målt ved 490 nm. MTS-reagens er følsomt for lys, noe som kunne svekke dets farge og videre føre til høyere bakgrunn under absorbansavlesning. Under hele laboratoriearbeidet var MTS-reagenset godt beskyttet mot lys. Denne metoden ligner på MTT-metoden som også måler celleproliferasjon/viabilitet, men er enklere å bruke. I protokollen står det at etter tilsetningen av MTS-reagens kan man inkubere 1-4 timer i fuktig og 5 % CO₂ atmosfære [54], men i denne oppgaven var cellene inkubert kun 1 time. Triplikater av blanke prøver (medium med eller uten antibiotika) ble trukket fra prøveverdiene for å korrigere resultatene. En studie har vist at etter 48 timers inkubering av 96-brønners brett ble det observert væsketap, noe som oppkonsentrerer MTS-reagens og videre fører til økt måling av celleviabilitet [55]. I denne studien var inkuberingstiden på 24 timer, som er mye kortere enn den ovennevnte studien og brettet var hele tiden oppbevart ved 37 °C og 5 % CO₂. Derfor er det lite sannsynlig at væsken fordamper i løpet av 24 timer. Normaliserte verdier ble brukt på grunn av varierende resultater i forhold til ubehandlede kontrollceller.

Legumainaktivitet ble målt ved hjelp et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-NHMec) etter at DTT var tilsatt. Kinetikk ble målt av mikroplateleseren og resultatene var basert på fem punkter i den bratteste delen av kurven. Resultatene ble delt på totalproteinmåling, noe som korrigerer for mengde av celler mellom parallellene. Generelt var målingene på legumainaktivitet reproducerbare og nesten like i de forskjellige forsøkene som ble utført.

Ved måling av caspase-3-aktivitet var en annen substratløsning (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) og buffer benyttet. Caspase-3-aktivitet ble også målt i mikroplateleseren og dataene er basert

på fem punkter i den bratteste delen av kurven. Under høsting var cellene innledningsvis først vasket med 1xPBS, men målingene viste ingen caspase-3-aktivitet. Under mikroskopering viste det seg at cellene hadde løsnet etter stimulering med statiner. Derfor ble cellene i stedet forsiktig skrapet løse i dyrkningsmedium uten PBS vasking, men stor spredning ble observert i caspase-3-aktivitetsmålinger. Enzymaktiviteten ble delt på totalproteinmengden for å korrigere eventuelle forskjeller som følge av celleavskraping. I tillegg ble varierende verdier målt for blanke prøver, men på grunn av tidsbegrensing var det ikke mulig å repetere flere forsøk. Derfor trengs flere forsøk for å trekke en konklusjon.

Ved totalproteinmåling blir Coomassie-fargestoff i sur løsning bundet til proteiner. Bindingen til proteiner fører til en absorpsjonsendring fra 465 til 595 nm og absorbans ved 595 nm blir målt i en mikroplateleser. Ved hjelp av standardkurve for albumin bestemmes totalproteininnholdet i prøver. Fargestabilitetskurve har vist at absorbansen avleses mest nøyaktig mellom 5-20 minutter etter tilsetningen av fortynnet fargereagens [53]. Proteinmålinger ble avlest av mikroplateleseren etter å ha tilsatt fortynnet fargereagens etter ca. 5 minutter, noe som ga totalproteinverdier innenfor standardkurven. Proteinmålinger var veldig følsomme for nøyaktig pipetteringsmengde på 10 µl prøve, men generelt ble reproducerbare resultater observert.

Siden det var få forsøk ($n \geq 3$) og skjevfordelte resultater ble ikke-parametriske statistiske metoder brukt. Den ene var Wilcoxon test for parsammenligning mellom stimulerede celler og ubehandlede kontrollceller og den andre var Mann-Whitney test for å sammenligne to uavhengige parallelle prøver med samme konsentrasjoner av ulike stoffer. For å analysere en tilnærmet rett linje var lineær regresjon benyttet.

