

Cysteinproteasene legumain og cathepsin B i monocytter/makrofager og i aterosklerotiske plakk

Sakina Ben Omar



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2008

Cysteinproteasene legumain og cathepsin B i monocytt/makrofager og i aterosklerotiske plakk

Sakina Ben Omar



Masteroppgave i farmasi

Arbeidet ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,
Universitetet i Oslo

Veiledere:

Professor Rigmor Solberg

Professor Harald Thidemann Johansen

Førsteamanuensis Bente Halvorsen

Forord

Denne oppgaven ble utført ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden juni 2007 til mai 2008. Mine interne veiledere har vært professor Harald Thidemann Johansen og professor Rigmor Solberg. Førsteamanuensis Bente Halvorsen ved Institutt for indremedisinsk forskning, Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF har vært ekstern veileder.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til Harald Thidemann Johansen og Rigmor Solberg for lærerikt samarbeid, svært god oppfølging og veiledning under skriveprosessen og den praktiske delen av oppgaven. En stor takk rettes også til førsteamanuensis Bente Halvorsen for god veiledning, verdifulle innspill og nyttige tilbakemeldinger. Takk til alle tre for inspirerende engasjement!

Takk til avdelingsingeniør Hilde Nilsen ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap for opplæring i den praktiske delen av oppgaven, godt humør og positiv innstilling. Jeg vil også takke avdelingsingeniør Ellen Lund Sagen ved Institutt for indremedisinsk forskning, Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF for god hjelp hver gang jeg var på Rikshospitalet.

Professor Eva Skovlund ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap fortjener takk for råd og nyttige diskusjoner vedrørende de statistiske analysene.

Jeg ønsker å takke medstudentene ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap for et trivelig miljø, og et minnerikt år.

Jeg vil også takke familie og venner for støtte og motivasjon gjennom hele studiet.

Blindern, 15. mai 2008

Sakina Ben Omar

INNHold

SAMMENDRAG	7
FORKORTELSER	8
1. INNLEDNING	10
1.1 Aterosklerose	10
1.1.1 Inflammasjon og aterosklerose.....	11
1.1.2 Opptak og utskillelse av LDL.....	15
1.1.3 Lysosomer og aterosklerose	17
1.2 Proteaser	18
1.2.1 Cysteinproteaser	18
1.2.2 Legumain.....	19
1.2.3 Cathepsin B	22
1.3 Proteasers rolle ved aterosklerose	23
1.4 Mål for oppgaven	24
2. MATERIALER OG METODER	25
2.1 Kjemikalier og reagenser	25
2.2 Utstyr	27
2.3 THP-1 celler	28
2.3.1 Tining av THP-1 celler.....	29
2.3.2 Dyrking og splitting av THP-1 celler	29
2.4 Celleforsøk til måling av totalprotein, enzymaktivitet, og Western blotting	30
2.4.1 PMA-stimulerte THP-1 celler.....	30
2.4.2 THP-1 celler (monocytt).....	30
2.5 Celleforsøk til måling av celleviabilitet (MTS)	31
2.5.1 PMA-stimulerte THP-1 celler.....	31
2.5.2 THP-1 celler (monocytt).....	31
2.6 Pasienter	32

2.7	Analyse av totalprotein	32
2.8	Måling av enzymaktivitet	33
2.8.1	Legumainaktivitet.....	33
2.8.2	Cathepsin B-aktivitet.....	33
2.9	Western blotting	34
2.10	Måling av celleviabilitet (MTS)	35
2.11	Måling av cytotoxicitet (LDH-lekkasje)	35
2.12	Statistiske analyser	37
3.	RESULTATER	38
3.1	Effekt av oxLDL på legumain- og cathepsin B-aktivitet i PMA-stimulerte THP-1 celler	38
3.2	Direkte effekt av oxLDL på cysteinproteaseaktivitet	41
3.3	Effekt av 22(R)-hydrokyskolesterol (22R) og TNFα på legumain- og cathepsin B-aktivitet i PMA-stimulerte THP-1 celler	42
3.4	Effekt av TNFα på legumain- og cathepsin B-aktivitet i THP-1 celler (monocyttter)	46
3.5	Effekt av oxLDL på proteinuttrykket av legumain og cathepsin B i PMA-stimulerte THP-1 celler	47
3.6	Effekt av 22R på proteinuttrykket av legumain og cathepsin B i PMA-stimulerte THP-1 celler	49
3.7	Effekt av TNFα på proteinuttrykket av legumain og cathepsin B i native THP-1 celler	51
3.8	Proteinuttrykket av legumain og cathepsin B i symptomatiske og asymptomatiske aterosklerotiske carotisplakk	52
4.	DISKUSJON	54
4.1	Valg av cellemodell	55
4.2	Variasjon av oxLDL	55
4.3	Effekt av oxLDL på legumain- og cathepsin B-aktivitet	56

4.4	Effekt av oxLDL på proteinuttrykket av legumain og cathepsin B	58
4.5	Effekt av oxLDL på celledød av PMA-stimulerte THP-1 celler	58
4.6	Effekt av LXR-ligandene 22R, 22S og T0901317 på legumain, cathepsin B og celledød.....	59
4.7	Effekt av TNF α på legumain, cathepsin B og celledød	60
4.8	Uttrykket av legumain og cathepsin B i aterosklerotiske plakk	61
5.	KONKLUSJON	64
6.	VIDERE STUDIER	65
	REFERANSER	66
	APPENDIKS	71
	Løsninger	71
	Celledyrking og høsting.....	71
	Måling av enzymaktivitet	72
	Western blotting	72
	Prosedyrer	75
	Mellomversjon-metode for analyse av totalprotein	75
	Prosedyre for TCA-felling av cellelysatprøver til Western blotting.....	75
	Prosedyre for Western blotting	76
	Isolering og oksidativ modifisering av LDL	78

SAMMENDRAG

Aterosklerose er en inflammatorisk sykdom der immuncellenes aktivitet er sentral i patogenesen. I blodåreveggen utvikles aterosklerotiske plakk som består av ekstracellulært materiale og lipidrike makrofag-skumceller, som hovedsakelig dannes ved opptak av oksidert "low density lipoprotein" (oxLDL). Makrofag-skumceller er hovedkilden til proteaser som fører til destabilisering av plakk ved nedbrytning av ekstracellulær matriks, og plakkets fibrøse kappe. De lysosomale cysteinproteasene legumain og cathepsin B er vist å overuttrykkes i aterosklerotiske plakk.

I denne studien ble native THP-1 celler (human monocytisk cellelinje), eller THP-1 celler differensiert med forbolester (PMA) til makrofager, inkubert med ulike konsentrasjoner av henholdsvis oxLDL, tumornekrosefaktor- α (TNF α), og LXR-ligandene 22-(R/S)-hydroksykolesterol (22R/S) og T0901317, alene eller i kombinasjoner. Enzymaktivitet av legumain og cathepsin B ble målt i cellelysate ved hjelp av spesifikke peptidsubstrater. Eventuell celledød ble analysert ved celleviabilitet (MTS) og LDH-lekkasje til medium. Proteinuttrykket av legumain og cathepsin B i behandlede celler og i aterosklerotiske carotidplakk ble analysert ved hjelp av Western blotting med spesifikke antistoffer.

PMA-stimulering av THP-1 celler førte til en kraftig økning i enzymaktivitet av legumain og cathepsin B. Ved inkubering av PMA-stimulerte THP-1 celler med oxLDL, ble det observert en doseavhengig reduksjon av både legumain- og cathepsin B-aktivitet. En tilsvarende effekt ble observert med 22R, men ikke 22S. Det ble også vist at effekten av oxLDL på enzymaktiviteten kunne være en direkte effekt på de lysosomale enzymene. Økende konsentrasjoner av 22R førte i tillegg til celledød i PMA-stimulerte THP-1 celler. TNF α induerte differensiering av native THP-1 celler til adherente celler med økt legumain- og cathepsin B-aktivitet, og overuttrykk av cathepsin B-protein sammenlignet med ikke-adherente celler fra samme cellepopulasjon. Disse resultatene indikerer at det inflammatoriske miljøet i aterosklerotiske plakk kan påvirke uttrykket og aktiviteten av lysosomale proteaser. Western blotting av patologisk plakkmateriale viste signifikant oppregulering av cathepsin B i carotidplakk fra symptomatiske sammenlignet med asymptomatiske pasienter, men legumain ble ikke identifisert i de samme plakkprøvene. Dette tyder på at cathepsin B oppreguleres ved progresjon av aterosklerotiske plakk.

FORKORTELSER

22(R)-hydroksykolesterol	22R
22(S)-hydroksykolesterol	22S
ABC	ATP-bindende kassettransporter
AEP	Asparaginylendopeptidase
APC	Antigenpresenterende celle
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
BSA	Bovin serumalbumin
Cys	Cystein
DMSO	Dimetylsulfoksid
DTT	Dithiothreitol
ECM	Ekstracellulær matriks
FBS	Føtalt bovins serum
His	Histidin
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	”Low density lipoprotein”
LXR	Lever X reseptor
MCP-1	Monocytt kjemoattraktant protein-1
M-CSF	Makrofag kolonistimulerende faktor
M-CSF-R	Makrofag kolonistimulerende faktor reseptor
MHC	”Major histocompatibility complex”
MmLDL	Mildt modifisert ”low density lipoprotein”
MMP	Matriks metalloproteinase
OxLDL	Oksidert ”low density lipoprotein”

PMA	12-O-tetradekanoylforbol 13-acetat
PPAR	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor
ROS	Reaktive oksygen forbindelser
RXR	Retionoid X reseptor
SEM	Standardfeil ("standard error of the mean")
SR	"Scavenger" reseptor
TLR	"Toll-like" reseptor
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM-1	Vaskulær celleadhesjonsmolekyl-1
VSMC	Vaskulære glatte muskelceller
Z-Ala-Ala-Asn-NHMec	Benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-(4- metyl)-kumarylamid

1. INNLEDNING

1.1 Aterosklerose

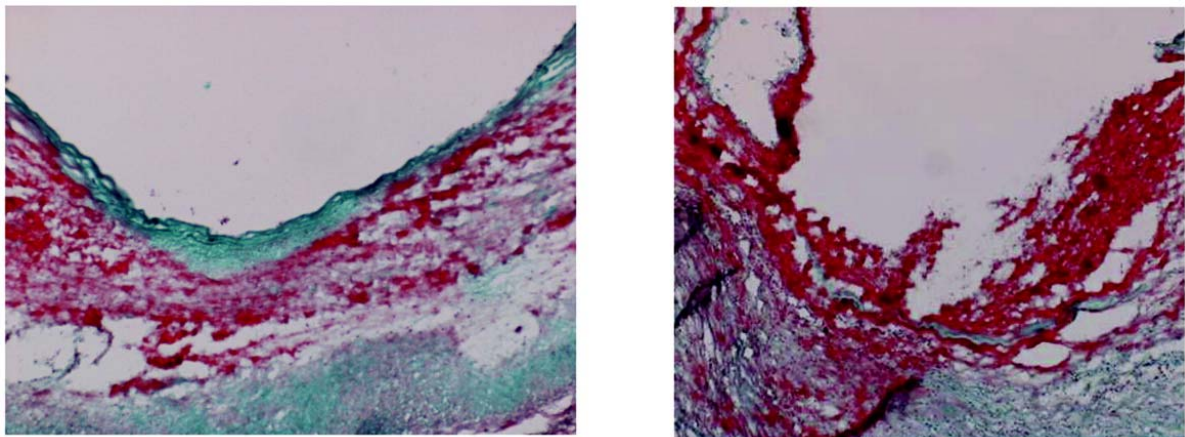
I Europa er kardiovaskulære sykdommer den vanligste dødsårsaken for menn under 65 år og den nest vanligste dødsårsaken for kvinner [1]. Aterosklerose er assosiert med økt risiko for koronarsykdom, hjertesvikt og iskemisk hjerneslag [2]. Sykdommen innebærer en unormal akkumulering av celler og ekstracellulært materiale i arterieveggen. En slik fortykkelse av arteriene kalles et aterosklerotisk plakk [3]. Arterieveggen inndeles anatomisk i lagene intima, media og adventitia. Det ytterste laget, lengst fra lumen, er kjent som adventitia og består av fast bindevev. Media, som befinner seg mellom adventitia og intima, inneholder glatte muskelceller. Det innerste laget av arterieveggen kalles intima, og består av et enkelt lag med endotelceller langs lumen og et lag med løsere bindevev [4]. Et aterosklerotisk plakk er lokalisert i arterieveggens intima, direkte under endotelcellene. Plakkene begynner vanligvis med akkumulering av makrofag-skumceller (se 1.1.1) og ekstracellulære lipoproteiner, en såkalt fettansamling ("fatty streak"). Når en slik fettansamling vokser, utvikles det til et aterosklerotisk plakk [5]. Denne akkumuleringen i intima medfører at lumen av arterien reduseres [3].

Lipoproteinpartikler består av en kjerne med nøytrale lipider som kolesterylestere, og en overflate av fosfolipider, kolesterol og proteiner. Dette er kroppens hovedtransportmiddel av vannløselige lipider mellom vev [3]. Avleiring av fritt kolesterol er vist i arterieveggen i alle stadier av aterosklerose [6]. Kolesterol og kolesterylestere ankommer arterieveggen fra blod primært som bestanddeler av "low density lipoprotein" (LDL), selv om noe kolesterol syntetiseres av cellene i plakket. Kolesterol befinner seg både intracellulært og ekstracellulært i aterosklerotiske plakk [3]. En betydelig ansamling av partikler i plakket er irreversibelt, bestående av fritt kolesterol og kalsiumfosfat. Disse avleiringene finner sted ekstracellulært, ofte i plakkets kjerne, og makrofager i plakkområdet er ikke i stand til å fagocyttere avleiringene [6].

Plakket kan føre til at arterieveggen svekkes og brister, som videre kan føre til trombose. Resultatet blir forhindret gjennomstrømning av blod i arteriene, og dermed celledød og

svekket funksjon [2, 3, 7]. På overflaten er mange plakk, spesielt utviklede plakk, dekket av et bindevevsområde kalt fibrøs kappe ("fibrous cap"). Den fibrøse kappen består hovedsakelig av glatte muskelceller og fiberholdig bindevev [3]. Ved plakkprogresjon produserer glatte muskelceller økt mengde ekstracellulær matriks (ECM). ECM består av elastiner, kollagener og proteoglykaner. ECM yter mange viktige funksjoner i blodåreveggen, men sørger hovedsakelig for støtte og struktur til omkringliggende vev. Nedbrytning av ECM kan føre til patologiske tilstander, som forverring av aterosklerose [8-10].

Det første stadiet av sykdommen kjennetegnes vanligvis som gradvis utviklende, såkalte stabile plakk. Stabile plakk er dekket av en glatt luminal overflate som indikerer intakt fibrøs kappe. Videre i utviklingen blir det kliniske bildet assosiert med et eller flere ustabile plakk. Ustabile plakk involverer sår dannelse på overflaten av plakk, med eller uten trombose eller blødning (Figur 1-1) [11, 12].



Figur 1-1: Trikkromfarging av makroskopisk klassifiserte stabile (til venstre) og ustabile (til høyre) plakksegmenter. Kollagen er farget blått, glatte muskelceller er farget rødt og elastinfiber er farget svart. Ustabile plakk består av en ødelagt fibrøs kappe med eller uten trombe eller blødning [12].

1.1.1 Inflammasjon og aterosklerose

Nyere forskning har vist at inflammasjon spiller en hovedrolle ved koronarsykdom, og andre manifestasjoner av aterosklerose [1]. Inflammasjon spiller en viktig rolle ved alle stadier av aterosklerose. En kronisk inflammatorisk infiltrasjon er karakteristisk for stabile plakk med intakt fibrøs kappe, mens ustabile plakk med brist preges av en aktiv inflammasjon og slitasje på den fibrøse kappen. På grunn av mangfoldige plakktyper blir aterosklerose en

diffus inflammatorisk prosess [5]. Inflammatoriske mediatorer kan hemme kollagensyntese og bidra til at makrofag-skumceller (se under) i intima uttrykker kollagenaser, som kan medføre at den fibrøse kappen svekkes og blir utsatt for brist [11].

Flere inflammatoriske mediatorer som vekstfaktorer og cytokiner er påvist å være involvert i patogenesen av aterosklerose [13]. Monocytt og makrofager er viktige deltakere ved dannelse av et aterosklerotisk plakk. Makrofager lagrer betydelig mengder intracellulært kolesterol gjennom opptak av subendoteliale lipoproteiner. Det dannes kolesterolrike ("cholesterol-loaded") makrofag-skumceller tidlig i utviklingen av aterosklerose. Disse cellene har opprinnelse fra monocytter i blodsirkulasjonen [7, 14]. Samtidig migrerer glatte muskelceller fra media og omdannes til skumceller i intima [6]. Under disse prosessene oppstår det celleinteraksjoner. Ulike cytokiner og inflammatoriske mediatorer skilles ut, som blant annet fører til celleproliferasjon [13].

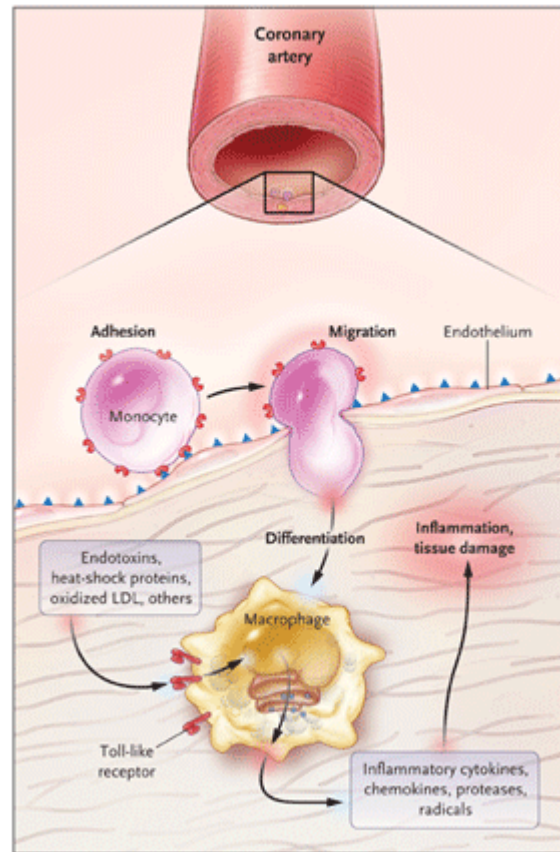
Hyperlipidemi, hypertensjon og diabetes, som er risikofaktorer for utvikling av aterosklerose, innebærer dannelse av intracellulære reaktive oksygen forbindelser (ROS). Dannelsen av ROS fører til økt oksidativt stress, som er involvert i sykdomsutviklingen ved aterosklerose. ROS kan aktivere transkripsjonsfaktorer forbundet med proliferasjon av vaskulære celler og inflammasjon. Økt oksidativt stress er involvert i proaterogen modifisering av lipoproteiner som LDL og andre lipoproteiner [15]. LDL er et aterogent kolesterolrikt lipoprotein [2]. Selv om det er uklart hvordan LDL modifiseres i blodåreveggen, er det vist at det kan oppstå ulike modifikasjoner av nativt LDL i arterieveggens intima, som blant annet oksidering, glykosylering eller acetylering [15-17]. LDL kan bli mildt modifisert (mmLDL) av blant annet 15-lipoksygenase (15-LO) (figur 1-3) [17].

Den oksiderte formen av LDL (oxLDL) anses som et viktig inflammasjonsstimulus i blodåreveggen [15]. OxLDL består av oksiderte lipoproteiner, oksiderte fettsyrer og oksysteroler [18]. OxLDL har i flere studier vist å påvirke inflammasjonen ved å indusere uttrykket av adhesjonsmolekyler, kjemokiner og inflammatoriske cytokiner i makrofager og andre celler i det aterosklerotiske plaket [15].

Migrasjon av monocytter til intima, differensiering til makrofager og dannelse av makrofag-skumceller

Ved utvikling av aterosklerotiske plakk adhereres monocytter og andre leukocytter fra sirkulasjonen, til aktiverte endotelceller i arterieveggen [11, 14]. Monocytter responderer på kjemokiner, cytokiner og makrofag-vekstfaktorer produsert av vaskulære endotelceller, glatte muskelceller og infiltrerte celler i arterieveggen [6]. Disse inflammatoriske mediatorene fører til migrasjon av monocytter fra blodsirkulasjonen til arteriell intima og differensiering til makrofager idet monocyttene ankommer subendotelområdet (figur 1-2) [7]. Proinflammatoriske cytokiner (for eksempel tumornekrosefaktor- α (TNF α)), uttrykt i det aterosklerotiske plaket, stimulerer adherente leukocytter til migrering mot intima [11]. Kjemokiner er en familie inflammatoriske cytokiner som er kjent for å føre til direkte migrering av leukocytter til inflammatorisk vev [15]. OxLDL er også vist å delta aktivt i denne prosessen, ved å modulere den inflammatoriske responsen [13]. Produkter av oxLDL fungerer som kjemoattraktanter for monocytter og fører til adhesjon mellom vaskulære endotelceller og monocytter [6]. Flere kjemokiner induserer monocytt-migrasjon, og monocytt kjemoattraktant protein-1 (MCP-1) anses som den viktigste [11]. Vaskulær celleadhesjonsmolekyl-1 (VCAM-1) på arterieveggens endotelceller bindes spesifikt til monocytter og T-lymfocytter, og bidrar til rekruttering av leukocytter til det aterosklerotiske plaket ved å sørge for tettere adherens [3, 11]. Videre er makrofag kolonistimulerende faktor (M-CSF) avgjørende for differensiering av monocytter til makrofager, proliferasjon og overlevelse av makrofager i plaket [11]. Det er vist i en studie med en human monocytt cellelinje (THP-1) at oxLDL induserer monocytt-differensiering via aktivering av makrofag kolonistimulerende faktor reseptor (M-CSF-R). Stimulering av differensiering fra monocytter til makrofager er selektivt for oxLDL, ikke nativt LDL, og krever internalisering og metabolisering av oxLDL i cellen [14].

Makrofag-derivert skumcelledannelse er et fremtredende særpreg i humane aterosklerotiske plakk, og er vanligvis korrelert med opptak og inflammatorisk respons av oxLDL (figur 1-2) [16, 17, 19]. Lipidrike skumceller med opprinnelse fra makrofager, glatte muskelceller og andre vaskulære celler, akkumuleres i intima. Det fokuseres ofte på makrofager i patogenesen av aterosklerose, på grunn av deres viktige rolle som modulatorer av både lipidmetabolisme og immunresponsen. Oksidering av lipoproteiner anses som et hovedpunkt i patogenesen av aterosklerose. Oksiderte lipoproteiner tas opp i større grad av makrofager, i forhold til nativt LDL. Det antas at skumcelledannelse induseres av oxLDL [17, 20].



Figur 1-2: Inflammatorisk rolle av monocyter og makrofager i et aterosklerotisk plakk. Sirkulerende monocyter adhererer til vaskulære endotelceller, migrerer til subendotelområdet, og etterfølges av differensiering til makrofager. Makrofagene skiller ut mediatorer som gir inflammasjon og vevsskade [1].

Oksysteroler og lever X reseptorer (LXR)

Lever X reseptorer (LXR) er kjerne reseptorer som er involvert i transkripsjonskontroll av lipidmetabolisme og inflammasjon. LXR er avhengig av ligandbinding for aktivering, og danner heterodimere med retinoid X reseptor (RXR). LXR fungerer som kolesterolsensorer, og aktiveres ved forhøyet intracellulært kolesterolnivå i flere celletyper [21]. Primærfunksjonen til LXR i makrofager er å vedlikeholde cellulær kolesterolhomeostase. Aktivering av LXR i lipidrike makrofager fører til induksjon av gener involvert i utskillelse av kolesterol. I tillegg til medvirking ved lipidmetabolisme, er det funnet at LXR påvirker inflammasjonsresponser i makrofager. Syntetiske LXR agonister er vist å stimulere kolesterolutskillelse, inhibere inflammasjon *in vivo* og forsinke utvikling av aterosklerose i dyremodeller [22].

Det finnes 2 isoformer av LXR; lever X reseptor- α (LXR α) og lever X reseptor- β (LXR β). LXR α er kun uttrykt i vev som involverer lipidmetabolisme, mens LXR β uttrykkes i de fleste vev. Oksysteroler er endogene ligander av LXR, og bindes til og aktiverer LXR ved fysiologiske konsentrasjoner [22, 23].

LXR-aktivering forhindrer dannelse av humane makrofag-skumceller fra monocytter ved å inhibere væskefase pinocytose av LDL (se 1.1.2). Humane monocyttiske cellelinjer som differensierer til makrofager med M-CSF tar opp store mengder nativt LDL via reseptoruavhengig, væskefase pinocytose [21]. Buono *et al.* [21] har vist at både syntetiske (T0901317) og endogene (22(R)-hydroksykolesterol) LXR-agonister inhiberer makrofagpinocytose av LDL.

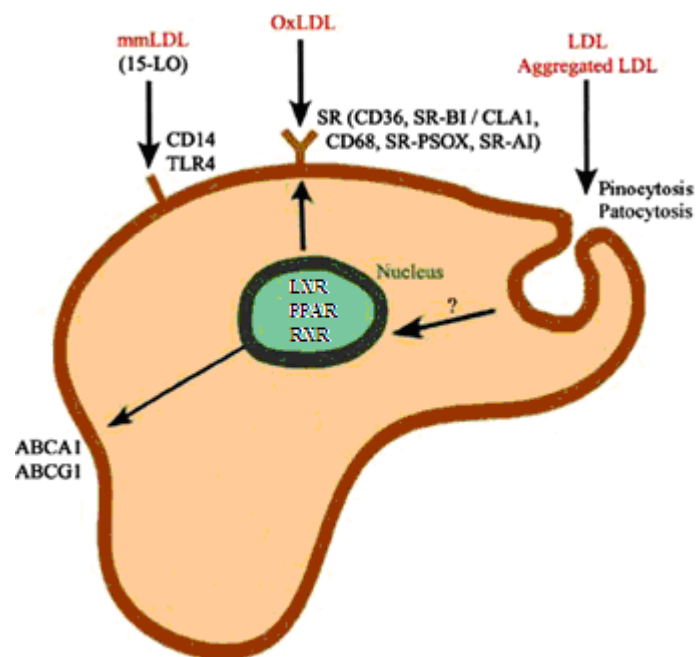
1.1.2 Opptak og utskillelse av LDL

Makrofagbinding og opptak av oxLDL er påvist å spille en nøkkelrolle i dannelse av lipidrike skumceller, og dermed utvikling av aterosklerotiske plakk [24]. OxLDL tas spesifikt opp av makrofager via "scavenger" reseptorer (SR). SR er definert som oxLDL-bindende reseptorer, og uttrykkes på makrofager og skumceller i aterosklerotiske plakk [6]. OxLDL forsterker uttrykket av noen SR som SR-A og CD36, og kan dermed fungere som en positiv feedbackmekanisme og gi økt skumcelledannelse. Det finnes ulike SR, og det er fremdeles uklart hvilke reseptorer som er mest relevante for opptak av oxLDL og dannelse av makrofag-deriverte skumceller. Klasse A "scavenger" reseptorer (SR-AI, SR-AII og SR-AIII), klasse B SR (CD36) og klasse D SR (CD68) regnes som de viktigste. Det er vist at CD36, SR-BI og CD68 spiller en signifikant rolle i dannelse av skumceller ved behandling av makrofaglignende THP-1 celler med oxLDL [17]. CD36 uttrykkes blant annet av monocytter og makrofager. *In vitro* studier viser at 60-70 % av makrofag-deriverte skumceller induisert av oxLDL kan være CD36-avhengig [24]. Mulige mekanismer for opptak og utskillelse av LDL er illustrert i figur 1-3.

MmLDL kan bindes til membranglykoproteinet CD14 og "Toll-like" reseptor 4 (TLR4). Uttrykket av TLR, spesielt TLR1, 2 og 4, øker i humane aterosklerotiske plakk, og denne tendensen foregår hovedsakelig på endotelceller og makrofager. Uttrykket av TLR4 oppreguleres av oxLDL og mmLDL [15, 17]. Makrofager kan også akkumulere LDL via væskefase endocytose. Aggregering av nativt LDL fører til opptak i makrofager. Opptaket

medieres av aktinavhengig og aktinuavhengig endocytose, som henholdsvis pinocytose og patocytose [17]. Dette viser at skumcelledannelse ikke er avhengig av LDL-modifisering eller opptak via reseptorer til makrofager [21].

Kolesterolutskillelse er like viktig som kolesterolakumulering når det gjelder differensiering av makrofager til skumceller. ATP-bindende kassettransportere (ABC) spiller en hovedrolle ved utskillelse av kolesterol fra makrofager. Peroxisom proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR) og LXR inngår i kjernereseptorfamilien og regulerer genekspressjon ved å danne heterodimerkomplekser med RXR. Både PPAR og LXR stimulerer ABC-mediert kolesterolutskillelse. Reseptorene kan også påvirke oxLDL-opptak ved oppregulering av CD36. OxLDL induserer uttrykket av PPAR γ , mens mmLDL fungerer som aktivator for PPAR α . Både PPAR α og PPAR γ er detektert i makrofagrike områder av aterosklerotiske plakk [17].



Figur 1-3: Opptak og utskillelse av LDL. 15-LO bidrar til dannelsen av mmLDL, som bindes til CD14 eller TLR4. OxLDL-opptak medieres av "scavenger reseptorer" (SR). Kjernereseptorene PPAR og LXR påvirker både opptak og utskillelse av LDL via ATP-bindende kassettransportere (ABC). Aggregert LDL tas opp ved pinocytose (aktinuavhengig opptak) eller ved patocytose (aktinavhengig opptak) (Modifisert fra: [17]).

1.1.3 Lysosomer og aterosklerose

Lysosomer er runde intracellulære organeller omgitt av en membran. De inneholder hydrolytiske enzymer som er i stand til å nedbryte makromolekyler. I lysosomene er det en sur pH på omtrent 5, som er optimalt for aktivitet av de hydrolytiske enzymene [25].

OxLDL-hypotesen ved aterosklerose innebærer at LDL oksideres i det ekstracellulære området av aterosklerotiske plakk, etterfulgt av opptak til makrofager via SR. Det er derimot påvist høy antioksidantaktivitet i ekstracellulære væsker, som er i stand til å inhibere oksidering av LDL. Det er videre vist at ikke-oksidert acetyleret LDL blir tatt raskt opp av J774 makrofager fra mus og primære humane monocytteriverte makrofager, og dermed oksidert intracellulært. Ceroid, et uløselig lipidoksidationsprodukt, er identifisert i cellenes lysosomer. Dette indikerer at LDL-oksidering kan forekomme intracellulært, mest sannsynlig i lysosomer [6, 26].

Etter makrofagopptak av lipoproteiner via ulike opptaksmekanismer, transporteres det meste av lipoproteinene via endocytose til lysosomene. Under normale forhold metaboliseres lipidene fra lipoproteinene som ankommer cellen, og akkumuleres dermed ikke i lysosomer. I lysosomene hydrolyseres kolesterylester av kolesterylester hydrolase til fritt kolesterol, som utskilles i cytosol og fraktes videre ut av cellen. I aterosklerotiske skumceller er den normale metabolismen hemmet, slik at kolesterol og kolesterylester akkumuleres i lysosomer. Ved aterosklerose hydrolyseres først kolesterol normalt, men det oppstår en svikt i utskillelsen av fritt kolesterol fra lysosomene. Dette fører til kolesterolakkumulering, som etter hvert hemmer hydrolyse og resulterer i ytterligere akkumulering av lipider [3, 6, 18]. Elektronmikroskopi av plakk viser at mye av akkumulert lipidmateriale i skumceller finner sted i store, oppsvulmede lysosomer. Makrofager inkubert med oxLDL viser signifikant lysosomal akkumulering [3].

Det er vist at oxLDL induserer apoptose i plakkassosierte celler, som endotelceller, vaskulære glatte muskelceller (VSMC) og makrofag-skumceller [15]. Det lipidrike materialet i plakket er den mest cytotoxiske komponenten av humane aterosklerotiske plakk [27]. Oksysterolene, da spesielt 7β -hydroksykolesterol og 7-ketokolesterol, i oxLDL virker å være ansvarlige for den cytotoxiske effekten [20, 28]. Det er vist at oxLDL induserer destabilisering og skade av lysosomale membraner. Dette fører til lekkasje av lysosomalt innhold, med påfølgende celledød [20, 27]. Akkumulering av døde celler kan føre til

forverring av aterosklerotiske plakk med dannelse av en ”dødssone” [10, 29]. ”Dødssonen” består av toksisk materiale som kan føre til svekket funksjon og død av invaderende makrofager, og kan dermed forhindre eliminasjonen av plakkmateriale via fagocytose [27].

1.2 Proteaser

Proteaser (peptidaser, proteinaser eller peptid hydrolaser) er enzymer som katalyserer kløyvingen av peptidbindinger i proteiner og peptider [30, 31]. Proteaser er identifisert i alle biologiske systemer, fra virus til virveldyr. Størrelsen på proteaser kan variere fra monomere på 10 kDa, til større proteiner på flere hundre kDa [30]. Ved kløyving av proteiner blir proteaser involvert i en rekke fysiologiske prosesser som progresjon av celledyklus, DNA replikasjon, hemostase, immunrespons, og nedbrytning og gjenoppbygging av vev [31]. Proteaser inndeles i grupper på bakgrunn av deres katalytiske aktivitet. Hovedgruppene er serin-, threonin-, aspartat-, metallo- og cysteinproteaser [30, 32].

Proteaser inndeles i endopeptidaser og eksopeptidaser, avhengig av hvor enzymet spalter peptidkjeden. Endopeptidaser utøver sin katalytiske aktivitet i midtdelen av en polypeptidkjede, mens eksopeptidaser spalter en eller to aminosyrer fra enten karboksy- (C-) eller amino- (N-) terminalende av et peptid [31-33].

1.2.1 Cysteinproteaser

Det katalytiske domenet av det aktive setet i alle kjente cysteinproteaser består av aminosyrene cystein (Cys) og histidin (His) [34]. De fleste enzymene i denne gruppen er endopeptidaser [33]. Cysteinproteaser utgjør en av de største gruppene av proteolytiske enzymer og inndeles i familier på bakgrunn av proteasenes molekylstruktur. Det finnes omtrent 30 cysteinproteasefamilier [35, 36]. Det er hittil kjent at fire av disse familiene finnes i pattedyr og familien med flest medlemmer er papainfamilien (C1). I denne familien inngår blant annet cathepsin B, D, H, L og S [37, 38]. Disse enzymene er hovedsakelig lysosomale enzymer, og deltar i proteolyse i det lysosomale systemet. Cysteinproteaser ble tidligere ansett utelukkende som intracellulære enzymer, men nye data har vist at de også fungerer i det ekstracellulære området [37, 39]. I cytosol finnes calpainfamilien (C2) og caspaser (familie C14), som også er cysteinproteasefamilier. Disse proteasene fører til en

begrenset proteolyse av substrater i cytosol. Legumain er en nylig oppdaget lysosomal cysteinprotease, og tilhører familien C13. Et annet navn for enzymet er asparaginylendopeptidase (AEP) [37, 40].

Lysosomale proteaser translateres som preproenzymer, transporteres gjennom golgiapparatet som proenzymer, og lokaliseres i lysosomer som modne enzymer. Prosessering og aktivering av lysosomale proteaser reguleres nøye både av prosesserende proteaser og miljøet i lysosomene [38]. Lysosomer fungerer som optimalt lokaliseringssted for enkelte cysteinproteaser (lysosomale cysteinproteaser), med svakt surt, reduserende miljø [33].

1.2.2 Legumain

Allerede i 1987 undersøkte Shutov og Vaintraub [41] proteasers rolle ved nedbrytning av proteiner ved spiring av plantefrø. En endopeptidase, proteinase B, var i stand til å hydrolysere globulin lagringsproteiner i *Vicia sativa*-frø [41, 42]. Den optimale pH for enzymet ble bestemt til å være 5,6 [41]. Proteinase B ble identifisert som en legumainlignende cysteinprotease [43, 44] med spesifisitet for aminosyrene asparagin (Asn) eller aspartat (Asp) i P1-posisjon av peptidbindingen som spaltes [43, 45].

Det ble senere vist at Shutovs proteinase B lignet en nyidentifisert endopeptidase i bønne *Vigna aconitifolia* [46]. Enzymet fikk det anbefalte navnet legumain (EC 3.4.22.34) [40, 47]. Dalton *et al.* [48] viste etter sekvenssammenligning at proteinet Sm32 fra parasitten *Schistosoma mansoni* ligner legumain fra *Vicia sativa*. Aktiviteten av Sm32 ligner legumains substratspesifisitet og sensitivitet av inhibitorer, men avviker fra legumain når det gjelder optimal pH og temperatur for aktivering. Sm32 ble likevel karakterisert som en AEP.

Frem til 1997 er det bare beskrevet legumain fra planter og parasitten *S. mansoni*. Chen *et al.* [37] beviste derimot at legumain også finnes i pattedyr, da enzymet ble klonet og sekvensert fra menneske og gris.

Legumainsubstrater

Legumain er en lysosomal cysteinendopeptidase som spesifikt spalter proteinsubstrater karboksyterminalt for asparagin [37]. Denne egenskapen skiller legumain fra andre lysosomale proteaser [34, 37]. Det er også vist at legumain kan hydrolysere aspartatbindinger [45, 49].

Legumain spalter benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-(4-metyl)-koumarylamid (Z-Ala-Ala-Asn-NHMec), som er et syntetisk substrat og benyttes ved måling av legumainaktivitet. Både aktiviteten og stabiliteten av legumain er avhengig av pH. Legumain er stabilt i pH-intervallet 3-6, og maksimal aktivitet oppnås ved pH 5,8. Enzymet denatureres irreversibelt ved pH 7 eller høyere [37, 46].

Aktivitet og lokalisering

Aktiviteten av legumain er høyest i nyrer hos rotte, gris og kanin. Milt, lever, lunge, tykktarm, tynntarm og muskel er andre vev (stort sett hos rotte) hvor legumainaktivitet er påvist. Enzymet er også detektert i human placenta [37]. Antigenpresenterende celler (APC), som makrofager, uttrykker legumainaktivitet [50, 51].

Etter subcellulær fraksjonering av nyre fra rotte og mus, ble det påvist at legumain er et lysosomalt enzym [45, 52]. Plantelegumain er lokalisert i vakuoler [53].

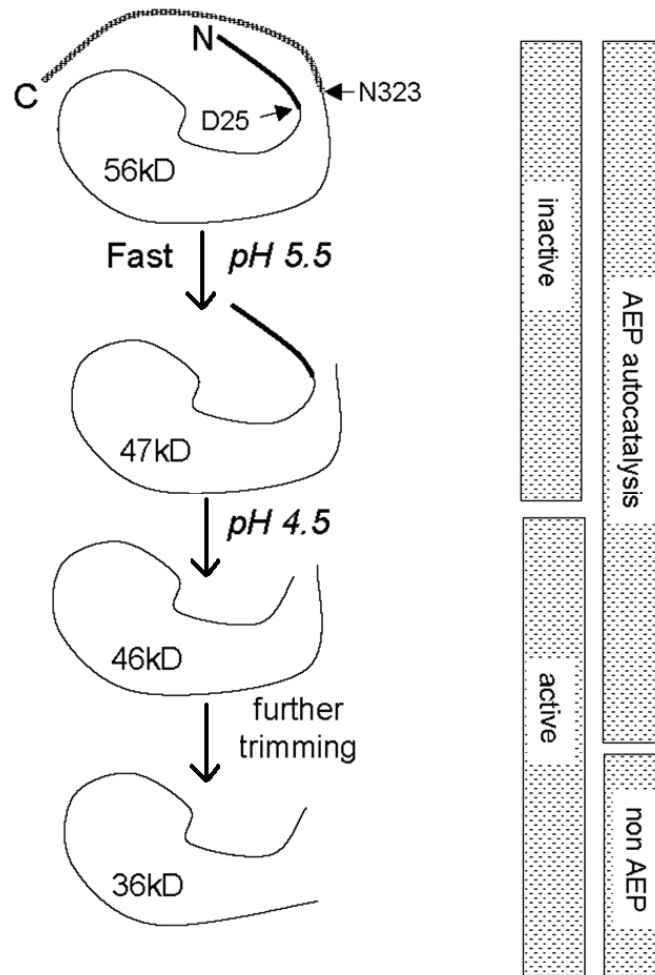
Struktur

I følge MEROPS peptidase database [40] viser aminosyresekvensen av legumain at enzymet tilhører en egen proteasefamilie C13. Den komplementære DNA sekvensen (cDNA) av legumain består av 1393 basepar, som koder for et protein på 433 aminosyrer [37].