4.2 Statiner reduserer legumainaktiviteten

Statiner har vært lenge i bruk mot høyt kolesterol ved å hemme det hastighetsbegrensende enzymet HMG-CoA-reduktase i kolesterolsyntesen. Studier har vist at statiner har pleiotrope effekter, noe som betyr at de for eksempel forbedrer endotelfunksjon, forsterker stabile plakk, hemmer proliferasjon og inflammasjon. Statiner reduserer hjerte- og karsykdommer, og dermed reduseres sykkelighet og dødelighet blant disse pasientene [7, 8, 56].

I ustabile aterosklerotiske plakk er legumain mRNA oppregulert [57]. Etter behandling med atorvastatin i 12 uker, ble en signifikant reduksjon av legumainuttrykket observert [15].

Atorvastatin og simvastatin finnes både i syre- og laktonform. Studier *in vitro* i humane skjelettmuskelceller har vist at laktonformer av disse statinene er mer potent til å inducere celledød enn tilsvarende syreformer [12], noe som kan kobles til økt konsentrasjon av laktonform i plasma hos pasienter med myotoksisk effekt av statiner.

Det ble observert en doseavhengig reduksjon av legumainaktivitet etter behandling med atorvastatin og simvastatin i begge former i både HEK 293- og M38L-celler. Laktonformene var mer potente til å hemme legumainaktiviteten enn tilsvarende syreformer. Det kan tenkes at simvastatin (og andre statiner) kan nedregulere legumain mRNA på samme måte som tidligere vist for atorvastatin [57], og dette vil gi mindre legumain protein i cellene. Resultatene i denne oppgaven viser for første gang at statiner også har hemmende effekt på enzymaktiviteten av legumain, men mekanismen(e) for hvordan statiner hemmer mRNA-syntese og legumainaktivitet er ukjent. Etter stimulering med atorva- og simvastatin ble løse celler observert under mikroskopering ved konsentrasjonen på 100 μM og høyere. Løse celler ble vasket bort med 1xPBS og var dermed ikke medberegnet i enzymaktivitets- eller totalproteinmålingen. Totalproteinmengden på de adherente celler hadde gått ned mer etter behandling av simvastatin laktonformen enn syreformen, som kan indikere at laktonformen er mer potent til å inducere celledød. Evaluering av de to celletypene basert på data fra figur 3.1 og 3.2, indikerer at simvastatin syreformen hadde større hemmingseffekt på legumainaktivitet i M38L-celler i forhold til utransfektete HEK 293 celler. Det trengs flere studier for å bekrefte dette. Dersom funnet medfører riktighet kan dette skyldes økt cellulært opptak av syreformen i M38L-celler, men mekanismen for dette er ukjent.

Parallele studier ble gjort ved vår forskningsgruppe, der en makrofagliggende cellelinje fra mus (RAW 264,7 celler) ble behandlet med simvastatin syre- og laktonform (0, 0,1, 1, 10, 100, 200 μM) i 24 timer. Resultatene viste lignende reduksjon av legumainaktiviteten med økende doser som vist i denne oppgaven, og laktonformen var mest potent til å hemme enzymaktiviteten (Eyassu Tewolde, upubliserte data).

Resultatene fra celleviabilitetsanalysen (MTS-assay) viste signifikant reduksjon av celleviabilitet etter stimulering med simvastatin laktonform (200 μM), og med syreformen ved den høyeste konsentrasjonen (400 μM). En annen studie, der metabolsk aktivitet og membranintegritet ble målt *in vitro* i leverceller fra fisk, har vist at simvastatin induserte mer celledød enn atorvastatin og laktonformen var mer potent enn tilsvarende syreform [58].

Denne studien forsterker våre resultater at celledød blir induisert av statiner og mest av laktonformer, men hvilke type celledød som inntreffer er fortsatt ikke kartlagt.