Chen *et al.* [34] fant i sitt arbeid at aminosyrene His¹⁵⁰ og Cys¹⁹¹ er viktige for legumains katalytiske aktivitet. Aminosyresekvensen som utgjør det aktive setet i legumain ble sammenlignet med andre cysteinproteasefamilier. Motivet His¹⁵⁰-Gly-...-Ala-Cys¹⁹¹, som består av histidin og cystein, ble identifisert i legumain. Det samme motivet finnes blant annet også i caspase-1 familien (C14), som er aspartatspesifikke endopeptidaser, og viktige i apoptose hos dyreceller. Felles karakteristika for disse 2 proteasefamiliene (C13 og C14) er lignende proteinstruktur, og begge familiene tilhører klan CD [40]. En klan representerer en eller flere familier med evolusjonsmessige likheter i tertiærstrukturen eller det katalytiske setet [40]. Proteasene i klan CD er alle endopeptidaser med selektivitet for spesifikke aminosyrer i P1-posisjon av peptidsubstrater [54].

Prosessering og aktivering

Legumain translateres som en preproform og transporteres gjennom golgiapparatet som en proform på 56 kDa (figur 1-4). Deretter lagres de i lysosomer som aktive enzymer med molekylmasse på 46 kDa [55].



Figur 1-4: Oversikt over prosessering og aktivering av legumain. Det inaktive proenzymet på 56 kDa spaltes til en aktiv form av enzymet på 46 kDa. Denne omgjøringen skjer ved autokatalytisk spaltning etter Asn³²³ etterfulgt av spaltning etter Asp²⁵ ved lav pH. Andre lysosomale proteaser fører til ytterligere kløyving av enzymet, og dannelse av moden og aktivt 36 kDa legumain. AEP, asparaginylendopeptidase (legumain) (Modifisert fra: [49]).

Det ble vist at aktiveringen av enzymet skjer autokatalytisk og er avhengig av sur pH. Det inaktive proenzymet på 56 kDa spaltes først C-terminalt etter Asn³²³, og gir en inaktiv form av enzymet på 47 kDa. Spaltning etter Asn³²³ er nødvendig for å danne et aktivt enzym [49, 55]. Videre spaltes enzymet N-terminalt etter Asp²⁵ ved pH<5, slik at den aktive formen på 46 kDa dannes. Legumainformen på 46 kDa prosesseres ikke ytterligere *in vitro*. I levende celler derimot ble eksogent tilført proenzym raskt omgjort til den modne, og aktive, formen

på 36 kDa. Dette trinnet medieres sannsynlig av andre lysosomale proteaser, men hvilke proteaser som er involvert er foreløpig ukjent [49]. Papain-type cysteinproteaser kan være involvert i prosessering av legumain [38].

Biologiske funksjoner

Hydrolyse av asparaginyllbindinger er en viktig prosess ved prosessering av noen proteaser. Legumain kan fungere som en aktivator av progelatinase A (pro-MMP-2). Gelatinase A (MMP-2) deltar i angiogenese og metastase ved tumorprogresjon [56]. Cathepsin B som er involvert i tumorinvasjon og metastase, kan også aktiveres av legumain [57]. Legumain uttrykkes i høy grad i tumorer ved kolorektalkreft, og andre krefttyper [58, 59].

Legumain medvirker ved prosessering av bakterielt antigen for "major histocompatibility complex" (MHC) klasse II i lysosomale og endosomale systemer i APC [50]. Legumain deltar også i andre fysiologiske systemer. Choi *et al.* [60] har studert osteoklaster i bein, og vist at legumain spiller en viktig rolle ved inhibering av osteoklaster. Denne aktiviteten medieres av C-terminal propeptidet som spaltes fra prolegumain ved prosessering av legumain. Videre er det vist at økt legumainaktivitet fører til fortykning ("cornification") av huden [61]. Legumain er også påvist å være involvert i progresjon av aterosklerose (se 1.3)

1.2.3 Cathepsin B

Cathepsin B tilhører proteasefamilien C1A og er, i likhet med legumain, en lysosomal cysteinprotease. Proteasefamilien C1A er en undergruppe av papainfamilien C1, som er en godt studert cysteinproteasefamilie [35, 54]. Cathepsin B ble identifisert på 1970-tallet, og er den første karakteriserte cysteinproteasen [33]. Enzymet er en karboksydipeptidase, men kan også fungere som en endopeptidase. Ved måling av cathepsin B-aktivitet brukes vanligvis substratene peptidyl-NHPhNO₂ og -NHMec (for eksempel Z-Arg-Arg-NHMec). Selv om det oppnås maksimal aktivitet ved spaltning av disse substratene ved pH 7,5-8, er enzymet ustabil ved dette pH intervallet. [54]. Cathepsin B er et lysosomalt enzym og fungerer best ved sur pH [33]. Enzymet uttrykkes i mange celletyper, men finnes spesielt i høye konsentrasjoner i makrofager i aterosklerotiske plakk [8].

Cathepsin B translateres som et preproenzym (preprocathepsin B) med en molekylmasse på 45 kDa, og transporteres i golgiapparatet som procathepsin B på 41 kDa. Deretter lokaliseres

enzymet i lysosomer, som enkelt- og dobbeltkjedet med molekylmasser på 29 kDa og 25 kDa [38]. Nishimura *et al.* [62] oppdaget at prosesseringen fra procathepsin B til cathepsin B antagelig kan utføres av cathepsin D, og det antas at prosesseringen foregår i endosomer.

1.3 Proteasers rolle ved aterosklerose

Lipidrike monocytter og makrofager i aterosklerotiske plakk kan produsere et spekter av proteaser. Glatte muskelceller og endotelceller i plakk bidrar også til produksjonen av proteaser. Proteasene, spesielt MMP, er i stand til å nedbryte bestanddeler av plakkets ECM og den fibrøse kappen som omgir plaket. Dette medfører at plaket blir sårbart og lettere kan bryte [9, 10, 16, 39]. MMP og serinproteaser er kjent for å delta i disse patologiske prosessene. I humane aterosklerotiske plakk uttrykkes flere lysosomale proteaser inkludert cathepsin B, D, K, L og S, som kan påvirke plakkutvikling og -stabilitet. Nyere data viser ekstracellulær deltagelse av lysosomale cysteinproteaser ved ECM-nedbrytning i aterogenese. Cysteinproteaser som cathepsin B, L, S og K kan utskilles og fungere på eller i nærheten av celleoverflaten, ved hjelp av mekanismer som hittil ikke er klarlagt. Det er derimot påvist at makrofager kan danne surt pericellulært miljø. Pattedyr har utviklet flere mekanismer for beskyttelse mot uhensiktsmessig proteolyse, slik som endogene inhibitorer. Slike mekanismer er derimot ofte svekket ved inflammatoriske tilstander. Dette antyder at det oppstår ubalanse mellom proteaser og tilhørende inhibitorer ved aterosklerose [6, 8-10, 39, 50].

Nylige data indikerer at legumain, i likhet med andre proteaser, kan ha en viktig rolle ved kontroll av nedbrytning, og nydannelse av ECM. Denne prosessen er kritisk ved flere patologiske tilstander, som ved utvikling av aterosklerose. Fibronektin, hovedbestanddelen av ekstracellulært matriks, nedbrytes av legumain [63]. Legumain er også i stand til å aktivere MMP og cathepsiner [12].

Det er vist at både uttrykk og aktivitet av legumain er høyere i ustabile plakk sammenlignet med stabile plakk [12, 51]. I et aterosklerotisk plakk uttrykkes legumain i høyere grad i skulderregionen av plaket, og er forbundet med tilstedeværelse av makrofager og makrofag-deriverte skumceller [12, 64]. Helt nylig er det vist at legumain kan fungere som en kjemoattraktant ved å indusere migrasjon av monocytter og endotelceller *in vitro* [64].

1.4 Mål for oppgaven

Makrofag-derivert skumcelledannelse som følge av oxLDL-opptak er sentralt i patogenesen av aterosklerose, og disse cellene er hovedkilden til proteaser (inkludert cysteinproteasene legumain og cathepsin B) i aterosklerotiske plakk. Det antas at det inflammatoriske og lipidrike miljøet i aterosklerotiske plakk kan påvirke uttrykket og aktiviteten av legumain og cathepsin B, med konsekvenser som blant annet destabilisering av plakk.

Et av målene med oppgaven er å undersøke uttrykket av legumain og cathepsin B i symptomatiske og asymptomatiske aterosklerotiske carotisplakk fra pasienter. Et annet mål er å simulere makrofag-skumceller i aterosklerotisk plakk ved hjelp av en cellemodell og behandling med oxLDL, inflammatoriske cytokiner, oksysteroler og andre LXR-agonister, for å studere uttrykk og aktivitet av legumain og cathepsin B. Cathepsin B, som er en bedre karakterisert lysosomal cysteinprotease, vil bli studert for sammenligning med legumain. Cellemodellen som vil bli brukt er henholdsvis native og PMA-stimulerte THP-1 celler. THP-1 celler er en human monocyttilignende cellelinje som differensierer til makrofaglignende celler etter stimulering med PMA. Studier av legumain og cathepsin B *in vitro* i monocytter og makrofager vil kunne gi en bedre forståelse for regulering av enzymene *in vivo* i aterosklerotiske plakk.

2. MATERIALER OG METODER

2.1 Kjemikalier og reagenser

22(R)-hydroksykolesterol (22R) (H9384)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
22(S)-hydroksykolesterol (22S) (H5884)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
2-merkaptoetanol, C ₂ H ₆ SO (M7522)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Akrylamid/Bis løsning (30 %) (161-01 56)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Albumin standard (23209)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ammoniumpersulfat, H ₈ N ₂ O ₈ S ₂ (161-0700)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Anti-Cathepsin B, Human liver (Rabbit), primær antistoff (219408)	Calbiochem [®] , Merck, Darmstadt, Tyskland
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Bromfenolblått, C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S (161-0404)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
BSA, bovin serumalbumin =96 % (A94418-50G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, MTS (G3580)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
CHAPS, C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S (C3023-IG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (1183615301)	Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland
Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (1644793)	Roche, Basel, Sveits
Dinatrium-EDTA, Na ₂ C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ (00 064)	Ferak Berlin, Tyskland
Dinatriumhydrogenfosfat, Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (28029.292)	VWR Prolabo, Fontenay, Frankrike
DMSO, dimetylsulfoksid, (CH ₃) ₂ SO (D2650)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA

MATERIALER OG METODER

DTT, dithiothreitol, C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂ (438117)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
ECL™ Blotting Detection Reagents (RPN 2209)	GE Healthcare/Amersham, Buckinghamshire, Storbritannia
FBS gold, Føtalt bovins serum gold, (PAA A15-649)	PAA Laboratories, Pasching, Australia
Fettfri tørrmelk	Normilk, Levanger, Norge
Fungizone (PAA P11-001)	Bristol-Meyers Squibb, NY, USA
Glukose, C ₆ H ₁₂ O ₆ (G8644)	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
Glysin, C ₂ H ₅ NO ₂ (101194M)	VWR international, Poole, England
Goat Anti-Rabbit, antistoff (176-6515)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
HEPES, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S (H0887)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Isobutanol, C ₄ H ₁₀ O (984)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kodak X-Ray developer, fremkaller (5070933)	Carestream Health, Rochester, NY, USA
Kodak X-Ray fixer (507 1071)	Carestream Health, Rochester, NY, USA
Metanol, CH ₃ OH (1.06018.2500)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumacetat, NaC ₂ H ₄ O ₂ ·3H ₂ O (6267.0500)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumcitrat, Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O (6448)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumdihydrogenfosfat, NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (6346)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumhydroksid, NaOH (6495)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid, NaCl (1.06404.1000)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumpyruvat, C ₃ H ₃ NaO ₃ (S11-003)	PAA Laboratories, Pasching, Australia
n-oktyl-β-D-glukopyranosid (08001)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
OxLDL	Institutt for indremedisinsk forskning, Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF, Oslo,

	Norge (se appendiks, prosedyrer)
Penicillin-Streptomycin (P0781)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
PMA, 12-O-tetradekanoylforbol 13-acetat (P 1585)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Ponceau S løsning (P7170)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Precision Plus Protein™ (161-0374)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Rabbit polyclonal Antibody to Legumain, primær antistoff (ab47146-100)	Abcam, Cambridge, Storbritannia
RPMI 1640 medium med glutamin og natriumkarbonat (PAA E15-840)	PAA Laboratories, Pasching, Australia
SDS, natriumlaurylsulfat (161-0301)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Sitronsyre, C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O (1.00244.1000)	Merck, Darmstadt, Tyskland
T0901317, C ₁₇ H ₁₂ NSO ₃ F ₉ (T2320)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
TCA, trikloreddiksyre (1839)	May & Baker, Dagenham, England
TEMED, C ₆ H ₁₆ N ₂ (161-0800)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
TNF α , tumornekrosefaktor α (210-TA)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Tris (base), C ₄ H ₁₁ NO ₃ (T1503)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Trypanblått (17262-25)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tween [®] 20 (170-6531)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Z-Ala-Ala-Asn-NHMec, legumainsubstrat	Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK
Z-Arg-Arg-AMC, cathepsin B substrat (I-1135)	Bachem, Bubendorf, Sveits

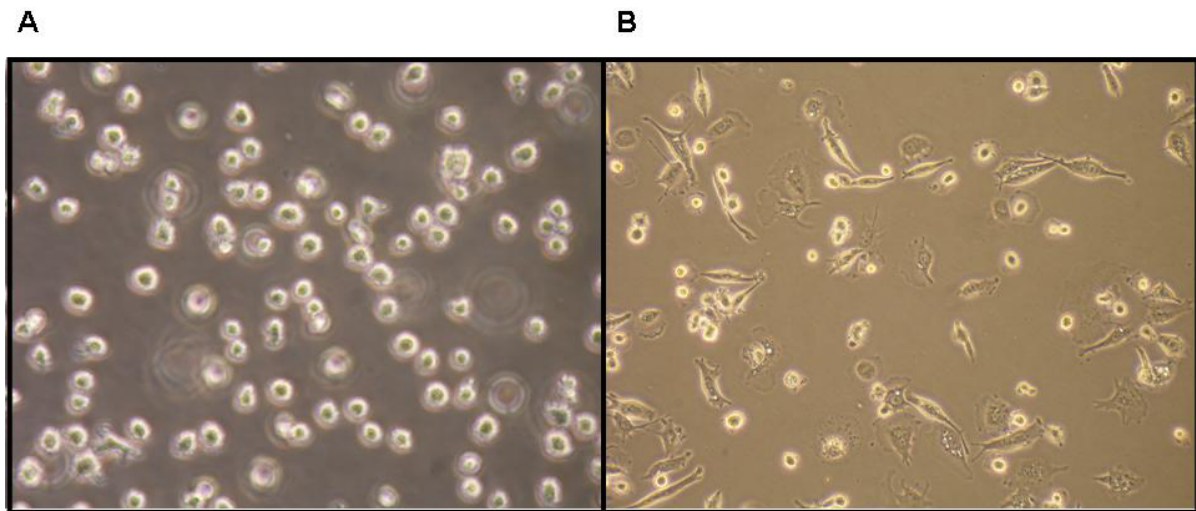
2.2 Utstyr

Bürker tellekammer	Assistant, Sontheim, Tyskland
Class II type A2 LAF-benk	Esco, Singapore
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
ECL Semi-dry Blotters, blottemaskin	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Storbritannia
Gene Tools	Syngene, Cambridge, Storbritannia
Holten Lamin Air LAF-benk	Medinor, Oslo, Norge
Inkubatorskap (modell 3548)	Forma Scientific, Ohio, USA
Kodak [®] Biomax MS Film (Z363073-50EA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Kubota 2010 sentrifuge	Medinor, Oslo, Norge
Leica DMLS mikroskop	Leica Mikroskopie & Systeme, Wetzlar, Portugal
Nitrocellulosemembraner	Hybond-ECL, Amersham, Storbritannia
Nunc 96-brønners mikrotiterplate (260836)	Nunc, Roskilde, Danmark
Nunc 96-brønners steril mikrotiterplate (167008)	Nunc, Roskilde, Danmark
Olympus CKX41 lysmikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
Quickphoto camera 2.2	Olympus, Tokyo, Japan
Universal 32 R sentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
Wallac 1420 Victor ³ Multilabel counter, mikroplateleser	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA

2.3 THP-1 celler

THP-1 (American Type Culture Collection, ATCC, TIB-202, LGC Promochem, Rockville, MD, USA) er en human monocyttlignende cellelinje isolert fra en 1 år gammel gutt med akutt monocyttisk leukemi [65]. Cellene er i utgangspunktet ikke adherente, men ved stimulering med det syntetiske stoffet 12-O-tetradekanoylforbol 13-acetat (PMA) differensierer THP-1 cellene til adherente makrofaglignende celler (figur 2-1).



Figur 2-1: THP-1 celler med og uten PMA-stimuli. A: Native THP-1 celler er runde og ikke adherente (20 x). B: Ved stimulering med PMA (40 ng/ml) differensierer cellene til adherente makrofaglignende celler (10x).

2.3.1 Tining av THP-1 celler

Cellene, som lagres i flytende nitrogen, ble tint opp ved forsiktig omvendning i vannbad ved 37 °C, til det var en liten isklump igjen. Cellebeholderen ble desinfisert med 70 % etanol. Optint cellemateriale (1 ml) ble overført til en Corning 75 cm² dyrkningsflaske, og tilsatt 9 ml forvarmet (37 °C) THP-1 dyrkningsmedium (se 2.3.2). Celleflasken ble inkubert over natt ved 37 °C i fuktig atmosfære med 5 % karbondioksid (CO₂) [65].

2.3.2 Dyrking og splitting av THP-1 celler

Alt arbeid med THP-1 cellene ble utført i LAF-benk med aseptisk arbeidsteknikk for å forhindre kontaminering. Det ble tilsatt nytt medium (10 ml) hver 3. – 4. dag. THP-1 dyrkningsmediet bestod av RPMI 1640 medium med 2 mM L-glutamin og 1,5 g/L natriumbikarbonat, 4,5 g/l glukose, 10 mM HEPES, 1 mM natriumpyruvat, 0,05 mM 2-merkaptoetanol, 10 % føtalt bovins serum gold (FBS gold), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin og 2,5 µg/ml fungizone (amphotericin B).

For å bestemme cellekonsentrasjonen i en flaske ble det benyttet celledelling i Bürker tellekammer under mikroskop. Cellesuspensjon (100 µl) ble blandet med 100 µl 0,4 % sterilfiltrert trypanblått (se appendiks, løsninger). Trypanblått farger døde celler blå. Det ble

regnet gjennomsnitt av antall levende celler i diagonalene av to tellekammer. Cellekonsentrasjonen kunne dermed beregnes ved hjelp av formelen:

$$\text{Antall celler/ml} = ((\text{gjennomsnitt celler} \times 4,2)/100) \times 10^6$$

Cellene ble splittet en gang i uken, dvs. når cellekonsentrasjonen nærmet seg 1×10^6 celler/ml. Ved splitting ble 1×10^6 celler sentrifugert ved $150 \times g$ i 5 minutter, deretter ble cellepelletten resuspendert i 10 ml nytt medium og overført til en Corning 75 cm² dyrkningsflaske.

2.4 Celleforsøk til måling av totalprotein, enzymaktivitet, og Western blotting

2.4.1 PMA-stimulerte THP-1 celler

Til forsøk ble 5×10^5 celler i 1 ml THP-1 dyrkningsmedium sådd ut i Costar 6-brønners brett. PMA (40 ng/ml) ble tilsatt og cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer. Etter stimulering i 24 timer med PMA, ble hver brønn vasket tre ganger med RPMI 1640. Nytt dyrkningsmedium ble tilsatt og cellene ble behandlet med ulike stoffer (oxLDL, 22(R)-hydroksykolesterol (22R), 22(S)-hydroksykolesterol (22S), T0901317 eller TNF α) og tilhørende kontroller, etterfulgt av inkubering i 48 timer. Mediet ble pipettert av og frosset (-80 °C) til senere analyse av cytotoxicitet (se 2.11).

Cellene ble deretter høstet og lysert. Ved høsting ble cellene vasket tre ganger med 1xPBS (se appendiks, løsninger) før lysering med lysisbuffer (pH 5,8) (se appendiks, løsninger). Lysatene ble frosset (-70 °C) og tint tre ganger, og deretter sentrifugert ved $10\,000 \times g$ og 4 °C i 5 minutter. Cellelysaten ble brukt til måling av totalprotein (se 2.7) og enzymaktivitet (se 2.8). Ved høsting av cellelysat til Western blotting (se 2.9), ble lysisbuffer tilsatt proteaseinhibitorcocktail (se appendiks, løsninger).

2.4.2 THP-1 celler (monocytt)

Til forsøk ble 5×10^5 celler i 1-2 ml THP-1 dyrkningsmedium sådd ut i Costar 6-brønners brett. Cellene ble behandlet med TNF α og tilhørende kontroller, og deretter inkubert ved 37

°C med 5 % CO₂ i 48- 96 timer. Etter inkubering ble både adherente- og ikke-adherente celler høstet og lysert.

Mediet med ikke-adherente celler ble sentrifugert ved 70 x g i 5 minutter. Cellene ble separert fra mediet som ble frosset (-80 °C) til senere analyse av cytotoxicitet. Deretter ble cellene vasket to ganger med 1xPBS og sentrifugert før lysering med lysisbuffer. Høsting av adherente celler ble utført slik beskrevet for PMA-stimulerte THP-1 celler.

Lysatene ble frosset (-70 °C) og tint (30 °C) i tre sykluser og deretter sentrifugert ved 10 000 x g og 4 °C i 5 minutter. Cellelysatene ble brukt til måling av totalprotein og enzymaktivitet. Ved høsting av cellelysat til Western blotting, ble lysisbuffer tilsatt proteaseinhibitorcocktail (se appendiks, løsninger).

2.5 Celleforsøk til måling av celleviabilitet (MTS)

2.5.1 PMA-stimulerte THP-1 celler

Til forsøk ble 1×10^5 celler sådd ut i hver brønn med THP-1 dyrkningsmedium (100 µl) i Nunc 96-brønners sterile mikrotiterplater. Cellene ble stimulert med 40 ng/ml PMA og inkubert ved 37 °C med 5 % CO₂ i 24 timer, slik at THP-1 cellene ble adherente. Etter stimulering i 24 timer med PMA, ble hver brønn vasket tre ganger med RPMI 1640. Deretter ble det tilsatt mulige dødsinduserende stoffer (oxLDL, 22R, 22S eller TNFα) og tilhørende kontroller, og cellene ble videre inkubert i 48 timer.

2.5.2 THP-1 celler (monocytter)

Til forsøk ble 1×10^5 celler sådd ut i hver brønn med THP-1 dyrkningsmedium (100 µl) i Nunc 96-brønners steril mikrotiterplater. Det ble tilsatt mulige dødsinduserende stoffer (oxLDL, 22R, 22S eller TNFα) og tilhørende kontroller, og cellene ble inkubert ved 37 °C med 5 % CO₂ i 48 timer.

2.6 Pasienter

Patologisk plakkmateriale som ble innsamlet i forbindelse med et tidligere prosjekt [66] ble mottatt fra Institutt for indremedisinsk forskning, Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF. Carotisplakk fra 16 pasienter ble klassifisert som henholdsvis asymptomatiske (n=6) eller symptomatiske (n=10) basert på forekomst eller fravær av cerebrovaskulære symptomer i 6 måneder før operasjon. Plakkprøvene ble analysert for innhold av legumain- og cathepsin B ved hjelp av Western blotting.

2.7 Analyse av totalprotein

Metoden for bestemmelse av totalprotein i cellelysat er basert på en etablert prosedyre beskrevet av Bradford [67], og involverer bruk av "Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate". Reagenset inneholder fargestoffet "Comassie (R) Brilliant Blue G-250", som bindes til proteiner i surt miljø. Absorbansmaksimum endres fra 465 til 595 når binding til protein forekommer og det oppstår en fargereaksjon, der fargestoffet endres fra rødbrunt til blått.

"Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate" ble fortynnet med destillert vann (1:5) og sterilfiltrert. Albumin standard (0-300 µg/ml) ble fortynnet i lysisbuffer (se appendiks, løsninger) og brukt til å opprette en standardkurve for å kunne beregne proteinkonsentrasjoner i prøvene som ble analysert. Det ble tilsatt 10 µl i duplikater av standard eller prøve i hver brønn av en Nunc 96-brønners mikrotiterplate. Deretter ble alle brønner tilsatt 200 µl fortynnet fargereagens. Mikrotiterplaten ble inkubert i romtemperatur i 5 minutter før absorbansen ble målt i en mikroplateleser (Wallac 1420 Victor³ Multilabel counter) ved 25 °C og bølgelengde 595 nm. Standardkurven ble brukt til beregning av totalproteinkonsentrasjoner i cellelysatprøver, og absorbansen ble målt ved 595 nm.

Det ble alternativt brukt albumin standardkurve i konsentrasjonsområdet 0- 100 µg/ml (mellomversjon-metode for analyse av totalprotein) (se appendiks, prosedyrer) dersom noen prøver etter standardmetoden over viste lavere totalproteinkonsentrasjoner enn 50 µg/ml.

2.8 Måling av enzymaktivitet

Måling av enzymaktivitet ble utført ved hjelp av kinetikkmålinger basert på økning av fluorescens over en bestemt tid, som et resultat av spaltet substrat. Aktiviteten ble målt i en mikroplateleser (Wallac 1420 Victor³ Multilabel counter) ved 30 °C.

Cysteinproteaser er avhengig av et reduksjonsmiddel for aktivering. I denne metoden ble det benyttet DTT (dithiothreitol) som er et syntetisk reduksjonsmiddel. Lysatprøvene (20 µl) ble fordelt i en svart Costar 96-brønners mikrotiterplate. Lysisbuffer ble brukt som blindprøve og det ble målt triplikater av alle prøver. DTT ble tilsatt "assaybuffer" rett før (minst 10 minutter) analyse. Hver brønn ble ved hjelp av en automatisk injektor i mikroplateleseren tilsatt 100 µl "assaybuffer" med DTT. Mikrotiterplaten ble ristet i 10 sekunder og inkubert i 10 minutter ved 30 °C for å sikre aktivering av enzymet, før 50 µl substratløsning ble tilsatt.

Resultatet ble fremstilt som økning i fluorescens per sekund. Verdien for blindprøven ble trukket fra alle målinger og det ble beregnet gjennomsnittsaktivitet av triplikater. Enzymaktiviteten av prøvene ble korrigert i forhold til tilhørende totalproteinkonsentrasjon.

2.8.1 Legumainaktivitet

Metoden er basert på Chen *et al.* [37] og Johansen *et al.* [68] og innebærer bruk av et legumainspesifikt substrat. Substratet Z-Ala-Ala-Asn-NHMec ble brukt for å måle aktiviteten av legumain. Aktivert legumain spalter dette substratet og fører til dannelsen av fritt NH₂Mec som avgir fluorescens.

"Legumain-assaybuffer" (pH 5,8) med 1 mM DTT og legumain-substratløsning (10 µM sluttkonsentrasjon) ble tilsatt hver brønn (se appendiks, løsninger). Deretter ble fluorescens målt ved 360 nm eksitasjon og 460 nm emisjon. Det ble utført 10 målinger med inkubering i 12 minutter og risting i 3 sekunder mellom hver måling.

2.8.2 Cathepsin B-aktivitet

Metoden er basert på funn gjort av Werle *et al.* [69], og Barrett og Kirsche [70] og innebærer bruk av et cathepsin B-spesifikt substrat. Spalting av substratet Z-Arg-Arg-AMC fører til økt fluorescens som følge av dannelsen av fritt NH₂Mec.

Det ble i hver brønn tilsatt "cathepsin B-assaybuffer" (pH 5,5) med 8 mM DTT og cathepsin B-substratløsning (se appendiks, løsninger), med sluttkonsentrasjon på 20 μ M av substratet. Etter tilsetning av substratløsningen ble det målt fluorescens ved 360 nm eksitasjon og 460 nm emisjon. Det ble utført 10 målinger med inkubering i 1 minutt og risting i 3 sekunder, mellom hver måling.

2.9 Western blotting

Metoden går ut på å detektere spesifikke proteiner ved hjelp av antistoffer i prøver som inneholder flere ulike proteiner. Ved tilsetning av primærantistoff vil antistoffet binde seg selektivt til det ønskede proteinet. Det sekundære antistoffet bindes til det primære antistoffet. Enzymet pepperrot peroksidase er bundet til det sekundære antistoffet. Dette enzymet vil reagere med et substrat i "ECLTM Blotting Detection Reagents" og føre til fluorescens som kan detekteres som et bånd på en røntgenfilm. (se appendiks, prosedyrer).

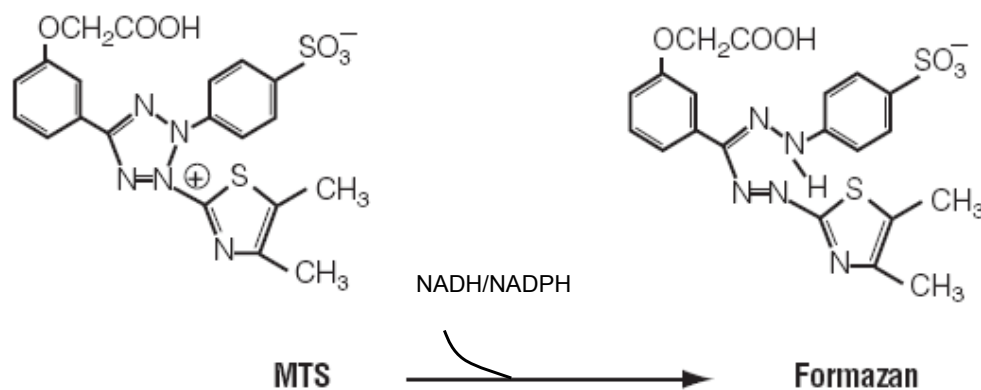
Cellelysat ble oppkonsentrert med TCA-felling (se appendiks, prosedyrer). Etter TCA-felling ble hver prøve (15 μ g totalprotein) applisert i brønner av en 12 % separasjonsgel (se appendiks, løsninger). "Precision Plus Protein standard" ble applisert på gelen i en av brønnene. Ved elektroforesen ble proteiner med ulik molekylvekt separert i gelen. Proteinene ble deretter overført fra gelen til en nitrocellulosemembran ved hjelp av en strømdrevet blottemaskin (ECL Semi-dry Blotters). Membranene ble blokket med blotto (se appendiks, løsninger) og deretter tilsatt primærantistoff mot henholdsvis legumain (1:2500, Rabbit polyclonal Antibody to Legumain) eller cathepsin B (1:4000, Anti-Cathepsin B, Human liver (Rabbit)) over natt ved 4 °C, etterfulgt av inkubering med sekundært antistoff (1:3000, Goat Anti-Rabbit) i 1 time.

Immunoreaktive bånd ble detektert ved inkubering av membranene i ECLTM Blotting Detection Reagents og eksponering av membranene på Biomax MS film.

Etter fremkalling kunne membraner stripes og tilsettes nytt primært og sekundært antistoff for deteksjon av et annet protein.

2.10 Måling av celleviabilitet (MTS)

Det ble benyttet "CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay" som er en kolorimetrisk metode for bestemmelse av celleviabilitet. "CellTiter 96[®] Aqueous One Solution" består av en MTS-tetrazoliumforbindelse og et elektronbindende reagens kalt PES (fenazin etosulfat). Dehydrogenaseenzymer i metabolsk aktive celler produserer NADPH eller NADH, som reagerer med MTS. Denne reaksjonen (figur 2-2) fører til at MTS reduseres og gir dannelse av formazan, et farget (rødbrunt) produkt, som er løselig i dyrkningsmediet. Mengde formazan som omgjøres fra MTS er direkte proporsjonalt med mengde levende celler.



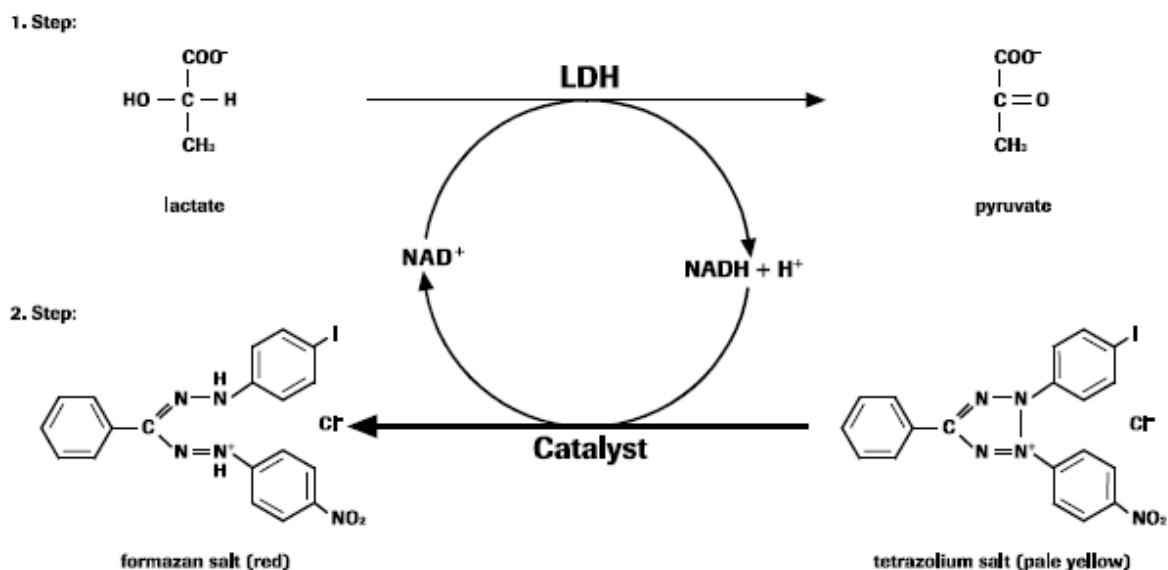
Figur 2-2: Omdannelse av MTS til formazan ved reaksjon med NADPH eller NADH i levende celler.

Etter 48 timers inkubering av THP-1 celler med mulige dødsinduserende stoffer (se 2.5), ble det tilsatt 20 µl "CellTiter 96[®] Aqueous One Solution" reagens i hver brønn. Mikrotiterplatene ble deretter inkubert ved 37 °C med 5 % CO₂ i 1 time. Det ble benyttet en mikroplateleser (Wallac 1420 Victor³ Multilabel counter) for bestemmelse av mengde formazan i hver brønn ved absorpsjonsmåling (490 nm).

2.11 Måling av cytotoxicitet (LDH-lekkasje)

"Cytotoxicity Detection Kit (LDH)" er en kolorimetrisk metode som brukes til å kvantifisere grad av cellelekkasje, ved å måle mengde utskilt laktatdehydrogenase (LDH) i cellemedium. LDH er et stabilt cytoplasmatisk enzym som finnes i alle celler. Celler med skadet

cellemembran utskiller raskt LDH som korrelerer med grad av cytotoxisitet. LDH omdanner laktat til pyruvat som fører til at NAD^+ reduseres til NADH/H^+ . Metoden baserer seg videre på at tetrazoliums salt omdannes ved hjelp av en katalysator til rødfarget formazan (figur 2-3).



Figur 2-3: Fargereaksjonene ved omdannelse av tetrazoliums salt (gul) til formazansalt (rød) ved hjelp av LDH. LDH, laktatdehydrogenase.

Metoden ble brukt til å måle LDH av medium fra THP-1 celler tilsatt mulige dødsinduserende stoffer (oxLDL, oksysteroler eller $\text{TNF}\alpha$) (se 2.4). Det ble tilsatt 100 μl mediumprøver i en 96-brønners mikrotiterplate. Kettet bestod av en katalysator (Diaphorase/ NAD^+) og en fargeløsning (iodotetrazoliumklorid og natriumlaktat). Katalysatoren og fargeløsningen ble blandet til en reaksjonsmikstur rett før bruk. Det ble tilsatt 100 μl reaksjonsmikstur til hver brønn før inkubering i romtemperatur i 30 minutter, beskyttet fra lys.

Formazan har et absorpsjonsmaksimum rundt 500 nm. Absorbansen av prøvene ble målt i en mikroplateleser ved 492 nm for bestemmelse av mengde formazan i hver brønn og reaksjonsmiksturen uten medium ble brukt som blindprøve.

2.12 Statistiske analyser

Sammenligning av effekter ved ulik behandling av THP-1 cellene og tilhørende kontroller, ble statistisk analysert for signifikans ved hjelp av programvaren GraphPad® Prism 4,0. Gjennomsnittet av hvert forsøk (n) ble illustrert med beregnet standardfeil (SEM), som viste avvik fra gjennomsnittet. Data ble presentert som normaliserte verdier i forhold til kontroll ved stor spredning mellom enkeltforsøk. Signifikansnivå ble valgt som 5 % og p-verdier under 0,05 ble ansett som signifikante. For å vurdere usikkerheten av data ble et tosidig 95 % konfidensintervall beregnet. Det ble benyttet analysemetodene lineær regresjonsanalyse og Mann Whitney test.

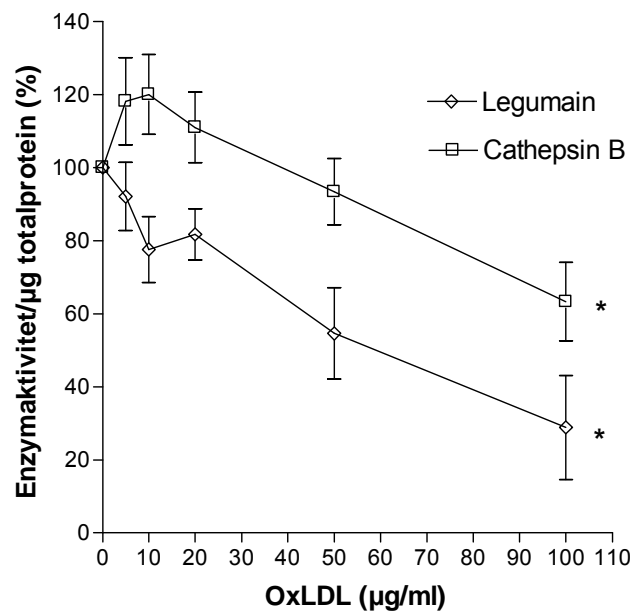
Lineær regresjonsanalyse ble benyttet i de tilfeller hvor data illustrerte tilnærmet lineære kurver, og stigningstallet med konfidensintervaller ble beregnet. Det ble bestemt om stigningstallet av linjen var signifikant forskjellig fra 0, som ga en indikasjon om økt eller redusert effekt.

Mann Whitney test er en ikke-parametrisk analyse som sammenligner 2 uparete grupper basert på minst 4 forsøk av hver gruppe (tosidig). Ikke-parametrisk analyse ble brukt på grunn av det ikke kunne antas normalfordeling av data. Ved analyse med Mann Whitney test ble alle verdier rangert (fra lav til høy) uten å ta hensyn til hvilken gruppe verdiene tilhører. Rangeringene ble deretter summert i hver gruppe og sammenlignet med en annen uavhengig gruppe. Det ble bestemt om gruppene var signifikant forskjellig fra hverandre ($p < 0,05$).