Statiner metaboliseres i leveren primært av cytokrom P450 (CYP) 3A4. Kliniske erfaringer har vist at muskelbivirkninger forekommer ved samtidig bruk av legemidler som hemmer CYP3A4 og fører til økt plasmakonsentrasjonen av statiner [59]. *In vivo* konsentrasjoner beregnet fra C_{max}-verdiene er for atorvastatin syreform 0,022 µM og laktonform 0,008 µM, og for simvastatin syreform 0,007 µM og laktonform 0,037 µM [60]. I denne oppgaven ble høye doser (10-400 µM) brukt i korttidssforsøk, men resultatene kan indikere hva som skjer i kroppen ved langtiseksponering for stoffene.

Laktonformer av statiner har i denne studien vist større effekt på reduksjon av legumainaktivitet enn syreformen og dette kan være på grunn av molekylstrukturen. Laktonformer har høyere oktanol/vann fordelingskoeffisient (log P), noe som betyr at laktonformer er mer lipofile [60] og er derfor mer cellepermeable. Ved hvilke mekanisme statiner påvirker legumainaktiviteten er ukjent, men statiner kan være involvert i for eksempel pH-regulering og dermed inaktivering av legumain. På grunn av begrenset tid var det ikke mulig å analysere cellelysaten med Western blotting for å påvise hvilke molekylvektsformer av legumain som foreligger i cellelysaten. Dersom båndmønsteret viser bare proform og ikke aktiv form av legumain, kan dette bety at statiner øker pH i lysosomene slik at autoaktiveringen av legumain ikke skjer.

4.3 Effekt av statiner og apoptoseinduserende stoffer på celledød i HEK 293- og M38L-celler

Celledød deles klassisk inn i to ulike typer som skilles etter morfologiske endringer i pattedyrceller: nekrose og apoptose. Nekrose er en passiv prosess, der membranen blir tidlig permeabel og lekkasjen fører til inflammasjon. Apoptose er en viktig og nøye regulert fysiologisk prosess for å fjerne ødelagte eller unormale celler. Den er viktig helt fra fosterutviklingen og er energikrevende prosess. Apoptose deles inn i den mitokondrielle- og dødsreseptorinduserte signalveien. Caspaser spiller en viktig rolle i apoptose og legumain ligner på disse i aminosyresekvens og struktur [16, 17, 51]. Apoptose kan også skje ved frigjøring av lysosomale enzymer som cathepsiner til cytoplasma [25]. Legumain er et annet lysosomalt enzym og sett i flere forskjellige tumorceller, for eksempel ved tykktarm, prostata-

og brystkreft [44]. Derfor var det interessant å undersøke om legumain også er involvert i apoptose.

HEK 293- og M38L-celler ble stimulert i 24 timer med simvastatin lakton (200 μ M) og flere andre apoptoseinduserende stoffer: brefeldin A (10 μ g/ml), bafilomycin A1 (25 nM), Leu-Leu-OMe (3 mM) og staurosporin (500 nM). Resultatene viste at staurosporin (500 nM) hadde redusert i gjennomsnitt 32 % celleviabilitet i HEK 293- og M38L-celler etter 24 timers stimulering. Tidligere studier ved vårt laboratorium i PMA-stimulerte THP-1 celler (human monocytisk cellelinje) har vist at samme konsentrasjon av staurosporin reduserte celleviabiliteten med litt over 50 % [61]. Dette forsterker resultatene i denne oppgaven. Generelt så det ut som at brefeldin A og bafilomycin A1 ikke hadde effekt på celleviabilitet, mens simvastatin lakton (200 μ M) hadde størst hemmende effekt på celleviabiliteten. Det ble ikke observert noen signifikante forskjeller mellom HEK 293- og M38L-celler, som indikerer at overuttrykk av legumain ikke endrer celleviabiliteten.

Ved vår forskningsgruppe er det gjort studier på HEK 293- og M38L-celler etter stimulering med 5-25 nM bafilomycin A1 i 24 timer (Robert Smith, upubliserte data). Behandling med 25 nM bafilomycin A1 (brukt i denne oppgaven) hemmet totalt legumainaktiviteten intracellulært, og førte til sekresjon av proformen (56 kDa) til cellemediet. Bafilomycin A1 hemmer protonpumpen (H^+ -ATPasen) i lysosom-membranen og dette fører til økt pH i organellene [34] og dermed hemmes legumain autoaktivering. Tilsvarende stimulering med 10 μ g/ml brefeldin A (brukt i denne oppgaven) viste også mindre aktivt legumain intracellulært, men derimot ingen sekresjon av proformen ble observert (Robert Smith, upubliserte data). Brefeldin A er et laktonantibiotikum som blokkerer cellulær eksocytose og kan hemme aktiv transport av legumain ut av celler.