3. RESULTATER

3.1 Effekt av oxLDL på legumain- og cathepsin B-aktivitet i PMA-stimulerte THP-1 celler

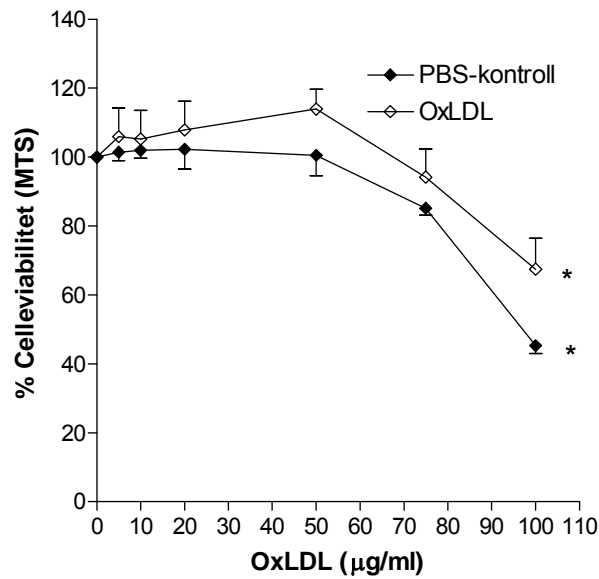
For å studere om oxLDL viste spesifikk effekt på legumainaktivitet i PMA-stimulerte THP-1 celler eller effekt på aktiviteten av andre cysteinproteaser, ble både legumain- og cathepsin B-aktivitet målt. Ved behandling av THP-1 celler (monocytt) med ulike konsentrasjoner av oxLDL ble ikke legumainaktiviteten påvirket i særlig grad (data ikke vist, $n=1$), og i tillegg var legumainaktiviteten lav ved alle oxLDL-konsentrasjoner i ustimulerte celler sammenlignet med aktiviteten i PMA-stimulerte THP-1 celler. Derfor ble de videre studiene utført i PMA-stimulerte THP-1 celler.



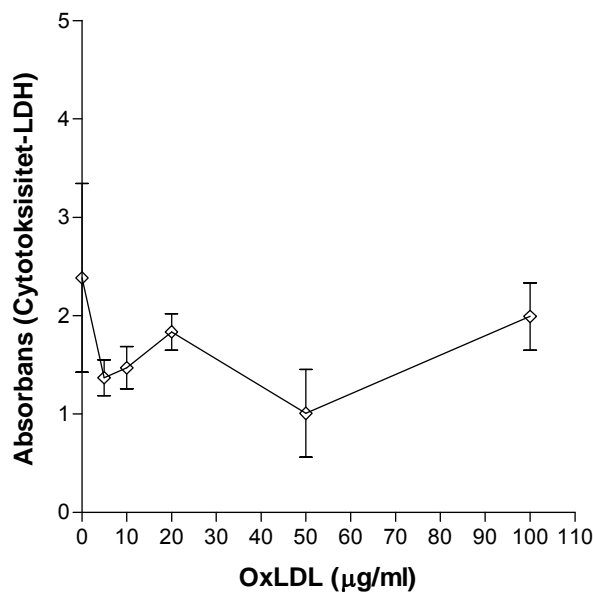
Figur 3-1: Effekt av oxLDL på legumain- og cathepsin B-aktivitet i PMA-stimulerte THP-1 celler. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml , 5×10^5 celler/ml, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med oxLDL (0, 5, 10, 20, 50 og 100 µg/ml). Aktiviteten av legumain og cathepsin B ble målt i cellelysater ved bruk av henholdsvis substratene Z-Ala-Ala-Asn-NHMec eller Z-Arg-Arg-AMC. Data viser gjennomsnittet av legumain- og cathepsin B-aktivitet (fluorescens/sekund) korrigeret for µg totalprotein og normalisert i forhold til PBS-kontroll (100 %) ± SEM ($n=3-6$ à 2 paralleller). * $p < 0,05$ (lineær regresjonsanalyse).

Det var en klar tendens til reduksjon av både legumain- ($p < 0,0001$, lineær regresjonsanalyse) og cathepsin B-aktivitet ($p = 0,009$) ved behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med økende konsentrasjoner av oxLDL (figur 3-1). Regresjonslinjen for de respektive enzymaktivitetene var signifikant ($p = 0,0001$) parallellforskjøvet i forhold til hverandre, som indikerer at legumainaktiviteten ble redusert i større grad enn cathepsin B-aktiviteten. Ved 50 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL forble cathepsin B-aktiviteten tilnærmet uendret (ca. 7 % reduksjon), mens legumainaktiviteten ble nærmest halvert (ca. 45 % reduksjon) sammenlignet med enzymaktiviteten i kontrollcellene.

Siden legumain- og cathepsin B-aktiviteten ble redusert med økende konsentrasjoner av oxLDL, var det ønskelig å klargjøre om denne effekten kunne skyldes celledød. Ved behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med 100 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL og tilsvarende mengde PBS ble det i mikroskop observert løse celler som kan tyde på celledød. For å undersøke dette ble det målt celleviabilitet (MTS) og cytotoxicitet (LDH-lekkasje til cellemedium). Celleviabiliteten ble redusert ved behandling med over 50 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL, og PBS (kontroll) viste lignende tendens (figur 3-2). For å ta hensyn til eventuelle forskjeller ved 50-100 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL og tilsvarende mengder PBS ble det utført lineær regresjonsanalyse ved dette intervallet. Det var en signifikant reduksjon av celleviabilitet ved 50-100 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL (lineær regresjonsanalyse, $p = 0,0027$) og ved tilsvarende mengder PBS ($p = 0,0001$). Det ble derimot ikke vist statistisk signifikant forskjell mellom behandlingene. Det var ingen tegn til lekkasje av LDH til mediet fra PMA-stimulerte THP-1 celler behandlet med ulike konsentrasjoner av oxLDL (figur 3-3).



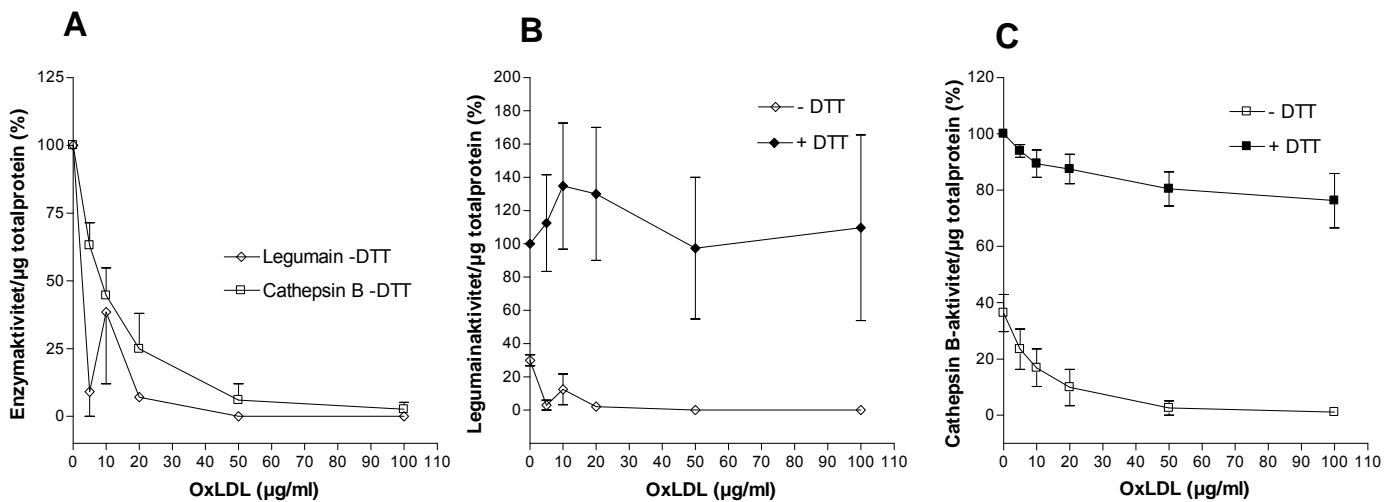
Figur 3-2: Effekt av oxLDL på celleviabilitet av PMA-stimulerte THP-1 celler. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml , $1 \times 10^5 \text{ celler/ml}$, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med oxLDL (0, 5, 10, 20, 50, 75 og 100 µg/ml) eller tilsvarende mengder PBS (kontroll). Deretter ble MTS-reagens tilsatt og cellene ble inkubert i ytterligere en time. Data viser gjennomsnittet av celleviabiliteten målt som absorbans og normalisert i forhold til PMA-stimulerte celler kun tilsatt THP-1 dyrkningsmedium (100 %) \pm SEM ($n = 3$ à 3 paralleller). * $p < 0,05$ (50-100 µg/ml , lineær regresjonsanalyse)



Figur 3-3: Effekt av oxLDL på LDH-lekkasje i PMA-stimulerte THP-1 celler. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml , $5 \times 10^5 \text{ celler/ml}$, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med oxLDL (0, 5, 10, 20, 50 og 100 µg/ml). Mengde utskilt LDH ble analysert i medium som mål på cytotoxicitet og uttrykt som absorbans \pm SEM ($n = 3$).

3.2 Direkte effekt av oxLDL på cysteinproteaseaktivitet

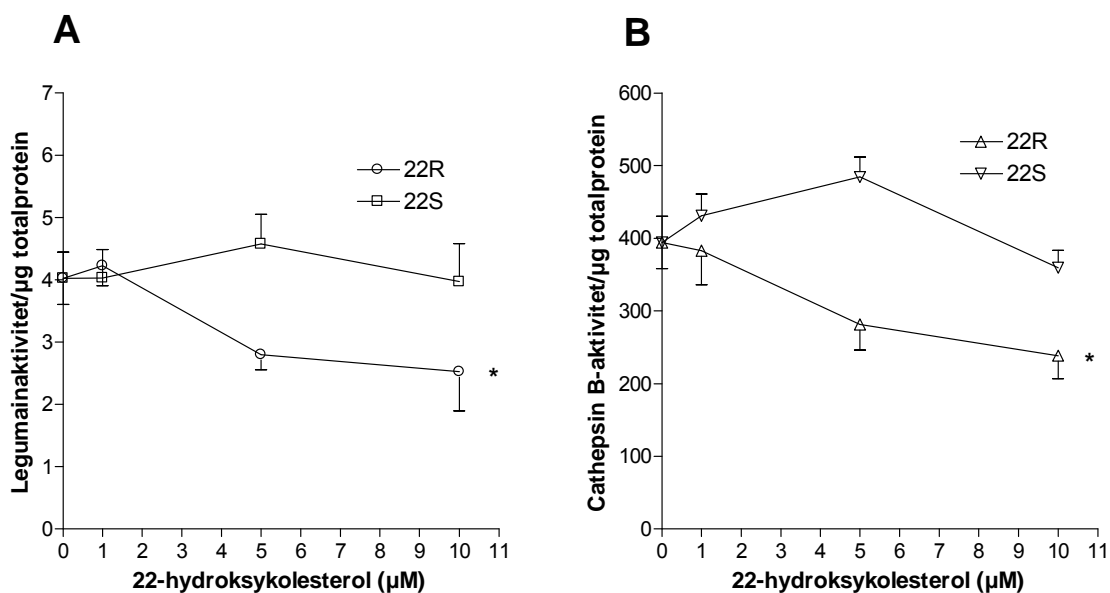
For å undersøke om oxLDL hadde direkte effekt på aktivitetene av legumain og cathepsin B ble cellelysate fra PMA-stimulerte THP-1 celler tilsatt oxLDL. Både legumain- og cathepsin B-aktiviteten ble redusert ved tilsetning av økte konsentrasjoner av oxLDL. Ved fravær av reduksjonsmiddel ble enzymaktiviteten direkte hemmet av oxLDL (figur 3-4 A). Figur 3-4 B og C viser henholdsvis høyere legumain- og cathepsin B-aktivitet ved analyse utført med reduksjonsmiddelet DTT tilstede sammenlignet med uten DTT. Når det var nok reduksjonsmiddel tilstede under målingene, ble enzymaktivitetene ikke påvirket i særlig stor grad av eksogent tilsatt oxLDL.



Figur 3-4: Effekt av oxLDL på legumain- og cathepsin B-aktivitet med og uten DTT. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 5×10^5 celler/ml, 24 timer) ble vasket, inkubert i 48 timer og lysert. OxLDL (0, 5, 10, 20, 50 og 100 µg/ml) ble satt til homogent cellelysate før inkubering i 1 time. Aktiviteten av legumain og cathepsin B ble målt i cellelysater ved bruk av henholdsvis substratene Z-Ala-Ala-Asn-NHMeC eller Z-Arg-Arg-AMC. Målingene ble utført med og uten reduksjonsmiddelet DTT. A: Data viser gjennomsnittet av legumain- og cathepsin B-aktivitet (fluorescens/sekund) normalisert i forhold til PBS-kontroll (100 %). B og C: Data er normalisert i forhold til PBS-kontroll analysert med DTT. A-C, \pm SEM (n= 2).

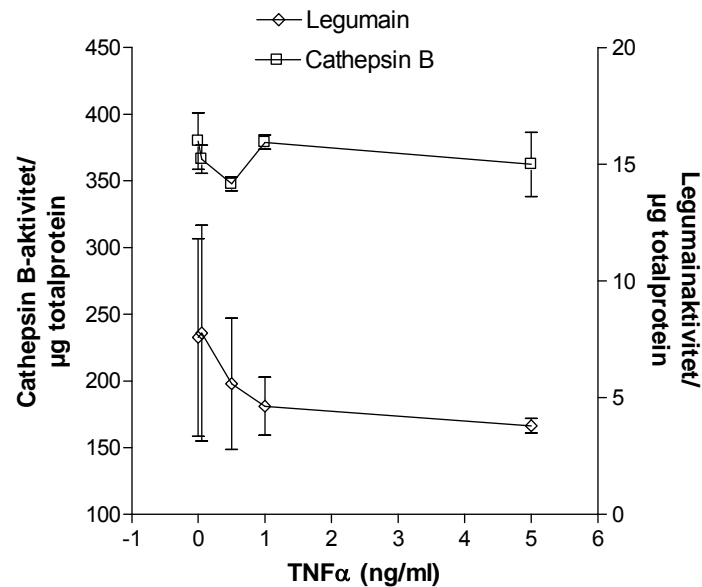
3.3 Effekt av 22(R)-hydroksykolesterol (22R) og TNF α på legumain- og cathepsin B-aktivitet i PMA-stimulerte THP-1 celler

Oksysteroler er viktige bestanddeler av oxLDL. Eksempler på oksysteroler er 22(R)-hydroksykolesterol (22R) og 22(S)-hydroksykolesterol (22S), som er endogene ligander av LXR [23, 71]. T0901317 er en syntetisk LXR-ligand [72]. Effekten av 22R ble studert på PMA-stimulerte THP-1, celler og 22S eller T0901317 ble brukt som kontroller. Ved behandling av cellene med økende konsentrasjoner av T0901317 (0, 0,1, 0,5 og 1 μ M) ble verken legumain- eller cathepsin B-aktiviteten påvirket (data ikke vist, n= 2). Legumainaktiviteten viste signifikant reduksjon ved behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med økende konsentrasjoner av 22R ($p= 0,0186$, lineær regresjonsanalyse) (figur 3-5 A). I likhet med legumainaktiviteten ble også cathepsin B-aktiviteten redusert signifikant ($p= 0,0017$, lineær regresjonsanalyse) med økt konsentrasjon av 22R (figur 3-5 B). En slik reduksjon av proteolytisk aktivitet ble ikke observert med 22S verken for legumain eller for cathepsin B (figur 3-5 A og B).



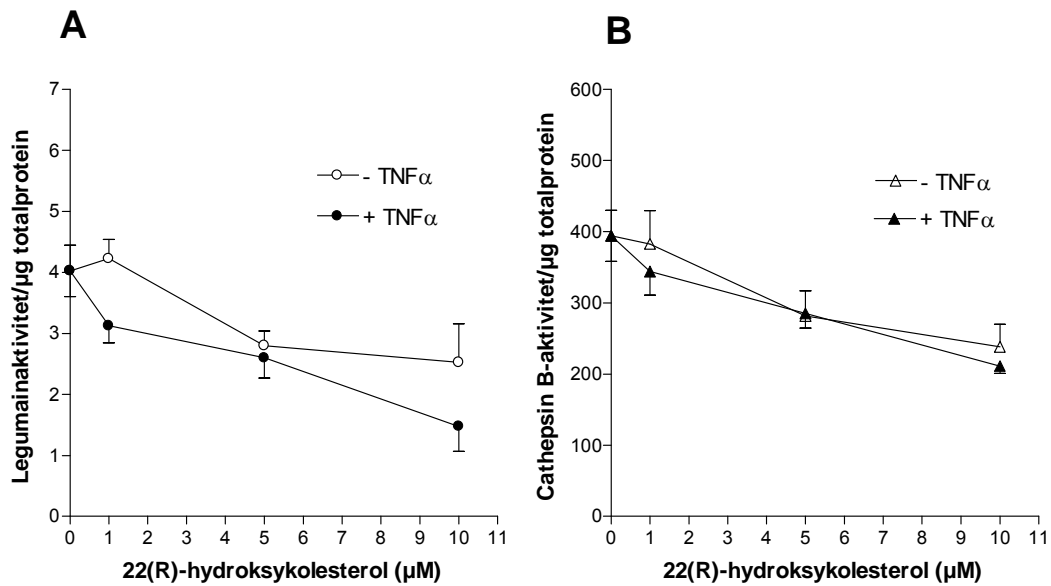
Figur 3-5: Effekt av 22(R)-hydroksykolesterol (22R) eller 22(S)-hydroksykolesterol (22S) på legumain- (A) og cathepsin B-aktivitet (B) i PMA-stimulerte THP-1 celler. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 5×10^5 celler/ml, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med 22R eller 22S (0, 1, 5, 10 μ M). Aktiviteten av legumain og cathepsin B ble målt i cellelysater ved bruk av henholdsvis substratene Z-Ala-Ala-Asn-NHMec eller Z-Arg-Arg-AMC. Data viser gjennomsnittet av legumain- eller cathepsin B-aktivitet (fluorescens/sekund) korrigeret for μ g totalprotein \pm SEM (n= 3-8 à 2 paralleller). * $p < 0,05$ (lineær regresjonsanalyse).

Proinflammatoriske cytokiner som for eksempel TNF α spiller en viktig rolle ved flere aspekter av aterosklerose [13]. For å utsette PMA-stimulerte THP-1 celler for et inflammatorisk stimuli, ble cellene inkubert med TNF α . Legumain- og cathepsin B-aktiviteten ble i liten grad påvirket ved inkubering av PMA-stimulerte THP-1 celler med ulike konsentrasjoner TNF α (figur 3-6).



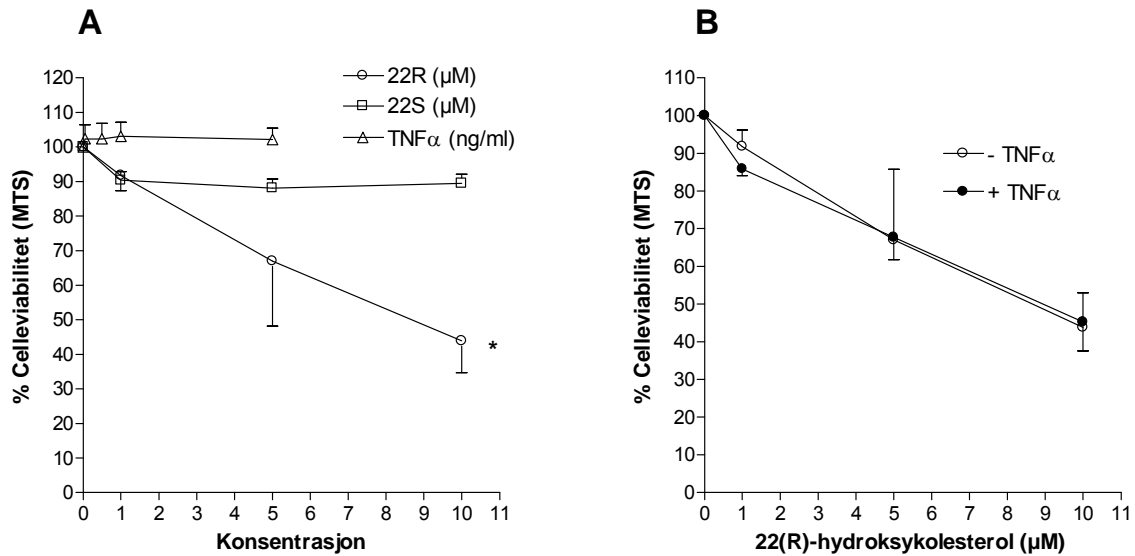
Figur 3-6: Effekt av TNF α på legumain- og cathepsin B-aktivitet i PMA-stimulerte THP-1 celler. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 5×10^5 celler/ml, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med TNF α (0, 0,05, 0,5, 1 og 5 ng/ml). Aktiviteten av legumain og cathepsin B ble målt i cellelysater ved bruk av henholdsvis substratene Z-Ala-Ala-Asn-NHMec eller Z-Arg-Arg-AMC. Data viser gjennomsnittet av legumain- eller cathepsin B-aktivitet (fluorescens/sekund) korrigert for $\mu\text{g totalprotein} \pm \text{SEM}$ (n=2-7 à 2 paralleller).

Det ble videre undersøkt om tilstedeværelsen av TNF α påvirket den observerte effekten av 22R. Det ble vist at både legumain- og cathepsin B-aktiviteten ble redusert i PMA-stimulerte THP-1 celler tilsatt ulike konsentrasjoner av 22R både med og uten 5 ng/ml TNF α (figur 3-7). Det ble ikke observert signifikante forskjeller av proteolytisk aktivitet ved tilsetning av 22R i kombinasjon med TNF α , sammenlignet med fravær av TNF α . Tilsvarende ble det ikke observert noen signifikante forskjeller på legumain- og cathepsin B-aktiviteten ved behandling med 22S i kombinasjon med TNF α , sammenlignet med 22S alene (data ikke vist, n=3-6).

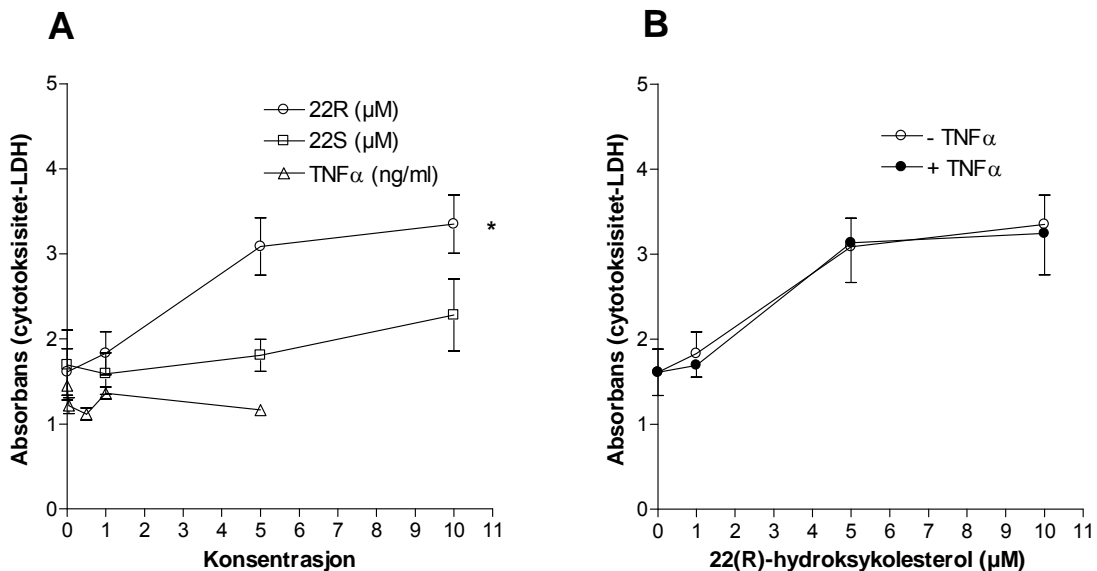


Figur 3-7: Effekt av 22(R)-hydroxykolesterol (22R) alene eller i kombinasjon med TNF α på legumain- (A) og cathepsin B-aktivitet (B) i PMA-stimulerte THP-1 celler. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 5×10^5 celler/ml, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med 22R (0, 1, 5 og 10 μ M) med eller uten 5 ng/ml TNF α . Aktiviteten av legumain og cathepsin B ble målt i cellelysater ved bruk av henholdsvis substratene Z-Ala-Ala-Asn-NHMec eller Z-Arg-Arg-AMC. Data viser gjennomsnittet av legumain- eller cathepsin B-aktivitet (fluorescens/sekund) korrigert for μ g totalprotein \pm SEM (n= 3-8 à 2 paralleller).

Oksysteroler virker å være ansvarlige for den cytotoxiske effekten av oxLDL ved aterosklerose [20, 28]. I og med at økende konsentrasjoner av 22R viste redusert proteolytisk aktivitet, ble det målt celleviabilitet (MTS) og cytotoxisitet (LDH-lekkasje i cellemedium) for å bestemme om effekten skyldtes celledød. Det var en signifikant ($p=0,0011$, lineær regresjonsanalyse) redusert viabilitet av PMA-stimulerte THP-1 celler med økende konsentrasjon 22R (figur 3-8 A). Celleviabiliteten ble derimot lite endret med økt konsentrasjon av 22S, TNF α (figur 3-8 A) eller ved kombinasjon av 22S og TNF α (data ikke vist, $n=3$). Det var ingen forskjell i viabilitet av PMA-stimulerte THP-1 celler tilsatt 22R sammen med TNF α sammenlignet med tilsvarende celler behandlet med 22R alene (figur 3-8 B). Behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med økende konsentrasjoner av 22R førte også til signifikant økt lekkasje av LDH til mediet ($p=0,0011$, lineær regresjonsanalyse) (figur 3-9 A). Behandling med ulike konsentrasjoner av 22S, TNF α (figur 3-9 A) eller 22S i kombinasjon med TNF α (data ikke vist, $n=3$) påvirket ikke signifikant cellenes utskillelse av LDH. Det ble ikke vist forskjell i LDH-lekkasje ved behandling av cellene med 22R i kombinasjon med TNF α , sammenlignet med 22R alene (figur 3-9 B).



Figur 3-8: Effekt av 22(R)-hydroksykolesterol (22R), 22(S)-hydroksykolesterol (22S), TNFα alene (A) og 22R med eller uten TNFα (B) på celleviabilitet av PMA-stimulerte THP-1 celler. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml , 1×10^5 celler/ml, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med 22R (0, 1, 5 og 10 μM) med eller uten 5 ng/ml TNFα, 22S (0, 1, 5 og 10 μM) eller TNFα (0, 0,05, 0,5, 1 og 5 ng/ml). Deretter ble MTS-reagens tilsatt og cellene ble inkubert i ytterligere en time. Data viser gjennomsnittet av celleviabiliteten målt som absorbans og normalisert i forhold til kontroll (100 %) \pm SEM ($n = 3$ à 3 paralleller). * $p < 0,05$ (lineær regresjonsanalyse).

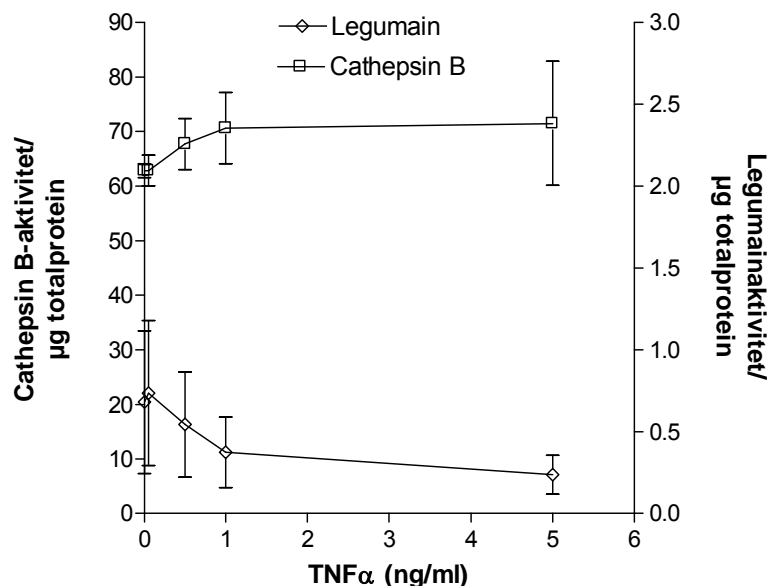


Figur 3-9: Effekt av 22(R)-hydroksykolesterol (22R), 22(S)-hydroksykolesterol (22S), TNFα alene (A) og 22R med eller uten TNFα (B) på LDH-lekkasje i PMA-stimulerte THP-1 celler. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml , 5×10^5 celler/ml, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med 22R (0, 1, 5 og 10 μM) med eller uten 5 ng/ml TNFα, 22S (0, 1, 5 og 10 μM) eller TNFα (0, 0,05, 0,5, 1 og 5 ng/ml). Mengde utskilt LDH ble analysert i medium som mål på cytotoksisitet og uttrykt som absorbans \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0,05$ (lineær regresjonsanalyse).

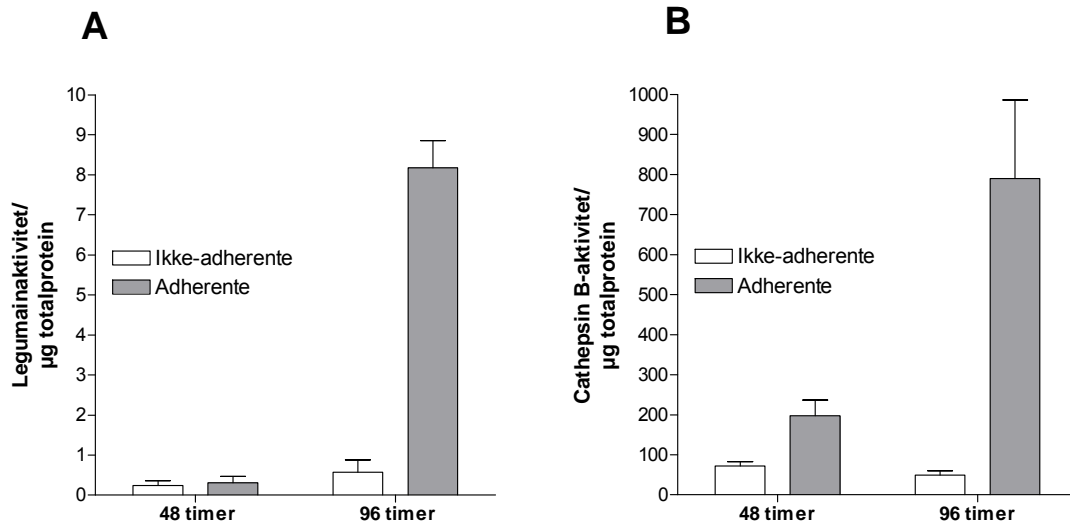
3.4 Effekt av TNF α på legumain- og cathepsin B-aktivitet i THP-1 celler (monocyttter)

Ved patogenesen av aterosklerose er det påvist at inflammatoriske cytokiner kan være involvert i differensiering fra monocytter til makrofager [19]. Native THP-1 celler ble stimulert med eksogent TNF α for å undersøke eventuell differensiering til makrofager og effekt på proteolytisk aktivitet. Ved enzymaktivitetsmåling i lysat fra TNF α -stimulerte ikke-adherente THP-1 celler ble aktiviteten lite endret (figur 3-10). TNF α (5 ng/ml) påvirket ikke cellenes viabilitet (MTS) eller cytotoxicitet (LDH-lekkasje i cellemedium) (data ikke vist, n= 2-3).

Ved stimulering av THP-1 celler med 5 ng/ml TNF α ble deler av cellepopulasjonen adherente. Enzymaktivitetsmåling i lysat fra THP-1 celler stimulert med 5 ng/ml TNF α viste at både legumain- og cathepsin B-aktiviteten økte i lysat fra adherente celler sammenlignet med ikke-adherente celler (figur 3-11). Denne forskjellen var kraftig ved kontinuerlig stimulering av THP-1 celler med 5 ng/ml TNF α i 96 timer.



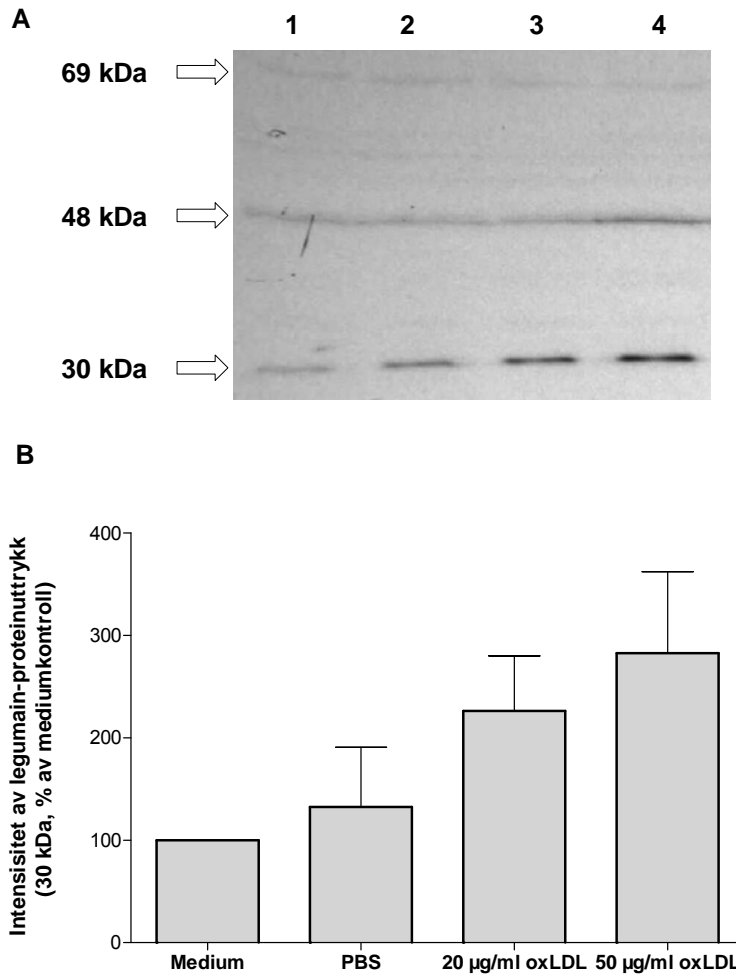
Figur 3-10: Effekt av TNF α på legumain- og cathepsin B-aktivitet i THP-1 celler (monocyttter). Native THP-1 celler (5×10^5 celler/ml) ble inkubert i 48 timer med TNF α (0, 0,05, 0,5, 1 og 5 ng/ml). Aktiviteten av legumain og cathepsin B ble målt i cellelysate av ikke-adherente celler ved bruk av henholdsvis substratene Z-Ala-Ala-Asn-NHMeC eller Z-Arg-Arg-AMC. Data viser gjennomsnittet av legumain- eller cathepsin B-aktivitet (fluorescens/sekund) korrigert for µg totalprotein \pm SEM (n= 3 à 2 paralleller).



Figur 3-11: Tidsrespons av TNF α på legumain- (A) og cathepsin B-aktivitet (B) i THP-1 celler (monocyttar). Native THP-1 celler (5×10^5 celler/ml) ble inkubert i 48 eller 96 timer med TNF α (5 ng/ml). Aktiviteten av legumain og cathepsin B ble målt i cellelysater av både ikke-adherente og adherente celler ved bruk av henholdsvis substratene Z-Ala-Ala-Asn-NHMeC eller Z-Arg-Arg-AMC. Data viser gjennomsnittet av legumain- og cathepsin B-aktivitet (fluorescens/sekund) korrigert for μg totalprotein \pm SEM ($n=3$ à 2 paralleller).

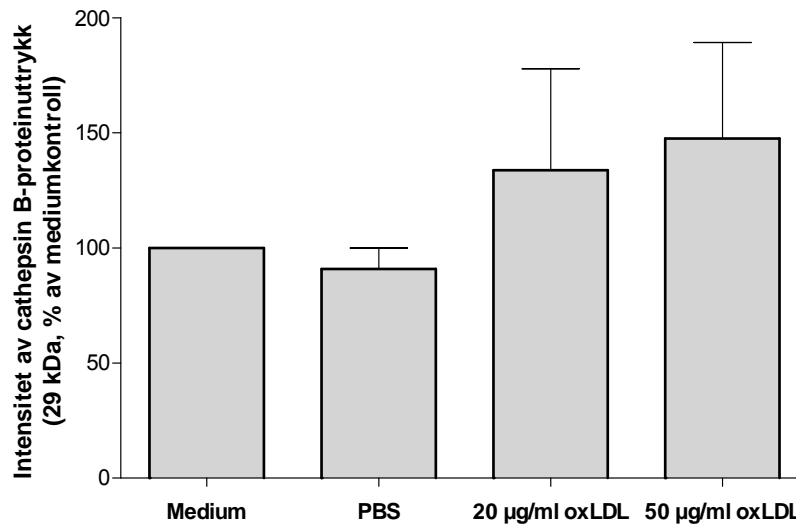
3.5 Effekt av oxLDL på proteinuttrykket av legumain og cathepsin B i PMA-stimulerte THP-1 celler

Etter enzymaktivitetsmålinger var det ønskelig å undersøke om oxLDL også regulerte proteinuttrykket av legumain i PMA-stimulerte THP-1 celler. Western blotting viste legumainbånd ved 30, 48 og 69 kDa (figur 3-12 A). Det ble også observert svake bånd ved 57 kDa. Det ble vist at det sterkeste legumainbåndet på 30 kDa ble oppregulert med 20 og 50 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL (figur 3-12 A og B).



Figur 3-12: Western blott av legumain (A) og legumain-proteinuttrykk på 30 kDa (B) i PMA-stimulerte THP-1 celler tilsatt oxLDL. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 5×10^5 celler/ml, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med oxLDL (20 og 50 µg/ml), PBS-kontroll (PBS) eller THP-1 dyrkningsmedium alene (medium). Cellelysate ble oppkonsentrert (TCA-felling) og 15 µg totalprotein ble applisert i hver brønn. A: Western blott av legumain. 1) medium (kontroll), 2) PBS (kontroll), 3) 20 µg/ml oxLDL og 4) 50 µg/ml oxLDL. B: Kvantifisering av legumain-proteinuttrykk (Western blott) på 30 kDa. Båndintensiteten ble kvantifisert ved bruk av programvaren GeneTools og normalisert i forhold til mediumkontroll (100 %) ± SEM (n= 2-3).

I likhet med legumain ble også cathepsin B-proteinuttrykket oppregulert ved behandling av cellene med oxLDL (figur 3-13). Dette ble observert ved 29 kDa som var det kraftigste båndet.

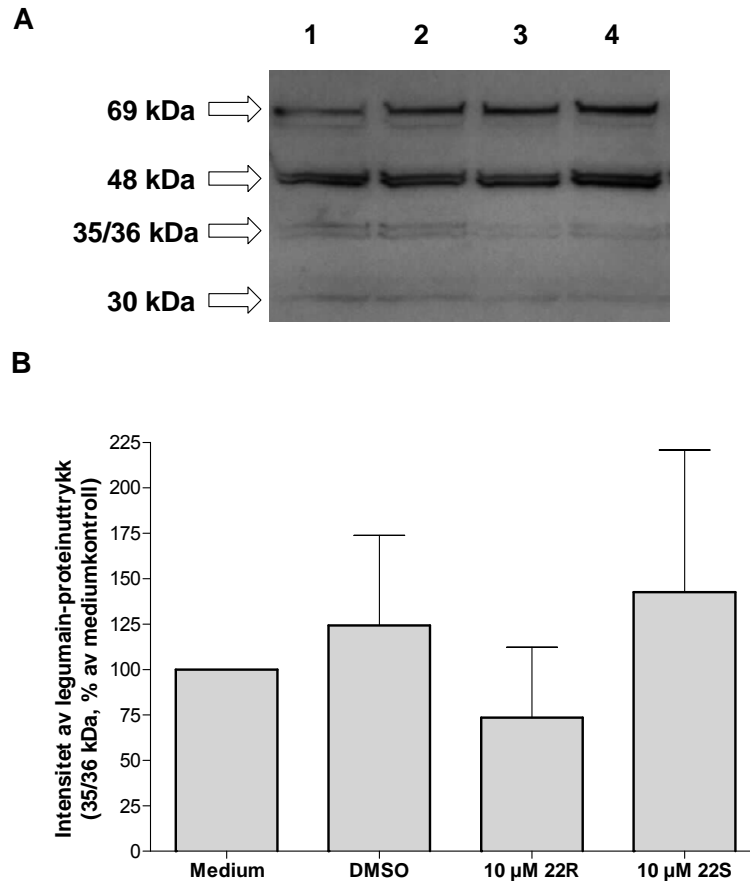


Figur 3-13: Kvantifisering av cathepsin B (Western blott) i PMA-stimulerte THP-1 celler tilsatt oxLDL. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml , 5×10^5 celler/ml, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med oxLDL (20 og 50 µg/ml), PBS-kontroll (PBS) eller THP-1 dyrkningsmedium alene (medium). Cellelysat ble oppkonsentrert (TCA-felling) og 15 µg totalprotein ble applisert i hver brønn. Båndintensiteten på 29 kDa ble kvantifisert ved bruk av programvaren GeneTools og normalisert i forhold til mediumkontroll (100 %) \pm SEM ($n = 2-3$).