Basert på de brukte konsentrasjoner av de ulike stoffene i våre laboratorie-analyser ble det ikke observert at overuttrykk av legumain hadde noen effekt på stoffenes evne til å indusere celledød.

Apoptose kan settes i gang gjennom to ulike signalveier, dødsreseptor- eller mitokondriell signalvei, men aktivering av caspase-3 er felles punkt for begge signalveiene (Figur 1.6). Derfor ble caspase-3-aktivitetsmåling valgt som en markør for å påvise apoptose i HEK 293- og M38L-celler etter stimulering med staurosporin og simvastatin laktonform. *In vitro* studier har vist at simvastatin induserer apoptose etter 24 timer i human brystkreftceller [62] og B-

celler kronisk lymfatisk leukemi (B-CLL) [63]. Våre resultater viste stor spredning i caspase-3-aktivitetsmålingene og var høyest for simvastatin laktonformen (100 μM) etter 2 timers stimulering og indikerte at simvastatin laktonformen hadde induisert apoptose i våre celler. Det vil være mulig å bruke en caspase-3-hemmer (for eksempel Z-DEVD-FMK) for å se i hvilken grad apoptosen er caspase-avhengig. På den andre siden har studier i B-CLL celler vist at nekrosenivået var økt etter behandling med simvastatin (50 μM) i 24 timer [63]. Det finnes flere metode for skille apoptose og nekrose, og flow cytometri kan brukes hvor cellene farges med annexin-v for å måle apoptose og med propidium jodid for å måle nekrose, men metodologien er ikke tilgjengelig ved vårt laboratorium.

Staurosporin er en sterk apoptose-induser i mange ulike celler og den fremkaller apoptose i stor grad ved den mitokondrielle apoptosesignalveien [29]. Aktivisering av procaspase-3 er vist på Western blotting etter stimulering av HEK 293 celler med staurosporin (500 nM) i 4 timer [30]. I denne oppgaven ble både HEK 293- og M38L-celler behandlet med staurosporin (500 nM) i 0-24 timer. Caspase-3-aktivitet økte over tid og var størst i HEK 293 celler. En økning av caspase-3-aktivitet over tid er også sett i PMA-stimulerte THP-1 celler etter behandling med 500 nM staurosporin [61]. Siden caspase-3-aktivitet var større i HEK 293 celler som basalt inneholder lite legumain i forhold til i M38L-celler kan man tro at overuttrykk av legumain har en beskyttende effekt mot apoptose. På grunn av stor spredning og få forsøk av caspase-3-aktivitetsmålinger er det vanskelig å trekke konklusjonen og flere forsøk er nødvendig for å bekrefte eller avkrefte denne hypotesen. Etter dose-respons forsøket viste resultatene at staurosporin i lave doser (250 nM) var mer potent til å indusere celledød i HEK 293 celler enn i høyere doser. Ved økte staurosporinkonsentrasjonen (≥ 500 nM) var derimot M38L-cellene mest "følsomme" for staurosporineffekten. PMA-stimulerte THP-1 celler er tidligere også stimulert med samme konsentrasjoner av staurosporin, og resultatene viste en doseavhengig reduksjon av cellelevabiliteten [61]. Våre resultater kan tyde på at M38L-celler som overuttrykke legumain kan være anti-apoptotiske etter stimulering med staurosporin i lave doser (≤ 250 nM) i forhold til HEK 293 celler, men det er vanskelig å trekke konklusjon fordi disse celletypene ikke var stimulert med staurosporin lavere enn 250 nM. I tillegg er det få forsøk som er gjort og det trengs flere studier for å bekrefte eller avkrefte denne hypotesen.