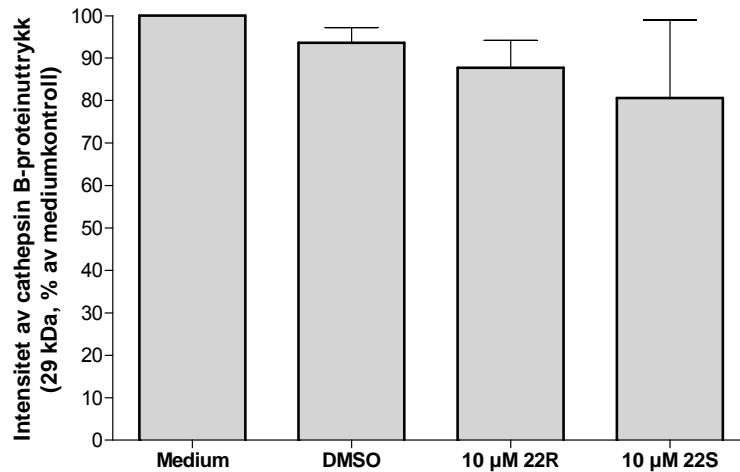
Sammenligning av cathepsin B på 29 kDa i native THP-1 celler med PMA-stimulerte THP-1 celler viste kraftigere proteinuttrykk i PMA-stimulerte celler (data ikke vist, $n = 2$). Det var derimot ikke store forskjeller i legumain-proteinuttrykket på 35/36 kDa mellom native- og PMA-stimulerte THP-1 celler (data ikke vist, $n = 2$).

3.6 Effekt av 22R på proteinuttrykket av legumain og cathepsin B i PMA-stimulerte THP-1 celler

Proteinuttrykket av legumain ved behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med 22R var lavere enn ved behandling av cellene med 22S eller kontroller. Det var i dette tilfellet tatt utgangspunkt i bånd med molekylvekt 35/36 kDa (figur 3-14 A og B). Cathepsin B-proteinuttrykk på 29 kDa i tilsvarende prøver viste ingen tydelige forskjeller mellom behandling med 22R og 22S (figur 3-15). Videre ble det observert et sterkere cathepsin B-bånd på 25 kDa ved behandling av cellene med 22S sammenlignet med 22R og kontroller (data ikke vist).



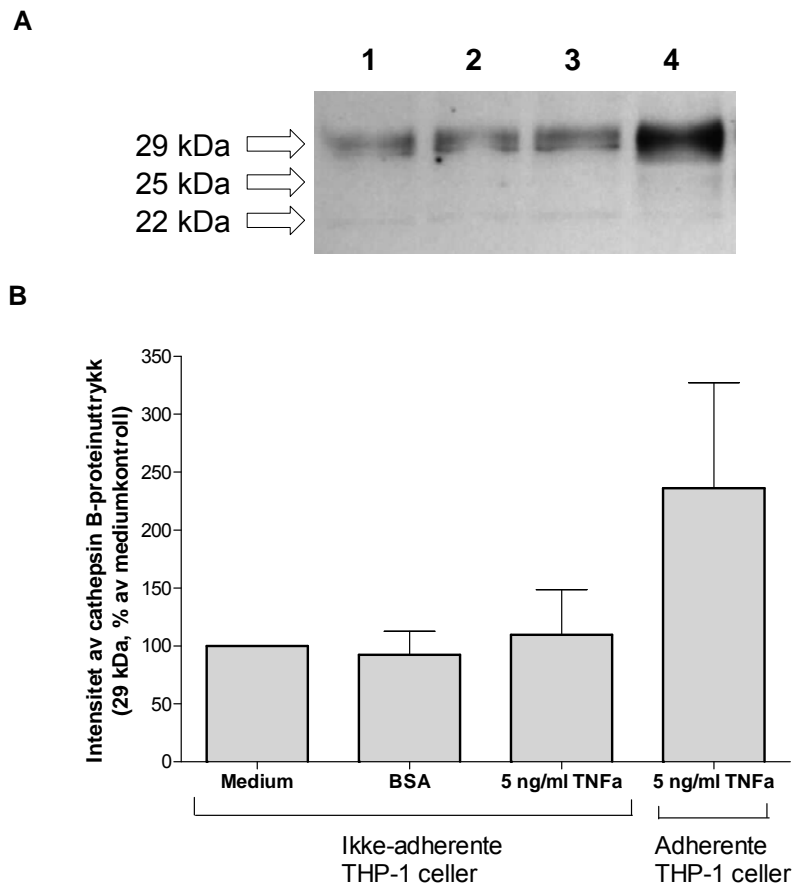
Figur 3-14: Western blott av legumain (A) og legumain- proteinuttrykk på 35/36 kDa (B) i PMA-stimulerte THP-1 celler tilsatt 22R og 22S. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml , $5 \times 10^5 \text{ celler/ml}$, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med 22R ($10 \text{ }\mu\text{M}$), 22S ($10 \text{ }\mu\text{M}$), DMSO-kontroll (DMSO) eller THP-1 dyrkningsmedium alene (medium). Cellelysat ble oppkonsentrert (TCA-felling) og $15 \text{ }\mu\text{g}$ totalprotein ble applisert i hver brønn. A: Western blott av legumain. 1) medium (kontroll), 2) DMSO (kontroll), 3) $10 \text{ }\mu\text{M}$ 22R og 4) $10 \text{ }\mu\text{M}$ 22S. B: Kvantifisering av legumain-proteinuttrykk (Western blott) ved 35/36 kDa. Båndintensiteten ble kvantifisert ved bruk av programvaren GeneTools og normalisert i forhold til mediumkontroll ($100 \text{ }\%$) $\pm \text{SEM}$ ($n = 2$).



Figur 3-15: Kvantifisering av cathepsin B (Western blott) i PMA-stimulerte THP-1 celler tilsatt 22R og 22S. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml , 5×10^5 celler/ml, 24 timer) ble inkubert i 48 timer med 22R ($10 \text{ }\mu\text{M}$), 22S ($10 \text{ }\mu\text{M}$) DMSO-kontroll (DMSO) eller THP-1 dyrkningsmedium alene (medium). Cellelysat ble oppkonsentrert (TCA-felling) og $15 \text{ }\mu\text{g}$ totalprotein ble applisert i hver brønn. Båndintensiteten på 29 kDa ble kvantifisert ved bruk av programvaren GeneTools og normalisert i forhold til mediumkontroll ($100 \text{ }\%$) \pm SEM ($n=2$).

3.7 Effekt av $\text{TNF}\alpha$ på proteinuttrykket av legumain og cathepsin B i native THP-1 celler

Siden legumain- og cathepsin B-aktiviteten i adherente $\text{TNF}\alpha$ -stimulerte THP-1 celler økte kraftig (96 timer) i forhold til enzymaktiviteten i ikke-adherente celler, var det ønskelig å studere effekten av $\text{TNF}\alpha$ på proteinuttrykket av enzymene i cellene. Etter stimulering i 48 timer med $\text{TNF}\alpha$ ble det observert ca. 2,5 ganger økning av proteinuttrykket av cathepsin B på 29 kDa i adherente celler sammenlignet med ikke-adherente celler (figur 3-16 A og B). Legumain-proteinuttrykket ble ikke oppregulert på tilsvarende måte som cathepsin B (data ikke vist).

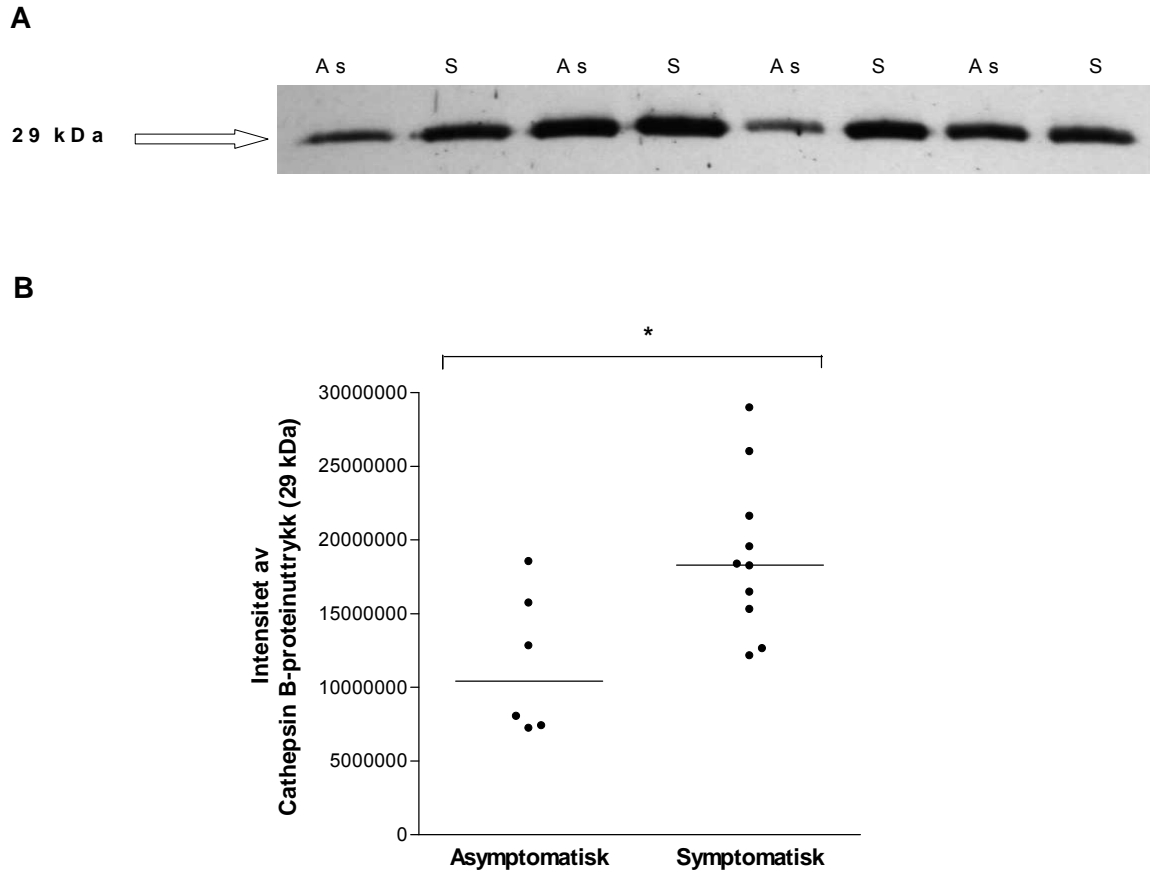


Figur 3-16: Western blott av cathepsin B (A) og cathepsin B-proteinuttrykk ved 29 kDa (B) i TNF α -stimulerte THP-1 celler. Native THP-1 celler (5×10^5 celler/ml) ble inkubert i 48 timer med TNF α (5 ng/ml), BSA-kontroll (BSA) eller THP-1 dyrkningsmedium alene (medium). Lysat av både ikke-adherente og adherente celler ble oppkonsentrert (TCA-felling) og 15 μ g totalprotein ble applisert i hver brønn. A: Western blott av cathepsin B. 1) medium (kontroll), 2) PBS (kontroll), 3) 5 ng/ml TNF α (ikke-adherente) og 4) 5 ng/ml TNF α (adherente). B: Kvantifisering av cathepsin B-proteinuttrykk (Western blott) ved 29 kDa. Båndintensiteten ble kvantifisert ved bruk av programvaren GeneTools og normalisert i forhold til mediumkontroll av ikke-adherente THP-1 celler (100 %) \pm SEM (n= 2).

3.8 Proteinuttrykket av legumain og cathepsin B i symptomatiske og asymptotiske aterosklerotiske carotisplakk

Det ble brukt Western blotting for å undersøke om proteinuttrykket av legumain og cathepsin B ble regulert forskjellig i aterosklerotiske carotisplakk fra henholdsvis asymptotiske og symptomatiske pasienter. Det ble observert kraftig bånd med molekylvekt 29 kDa for cathepsin B (figur 3-17 A). Kvantifisering av dette båndet viste et

signifikant sterkere uttrykk ($p= 0,042$, Mann Whitney test) av cathepsin B i plakk fra symptotomiske pasienter sammenlignet med plakk fra asymptomatiske pasienter (figur 3-17 B). Det var ikke mulig å identifisere legumain i de samme prøvene.



Figur 3-17: Oppregulering av cathepsin B-proteinuttrykk i aterosklerotiske carotisplakk fra symptotomiske pasienter versus asymptomatiske pasienter. A: Eksempel på Western blott av cathepsin B på 29 kDa av asymptomatiske (As; 4) og symptotomiske (S; 4) plakkprøver. Prøvene ble oppkonsentrert (TCA-felling) og 15 μ g totalprotein ble applisert i hver brønn. **B:** Kvantifisering av cathepsin B-proteinuttrykk (Western blott) av 6 pasienter med asymptomatiske- og 10 pasienter med symptotomiske carotisplakk. Båndintensiteten ble kvantifisert ved bruk av programvaren GeneTools. Medianverdier er illustrert som horisontallinjer. * $p < 0,05$ (mellom gruppene, Mann Whitney test).

4. DISKUSJON

Aterosklerose er en inflammatorisk sykdom der immuncellers regulering av inflammatoriske mediatorer står sentralt i patogenesen. En kronisk inflammatorisk tilstand er karakteristisk for stabile plakk med intakt fibrøs kappe, mens ustabile plakk preges av en mer aktiv inflammasjon [5]. Et tidlig tegn på aterosklerose er dannelse av lipidrike makrofag-skumceller som er differensiert fra monocytter i blodsirkulasjonen etter migrasjon til intima [7, 14]. I det ekstracellulære området av aterosklerotiske plakk kan LDL modifiseres til oxLDL [17]. Dannelse av skumceller foregår hovedsakelig gjennom opptak av oxLDL via SR [6]. Videre nedbrytes oxLDL i lysosomene og nedbrytningsprodukter kan utskilles fra cellen. Ved aterosklerose svekkes denne utskillelsen av metabolisert LDL. Det oppstår ansamling av oxLDL og tilhørende nedbrytningsprodukter i lysosomene som så fører til lysosomal destabilisering og utslipp av lysosomalt innhold til cytosol [3, 9, 20]. Alternativt kan LDL-oksidering skje intracellulært, mest sannsynlig i lysosomer [26].

Makrofag-skumceller i aterosklerotiske plakk kan produsere proteaser som er i stand til å bryte ned ekstracellulær matriks og er assosiert med plakkruptur, men detaljert mekanisme for plakkruptur gjenstår å undersøkes nærmere [9, 10, 12, 16, 39]. MMP og serinproteaser er mest kjent for deltakelse i nedbrytning av ECM. Andre proteaser som kan være involvert i prosessen er de lysosomale cathepsinene B, D, K, L og S [9, 10, 39]. Det er vist at cathepsiner også er involvert i lipidmetabolisme via lysosomal nedbrytning av LDL [9]. De lysosomale cysteinproteasene legumain og cathepsin B uttrykkes i høy grad av makrofager [8, 51]. Legumain, en nylig oppdaget asparaginylendopeptidase, har en viktig rolle ved prosessering og aktivering av andre proteaser inkludert proteaser som er involvert i nedbrytning av ekstracellulær matriks og plakkbrist som for eksempel MMP-2 [51, 56]. I tillegg fører legumain til direkte nedbrytning av fibronectin, som er en viktig bestanddel av ekstracellulær matriks [63]. Det virker derfor sannsynlig at flere proteaser (inkludert legumain) fungerer sammen ved initiering og progresjon av aterosklerotiske plakk.

For å nærmere beskrive legumain og cathepsin B i ateroskleroseprosessen ble aktivitet og proteinuttrykk av enzymene studert i en human monocyttisk cellelinje (THP-1) etter inkubering med oxLDL, LXR-ligander eller det proinflammatoriske cytokinet TNF α , samt i patologisk plakkmateriale fra pasienter.

4.1 Valg av cellemodell

Det er flere likheter mellom THP-1 celler og humane primære monocytter, blant annet cellenes morfologi, uttrykket av antigener og av gener involvert i lipidmetabolisme. Ved stimulering av cellene med PMA, differensierer THP-1 cellene til adherente makrofaglignende celler, og celleproliferasjon opphører. Ved differensiering av monocytter til makrofager endres noen genuttrykk involvert i lipidmetabolisme, som for eksempel oppregulering av "scavengerreseptorer", og dette er også observert i PMA-stimulerte THP-1 celler. Det er også vist at THP-1 celler kan differensiere til skumceller ved opptak av lipider [73]. Dette gjør disse cellene til en god modell for studier av skumcelledannelse fra makrofager. Tidligere eksperimenter har vist at 20 µg/ml oxLDL øker lipidakkumuleringen med 20-30 % etter PMA-stimulering av THP-1 celler [74]. Det antas at PMA-stimulerte THP-1 celler etter inkubering med oxLDL kan relateres til et tidlig stadium i ateroskleroseutviklingen ved differensiering av makrofag-skumceller.

Det er tidligere vist at legumain oppreguleres kraftig ved differensiering av THP-1 celler til adherente makrofager via PMA-stimulering [75]. Høyt uttrykt av legumain i makrofager gjør at cellemodellen også er godt egnet til studier av faktorer som eventuelt kan regulere legumain.

4.2 Variasjon av oxLDL

Variasjon i sammensetningen av oxLDL som et resultat av ulike LDL-donorere kan medvirke til heterogenitet av oksideringsproduktet [76]. Nativt LDL fra ulike donorer kan variere med tanke på antioksidantinnhold, størrelse og form, men i denne oppgaven er det blitt brukt LDL fra samme donor. Videre består LDL av forskjellig sammensetning av lipider som ved oksidering kan gi dannelse av oxLDL med et spekter av molekyler med ulik grad av oksidering. I de fleste eksperimentelle studier med oxLDL er det blitt brukt kobber for oksidering av LDL og dette er en behandling som kan gi opphav til en stor variasjon av LDL-modifikasjoner [16]. OxLDL som ble brukt i eksperimentene i oppgaven ble analysert for grad av oksidasjon ved Institutt for indremedisinsk forskning, Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF (se appendiks, prosedyrer).

4.3 Effekt av oxLDL på legumain- og cathepsin B-aktivitet

Det ble vist at økende konsentrasjoner av oxLDL førte til reduksjon av både legumain- og cathepsin B-aktivitet i lysat av PMA-stimulerte THP-1 celler analysert uten reduksjonsmiddelet DTT. Dette ble undersøkt for å finne ut av om oxLDL reduserte enzymaktiviteten via cellulær påvirkning eller via direkte hemming av enzymene. En slik effekt er potensielt viktig i patogenesen av aterosklerose i forhold til internalisering av oxLDL i makrofager som kan føre til svekket evne av lysosomale enzymer til nedbrytning av lipidansamlinger. I lysat av PMA-stimulerte THP-1 celler ble det observert høyere legumain- og cathepsin B-aktivitet ved analyse utført med reduksjonsmiddelet DTT sammenlignet med i fravær av DTT. Ved analyse med tilstrekkelig mengde DTT ble ikke enzymaktiviteten påvirket i særlig grad ved inkubering med oxLDL. Både legumain og cathepsin B er avhengig av et reduserende miljø for aktivitet [33]. OxLDL tilsatt direkte i cellelysat kan derimot føre til et oksiderende miljø som gjør at enzymenes aktivitet reduseres. Dette kan bety at jo mer oxLDL som tilsettes desto mer interagerer direkte med enzymene og fører til hemmet enzymaktivitet.