5. Konklusjon

I denne oppgaven er det for første gang vist at

- Legumainaktiviteten ble redusert etter stimulering med statiner (atorva-/simvastatin) og laktonformene hadde større effekt på hemming av enzymaktiviteten enn tilsvarende syreformer i både HEK 293- og M38L-celler.
- Simvastatin syreform hadde større hemmingseffekt på legumain i M38L-celler sammenlignet med HEK 293 celler, mens effekten av laktonformen var lik i begge celletyper.
- HEK 293- og M38L-celler responderte likt på statiner og andre apoptoseinduserende stoffer etter viabilitets (MTS)-måling.
- Statinene hadde størst effekt på celledød sammenlignet med de anvendte konsentrasjoner av andre apoptoseinduserende stoffer.
- Caspase-3-aktivitet ble observert i HEK 293- og M38L-celler etter behandling med simvastatin laktonform og staurosporin.

6. Kildeliste

1. Sacks, F.M., et al., *The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels*. New England Journal of Medicine, 1996. **335**(14): p. 1001-1009.
2. Endo, A., *The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors*. Journal of Lipid Research, 1992. **33**(11): p. 1569-1582.
3. Shepherd, J., et al., *Prevention of Coronary Heart-Disease with Pravastatin in Men with Hypercholesterolemia*. New England Journal of Medicine, 1995. **333**(20): p. 1301-1307.
4. Endo, A., M. Kuroda, and Y. Tsujita, *ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by Penicillium citrinium*. J Antibiot (Tokyo), 1976. **29**(12): p. 1346-8.
5. Maron, D.J., S. Fazio, and M.F. Linton, *Current perspectives on statins*. Circulation, 2000. **101**(2): p. 207-213.
6. Pedersen, T.R., et al., *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) (Reprinted from Lancet, vol 344, pg 1383-89, 1994)*. Atherosclerosis Supplements, 2004. **5**(3): p. 81-87.
7. Takemoto, M. and J.K. Liao, *Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2001. **21**(11): p. 1712-1719.
8. Liao, J.K., *Clinical implications for statin pleiotropy*. Current Opinion in Lipidology, 2005. **16**(6): p. 624-629.
9. Graham, D.J., et al., *Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs*. Jama-Journal of the American Medical Association, 2004. **292**(21): p. 2585-2590.
10. Roth, B.D., *The discovery and development of atorvastatin, a potent novel hypolipidemic agent*. Prog Med Chem, 2002. **40**: p. 1-22.
11. Vickers, S., et al., *Metabolic Disposition Studies on Simvastatin, a Cholesterol-Lowering Prodrug*. Drug Metabolism and Disposition, 1990. **18**(2): p. 138-145.
12. Skottheim, I.B., et al., *Statin induced myotoxicity: The lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **33**(4-5): p. 317-325.
13. Cheng, G., et al., *Apoptosis induced by simvastatin in rat vascular smooth muscle cell through Ca²⁺-calpain and caspase-3 dependent pathway*. Pharmacological Research, 2003. **48**(6): p. 571-578.
14. Keskitalo, J.E., et al., *ABCB1 haplotypes differentially affect the pharmacokinetics of the acid and lactone forms of simvastatin and atorvastatin*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **84**(4): p. 457-61.
15. Wang, Z.H., et al., *Pleiotropic effects of atorvastatin on monocytes in atherosclerotic patients*. Journal of Clinical Pharmacology, 2010. **50**(3): p. 311-9.
16. Golstein, P. and G. Kroemer, *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends in Biochemical Sciences, 2007. **32**(1): p. 37-43.
17. Ziegler, U. and P. Groscurth, *Morphological features of cell death*. News in Physiological Sciences, 2004. **19**: p. 124-128.
18. Melino, G., *The Sirens' song*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 23.
19. Kane, A.B., *Redefining cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 1-2.
20. Elmore, S., *Apoptosis: A review of programmed cell death*. Toxicologic Pathology, 2007. **35**(4): p. 495-516.

21. Levine, B. and V. Deretic, *Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 767-77.
22. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
23. Taraphdar, A.K., M. Roy, and R.K. Bhattacharya, *Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention*. Current Science, 2001. **80**(11): p. 1387-1396.
24. Kam, P.C. and N.I. Ferch, *Apoptosis: mechanisms and clinical implications*. Anaesthesia, 2000. **55**(11): p. 1081-93.
25. Chwieralski, C.E., T. Welte, and F. Buhling, *Cathepsin-regulated apoptosis*. Apoptosis, 2006. **11**(2): p. 143-149.
26. Lavrik, I., A. Golks, and P.H. Krammer, *Death receptor signaling*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 2): p. 265-7.
27. Omura, S., et al., *New Alkaloid Am-2282 of Streptomyces Origin Taxonomy, Fermentation, Isolation and Preliminary Characterization*. Journal of Antibiotics, 1977. **30**(4): p. 275-282.
28. Combadiere, C., et al., *A protein kinase inhibitor, staurosporine, enhances the expression of phorbol dibutyrate binding sites in human polymorphonuclear leucocytes*. Biochemical Journal, 1993. **289** (Pt 3): p. 695-701.
29. Zhang, X.D., S.K. Gillespie, and P. Hersey, *Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(2): p. 187-97.
30. Zhang, Y., et al., *Dividing roles of prion protein in staurosporine-mediated apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **349**(2): p. 759-68.
31. Kobayashi, Y., et al., *Cell-type specificity of l-leucyl l-leucine methyl ester*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **272**(3): p. 687-90.
32. Uchimoto, T., et al., *Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-Leucyl-L-Leucine methyl ester*. Apoptosis, 1999. **4**(5): p. 357-62.
33. Pommepuy, I., et al., *Brefeldin A induces apoptosis and cell cycle blockade in glioblastoma cell lines*. Oncology, 2003. **64**(4): p. 459-67.
34. Yamamoto, A., et al., *Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells*. Cell Struct Funct, 1998. **23**(1): p. 33-42.
35. Teplova, V.V., et al., *Bafilomycin A1 is a potassium ionophore that impairs mitochondrial functions*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(4): p. 321-9.
36. Umata, T., et al., *The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(35): p. 21940-5.
37. Chen, J.M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(12): p. 8090-8.
38. Belmokhtar, C.A., J. Hillion, and E. Segal-Bendirdjian, *Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms*. Oncogene, 2001. **20**(26): p. 3354-62.
39. Kuranaga, E., *Caspase signaling in animal development*. Dev Growth Differ, 2011. **53**(2): p. 137-48.
40. Shutov, A.D., N.L. Do, and I.A. Vaintraub, *[Purification and partial characterization of protease B from germinating vetch seeds]*. Biokhimiia, 1982. **47**(5): p. 814-21.
41. Chen, J.M., et al., *Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase*. Biochemical Journal, 1998. **335** (Pt 1): p. 111-7.

42. Chen, J.M., M. Fortunato, and A.J. Barrett, *Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue*. *Biochemical Journal*, 2000. **352 Pt 2**: p. 327-34.
43. Li, D.N., et al., *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(40): p. 38980-90.
44. Liu, C., et al., *Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy*. *Cancer Research*, 2003. **63**(11): p. 2957-64.
45. Choi, S.J., et al., *Osteoclast inhibitory peptide 2 inhibits osteoclast formation via its C-terminal fragment*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001. **16**(10): p. 1804-11.
46. Clerin, V., et al., *Expression of the cysteine protease legumain in vascular lesions and functional implications in atherogenesis*. *Atherosclerosis*, 2008. **201**(1): p. 53-66.
47. Manoury, B., et al., *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation*. *Nature*, 1998. **396**(6712): p. 695-9.
48. Ishizaki, T., et al., *The asparaginyl endopeptidase legumain after experimental stroke*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010. **30**(10): p. 1756-66.
49. Miller, G., et al., *Asparagine endopeptidase is required for normal kidney physiology and homeostasis*. *FASEB J*, 2011. **25**(5): p. 1606-17.
50. Alvarez-Fernandez, M., et al., *Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(27): p. 19195-203.
51. Chen, J.M., et al., *Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases*. *FEBS Letters*, 1998. **441**(3): p. 361-5.
52. Chen, J.M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(12): p. 8090-8098.
53. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. **72**: p. 248-54.
54. Promega., *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*. Technical Bulletin [cited 2011 23.02]; Available from: <http://www.promega.com/tbs/tb245/tb245.pdf>, 2005.
55. Patel, M.I., R. Tuckerman, and Q. Dong, *A Pitfall of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2 H-tetrazolium (MTS) assay due to evaporation in wells on the edge of a 96 well plate*. *Biotechnol Lett*, 2005. **27**(11): p. 805-8.
56. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. *Lancet*, 1994. **344**(8934): p. 1383-9.
57. Papaspyridonos, M., et al., *Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(8): p. 1837-44.
58. Ellesat, K.S., et al., *Cytotoxicity of atorvastatin and simvastatin on primary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes*. *Toxicol In Vitro*, 2010. **24**(6): p. 1610-8.
59. Paoletti, R., A. Corsini, and S. Bellosta, *Pharmacological interactions of statins*. *Atheroscler Suppl*, 2002. **3**(1): p. 35-40.
60. Sakaeda, T., et al., *Effects of acid and lactone forms of eight HMG-CoA reductase inhibitors on CYP-mediated metabolism and MDR1-mediated transport*. *Pharm Res*, 2006. **23**(3): p. 506-12.
61. Tunglund, E., *Dei lysosomale cysteinproteasane legumain og cathepsin B i apoptose*. Master thesis, School of Pharmacy, University of Oslo, 2008.

62. Koyuturk, M., M. Ersoz, and N. Altıok, *Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK*. *Cancer Lett*, 2007. **250**(2): p. 220-8.
63. Chapman-Shimshoni, D., et al., *Simvastatin induces apoptosis of B-CLL cells by activation of mitochondrial caspase 9*. *Exp Hematol*, 2003. **31**(9): p. 779-83.

7. Vedlegg

7.1 Oppløsninger

Celledyrking og høsting

A) *HEK 293 medium*

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) med 4500 mg/L glukose, 4 mM L-glutamin og 110 mg/L natriumpyruvat	500 ml
Føtalt kalveserum (FBS) (10 %)	50 ml
Na-pyruvat (1 %)	5 ml
Penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 µg/ml) (1 %)	5 ml

B) *Trypsinoppløsning 0,5 %*

Trypsin (10 x) 5 %	5 ml
DMEM (uten serum)	ad 50 ml

C) *1 x PBS*

NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	1,0 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O	6,0 g
NaCl	8,0 g
dH ₂ O	ad 11,0 g

D) *Lysisbuffer (pH 5,8)*

Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O	100 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
N-octyl-β-D-glucopyranoside	1 % (w/v)

Enzymaktivitetsmåling

Legumain:

E) *Legumain assaybuffer (pH 5,8)*

C ₆ H ₈ O ₇ (sitronsyre)	39,5 mM
---	---------

Na ₂ HPO ₄	121 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
CHAPS	0,01 %

F) Legumain assaybuffer med DTT (1 mM)

DTT (200 mM)	200 µl
Legumain assaybuffer (pH 5,8)	40 ml

G) Legumain substratopløsning (34 µM)

Z-Ala-Ala-Asn-NHMec i DMSO (2,5 mM)	200 µl
Legumain assaybuffer (pH 5,8)	14,5 ml

Caspase-3:

H) Caspasebuffer (pH 7,4)

HEPES	50 mM
NaCl	100 mM
Na ₂ EDTA	0,1 mM
CHAPS	0,1 %
Glyserol	10 %

I) Caspasebuffer med DTT

DTT (200 mM)	500 µl
Caspasebuffer (pH 7,4)	10 ml

J) Caspase-3 substratopløsning (68 µM)

Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC i DMSO (1 mM)	680 µl
Caspasebuffer (pH 7,4)	9,32 ml

Totalproteinmåling

K) Bio-Rad protein assay farget oppløsning i dH₂O (1:5)

“Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate”	10 ml
dH ₂ O	40 ml