Ved behandling av native THP-1 celler med oxLDL ble det ikke observert påvirkning av legumain- eller cathepsin B-aktivitet, mens PMA-stimulerte THP-1 celler viste en signifikant reduksjon av enzymaktivitetene ved inkubering med oxLDL. Etter differensiering fra monocytter til makrofager endres cellenes egenskaper som blant annet lipidmetabolisme [73]. Det kan forklare at det ble observert ulik effekt av oxLDL på de lysosomale proteasene i henholdsvis native og PMA-stimulerte THP-1 celler. Whatling *et al.* [16] rapporterte at stimulering av THP-1 celler med PMA (50 ng/ml, 24 timer) førte til oppregulering av mRNA for cathepsin B, andre cathepsiner og MMP. Økt uttrykk av cathepsiner kan forklares med økt antall lysosomer ved differensiering fra monocytter til makrofager. Uttrykket av cathepsin D, MMP-9 og MMP-14 ble også undersøkt i humane primære monocytter og makrofager, som viste den samme oppreguleringen ved differensiering. Dette stemmer overens med funn gjort i vår forskningsgruppe som viste økning av legumainuttrykk og -aktivitet i PMA-stimulerte celler sammenlignet med native THP-1 celler [75].

Som beskrevet tidligere ble det vist en signifikant reduksjon av legumain- og cathepsin B-aktivitet ved behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med oxLDL. Dette kan bety at internalisert oxLDL kan modulere aktiviteten av legumain og cathepsin B i THP-1 celler.

Det er tidligere blitt vist at oxLDL blir tatt opp i differensierte THP-1 celler via ”scavengerreseptorene” CD36, SR-BI og CD68 som spiller en viktig rolle ved dannelse av makrofag-skumceller [17]. Videre antas det at oxLDL blir metabolisert i lysosomene [3]. Whatling *et al.* [16] observerte ingen endring av cathepsin B mRNA ved tilsetning av oxLDL i PMA-stimulerte THP-1 celler. OxLDL brukt i denne sammenhengen ble dannet fra UV-stråling av nativt LDL. Ulik effekt av oxLDL kan avhenge av metoden for oksidasjon av LDL, som kan gjenspeile grad av oksidasjon. Resultatene vist i denne oppgaven er derimot i overensstemmelse med andre studier i cellulære og cellefrie modeller som har vist at oxLDL inaktiverer lysosomale proteaser, selv om mekanismene ikke er helt klarlagt [77].

Opptak av oxLDL i J-774 celler (murin makrofag cellelinje) førte til inaktivering av lysosomale enzymer og destabilisering av lysosomene slik at enzymene ble relokalisert til cytosol [78]. Hoppe *et al.* [77] viste at preinkubering av peritoneale makrofager fra mus med oxLDL kan føre til redusert nedbrytning av lipoproteiner som kan skyldes en direkte inaktivering av cathepsin B. Dette var ikke tilfellet ved preinkubering av cellene med nativt LDL eller medium alene, og reduksjon av enzymaktiviteten korrelerte med oksidasjonsgraden av LDL. Inkubering av lysat av ubehandlede peritoneale makrofager fra mus med oxLDL førte også til reduksjon av lysosomal cysteinproteaseaktivitet [79]. Videre ble det vist at ved behandling av peritoneale makrofagceller fra mus med oxLDL så førte fosfolipidene i oxLDL til reduksjon av cellulær cathepsin B-aktivitet. Det ble foreslått at oxLDL inaktiverte cathepsin B direkte. En mulig forklaring var at proteolytisk aktivitet av lysosomale enzymer ble redusert med økt kryssbinding med apo B i oxLDL induert av reaktivt aldehyd (4-hydroxynonenal, HNE) [77]. O’Neil *et al.* [80] viste videre at aldehydgrupper på oxLDL, som dannes ved oksidasjonsreaksjoner *in vivo*, blir reaktive ved sur pH og bindes dermed til cystein og histidin på enzymets aktive sete [79, 81].

Lysat av PMA-stimulerte THP-1 celler uten preinkubering med oxLDL består av frie enzymer i en sur buffer. Redusert aktivitet av lysosomale enzymer i et slikt kunstig system som følge av inkubering med oxLDL, viser at direkte kontakt mellom oxLDL og legumain eller cathepsin B hemmer enzymaktiviteten. Det er uklart om dette reflekterer hva som kan skje i levende celler. Resultatene tyder på at legumain- og cathepsin B-aktiviteten kan hemmes direkte av oxLDL, men mekanismen gjenstår å oppklares.

4.4 Effekt av oxLDL på proteinuttrykket av legumain og cathepsin B

Western blotting viste økning av legumain (30 kDa) og cathepsin B (29 kDa) ved behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med økende konsentrasjoner av oxLDL. Som beskrevet tidligere ble det derimot observert en reduksjon av legumain- og cathepsin B-aktiviteten ved behandling med økende konsentrasjoner av oxLDL. Uttrykket av cathepsin B (29 kDa) kan ikke sammenlignes med enzymaktivitetsmålinger på grunn av usikkerheten rundt molekylvekten av den aktive formen. Legumain på 36 kDa er den antatte aktive og modne formen av legumain *in vivo* [49]. Legumainbånd på 35/36 kDa ble observert ved Western blott av PMA-stimulerte THP-1 celler i et annet eksperiment med de samme cellene. Det antas derfor at legumainformen på 30 kDa kan være et nedbrytningsprodukt og ikke en aktiv form av enzymet.

Cellelysate fra ulike celler er nylig blitt analysert ved hjelp av gelfiltrasjon i vårt laboratorium for karakterisering av molekylvekten av aktive legumain- og cathepsin B- former, og viste at molekylvekten av de aktive enzymene varierte mellom ulike cellelinjer. Legumainformen i THP-1 celler med høyest aktivitet hadde molekylvekt på ca. 25 kDa, og cathepsin B-formen med høyest aktivitet hadde molekylvekt på 29 kDa (Ali, Z. A., ikke-publiserte data). På grunn av forskjell i metoder er ikke molekylvekt karakterisert med gelfiltrasjon direkte sammenlignbart med molekylvekt bestemt ved Western blotting.

Det kan oppstå ulik grad av glykosylering av legumain som tilsier at molekylvekten kan variere i ulike celletyper. Renset legumain fra menneske og gris har fire potensielle glykosyleringssteder (Asn⁹¹, Asn¹⁶⁷, Asn²⁶³ og Asn²⁷²). Deglykosylering *in vitro* av legumain fra grisenyre (34 kDa) resulterte i reduksjon av molekylvekten til 31 kDa ved Western blotting [37]. Dette indikerer at den aktuelle glykosyleringsgraden av legumainformen som undersøkes er relevant ved bestemmelse av molekylvekt.

4.5 Effekt av oxLDL på celledød av PMA-stimulerte THP-1 celler

Det ble vist at legumain- og cathepsin B-aktiviteten ble redusert i THP-1 celler preinkubert med oxLDL, som gjorde det ønskelig å avklare om effekten av oxLDL kunne være knyttet

til celledød. Viabilitetsmåling av cellene med ulike konsentrasjoner oxLDL viste ingen signifikante forskjeller mellom effekt av oxLDL og løsningsmiddelet PBS. Ved inkubering med mer enn 50 µg/ml oxLDL ble riktignok celleviabiliteten redusert, men PBS alene viste den samme tendensen. Dette kan tyde på at celleviabiliteten ble redusert som et resultat av fortykning av cellemediet med økende konsentrasjon oxLDL og tilhørende mengde PBS. Det var ingen tegn til LDH-lekkasje i mediet fra PMA-stimulerte THP-1 celler behandlet med ulike konsentrasjoner oxLDL. Dette tyder på at legumain- og cathepsin B-aktiviteten mest sannsynlig ikke reduseres som et resultat av celledød.

4.6 Effekt av LXR-ligandene 22R, 22S og T0901317 på legumain, cathepsin B og celledød

Som beskrevet tidligere ble det observert en reduksjon av legumain- og cathepsin B-aktiviteten ved behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med økende konsentrasjoner oxLDL. OxLDL består av oksiderte lipoproteiner, oksiderte fettsyrer og oksysteroler [18]. Vi ønsket å undersøke om behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med de endogene oksysterolene 22R og 22S kan medvirke til en tilsvarende effekt på enzymaktiviteten som ved behandling med oxLDL. OxLDL blir som beskrevet tidligere internalisert i THP-1 celler og kan føre til skumcelledannelse. 22R (1,2- 12 µM) er vist å indukere differensiering av THP-1 celler ved inkubering over lengre tid (7 dager) [82]. Andre eksempler på oksysteroler er 7β-hydroksykolesterol, 7-ketokolesterol, 25-hydroksykolesterol og 27-hydroksykolesterol, som hver for seg utgjør en større del av oxLDL sammenlignet med 22-hydroksykolesterol [28]. Disse oksysterolene ble ikke studert i denne oppgaven.

22R er en agonist av kjernereseptoren LXR, mens S-isomerer (22S) er antatt å fungere som en antagonist [23, 71]. Ved behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med 22R ble det vist en reduksjon av legumain- og cathepsin B-aktiviteten tilsvarende som ved behandling med oxLDL. Viabilitetsmålinger av PMA-stimulerte THP-1 celler behandlet med økende konsentrasjon av 22R viste derimot en signifikant redusert celleviabilitet. Det ble også observert økende grad av LDH-lekkasje fra PMA-stimulerte THP-1 celler behandlet med økende konsentrasjoner av 22R. Det er kjent at oxLDL fører til cytotoxisk effekt i aterosklerotiske plakk [27], og oksysterolene i oxLDL virker å være ansvarlige for den denne effekten [20, 28]. Resultatene indikerer at celledøds mekanismer er involvert i større

grad ved inkubering av cellene med 22R enn ved inkubering med oxLDL. 22S viste ingen påvirkning av legumain- eller cathepsin B-aktiviteten og påvirket verken celleviabilitet eller LDH-lekkasje. T0901317 er en syntetisk ikke-steroid LXR-ligand [72], og i motsetning til 22R og oxLDL påvirket ikke T0901317 legumain- eller cathepsin B-aktivitet.

I og med at 22S verken påvirket enzymaktiviteten eller celledød, er det nærliggende å anta at effekten av 22R er knyttet til LXR-aktivering. Det er derimot vist at T0901317 er en kraftigere aktivator av LXR enn 22R og effekten av 22R på enzymaktiviteten kan dermed ikke forklares med LXR-aktivering. T0901317 er også lipidløselig og blir mest sannsynlig tatt opp av cellene på lik linje med 22R [83].

Western blotting viste lavere uttrykk av 35/36 kDa legumain i PMA-stimulerte celler behandlet med 22R, sammenlignet med 22S og kontroller. Det antas at denne legumainformen er den aktive. Det ble derimot ikke observert forskjell i cathepsin B (29 kDa) i celler behandlet med 22R, 22S eller kontroller.

4.7 Effekt av TNF α på legumain, cathepsin B og celledød

Inflammasjon spiller en viktig rolle ved alle stadier av aterosklerose [5]. I aterosklerotiske plakk produseres inflammatoriske mediatorer som IL-1, -6, -8, -10, -12 og TNF α hovedsakelig av makrofager som en respons på infiltrerte lipoproteiner [6]. TNF α er et proinflammatorisk cytokin og en viktig medspiller blant andre inflammatoriske cytokiner, kjemokiner og immunceller ved utvikling av aterosklerotiske plakk. Cytokinet bidrar til uttrykk av adhesjonsmolekyler på endotelceller, rekruttering og aktivering av inflammatoriske celler og initiering av inflammasjon i arterieveggen [19, 84].

Det er tidligere vist at TNF α medvirker til differensiering av monocytter til makrofager [19]. Dette ble bekreftet ved inkubering av THP-1 celler med TNF α (5 ng/ml, 96 timer) som førte til dannelse av adherente celler med høyere aktivitet av både legumain og cathepsin B, sammenlignet med ikke-adherente celler fra samme populasjon. Dette tyder på at TNF α -stimulering av native THP-1 celler fører til differensiering av cellene tilsvarende stimulering med PMA. I og med at TNF α er en endogen substans og tilstede i aterosklerotiske plakk preget av inflammasjon, blir det mer reelt å bruke TNF α i en slik cellemodell. Etter stimulering i 48 timer med TNF α ble det observert 2,5 gangers økning av cathepsin B (29

kDa) i adherente celler sammenlignet med ikke-adherente celler, men legumain ble ikke oppregulert tilsvarende. Til sammenligning har Mattock *et al.* [51] tidligere beskrevet at uttrykket av legumain mRNA økte ved TNF α -stimulering av THP-1 celler. TNF α oppregulerer også mRNA av andre cysteinproteaser som cathepsiner og MMP i vaskulære celler [85, 86].

TNF α (5 ng/ml) påvirket ikke celleviabilitet eller grad av LDH-lekkasje i verken native eller PMA-stimulerte THP-1 celler. Dette stemmer overens med funn gjort av Lee *et al.* [87, 88] som viste at høyere konsentrasjon av TNF α (40 ng/ml) ikke medførte apoptose i verken native eller PMA-stimulerte THP-1 celler.

4.8 Uttrykket av legumain og cathepsin B i aterosklerotiske plakk

Oppregulering av legumainuttrykk i ustabile carotisplakk sammenlignet med stabile carotisplakk er tidligere beskrevet. Papaspyridonos *et al.* [12] viste at legumain mRNA og proteinuttrykk var mer enn 3 ganger høyere i ustabile sammenlignet med stabile plakk. Det ble presentert Western blott av legumainformen på 36 kDa, som anses å være den modne og aktive formen *in vivo* [49]. Videre ble legumain mRNA detektert i skulderregionene av plaket og uttrykket var kolokalisert med tilstedeværelse av makrofager, som spiller en viktig rolle ved patogenesen av aterosklerose [12, 17]. Ustabile plakk har også over 3 ganger høyere nivåer av makrofagmarkøren CD68 sammenlignet med tilhørende stabile plakk [12]. Mattock *et al.* [51] viste 2 ganger høyere legumainaktivitet og -proteinuttrykk i ustabile sammenlignet med stabile områder av samme plakk [51].

Et microarrayeksperiment på symptomatiske sammenlignet med asymptotiske carotisplakk [66] viste ca. 1,5 ganger økning av legumain mRNA (Bente Halvorsen, personlig meddelelse). Det ble i dette tilfellet brukt en alternativ karakterisering av plakkene sammenlignet med ustabile og stabile plakk beskrevet ovenfor, og et symptomatisk plakk er nødvendigvis ikke ustabil.

I utviklede humane aterosklerotiske koronarplakk uttrykkes legumain hovedsakelig av makrofager i inflammasjonspregede områder [64]. Proteinuttrykket og aktiviteten av legumain i primære humane monocytter stimulert med M-CSF for makrofagdifferentiering

ble signifikant økt sammenlignet med ubehandlede monocytter. Migrasjonsmålinger viste også at legumain inducerer kjemotaksis av primære humane monocytter. Det blir dermed foreslått at makrofaguttrykt legumain kan bidra til aterogenese via proteaseavhengige og proteaseuavhengige mekanismer. Proteasefunksjonen kan føre til nedbrytning av ECM, mens kjemoattraktantfunksjonen kan bidra til monocyttruttering til aterosklerotiske plakk og makrofagretensjon i plakk.

Det ble i denne oppgaven analysert for legumainprotein i carotisplakk ved hjelp av Western blotting. Symptomatiske og asymptomatiske carotisplakk ble analysert for sammenligning, men det ble ikke observert proteinbånd ved bruk av et kommersielt legumainspesifikt antistoff. Ved analyse av legumain i differensierte THP-1 celler med samme antistoff ble det observert tydelige proteinbånd, som viser at antistoffet gjenkjenner legumain. Legumain produseres som beskrevet tidligere hovedsakelig av makrofager i aterosklerotiske plakk. De negative resultatene kan skyldes at plakkprøver består av plasmaproteiner og et mangfold av celler (f.eks. monocytter, endotelceller og glatte muskelceller) som alle fører til dannelse av ulike proteiner. Dette medfører at ved applisering av prøvene vil hver brønn bestå av mindre mengde legumainprotein enn tilsvarende totalproteinkonsentrasjon av differensierte THP-1 celler. Det ble også analysert for cathepsin B i de samme carotisplakkprøvene. Kvantifisering av cathepsin B (29 kDa) viste et signifikant høyere uttrykk i symptomatiske sammenlignet med asymptomatiske plakk. I motsetning til legumain ble det vist kraftige proteinbånd ved analyse med cathepsin B-spesifikt antistoff. Det er usikkert hva dette kan skyldes, men Western blott av legumain og cathepsin B baserer seg på deteksjon ved bruk av forskjellige antistoffer og båndintensiteten blir dermed ikke direkte sammenlignbare.

I likhet med legumain produseres cathepsin B hovedsakelig av makrofager i aterosklerotiske plakk [18]. Chen *et al.* [8] viste også at cathepsin B mRNA og protein ble oppregulert i aterosklerotiske plakk karakterisert med en høy inflammasjonsgrad, sammenlignet med asymptomatisk aorta. Cathepsin B ble også studert i ustabile sammenlignet med stabile plakk og tilsvarende ble det observert økt proteinuttrykk og mRNA i ustabile plakk.

Mange studier tilsier at både legumain og cathepsin B oppreguleres i aterosklerotiske plakk som følge av oppkonsentrering av antall makrofager. Videre er det beskrevet at legumain spesielt oppreguleres i skulderregionen av plakk. Dette styrker antagelser om disse cysteinproteasers rolle ved patogenesen av aterosklerose og indikerer at legumain og

cathepsin B kan være involvert i nedbrytning av ECM og påvirkning av andre proteaser i aterosklerotiske plakk.

5. KONKLUSJON

Denne oppgaven har vist:

- Signifikant oppregulering av cathepsin B (29 kDa) i symptomatiske sammenlignet med asymptotiske aterosklerotiske carotidplakk.
- Reduserte enzymaktiviteter av legumain og cathepsin B i PMA-stimulerte THP-1 celler behandlet med økende konsentrasjoner av oxLDL. Proteinuttrykkene av legumain (30 kDa) og cathepsin B (29 kDa) ble derimot oppregulert med henholdsvis 20 og 50 µg/ml oxLDL.
- Reduserte enzymaktiviteter av legumain og cathepsin B i PMA-stimulerte THP-1 celler behandlet med økende konsentrasjoner av oksysterolen 22(R)-hydroksykolesterol (22R). 22R førte dessuten også til celledød og nedregulering av proteinuttrykket av legumain (35/36 kDa).
- Økning av legumain- og cathepsin B-aktivitet og cathepsin B (29 kDa) etter TNF α -stimulering (5 ng/ml) av native THP-1 celler og differensiering til adherente celler.

6. VIDERE STUDIER

Ekspirimeter viste at TNF α -stimulert differensiering av native THP-1 celler til adherente celler førte til økt legumain- og cathepsin B-aktivitet, tilsvarende PMA-stimulerte THP-1 celler. I og med at TNF α er en endogen substans og tilstede i aterosklerotiske plakk preget av inflammasjon, vil det være interessant å undersøke om inkubering av adherente TNF α -stimulerte THP-1 celler med henholdsvis oxLDL eller oksysteroler vil regulere aktiviteten eller uttrykket av legumain og cathepsin B. Det vil også være interessant å studere om HDL kan påvirke legumain eller cathepsin B i THP-1 celler, i og med at det er kjent at høy konsentrasjon av HDL beskytter mot aterosklerose. I tillegg kan det være aktuelt å undersøke effektene på legumain og cathepsin B ved hjelp av andre inflammatoriske mediatorer, som for eksempel IL-1, -6, -8, -10 og -12. Det kan videre undersøkes om uttrykk eller aktivitet av legumain og cathepsin B kan moduleres av legemidler, som for eksempel statiner.

I forbindelse med oxLDL-opptak i cellene som kan føre til destabilisering av lysosomer, kan fluorescensmikroskopi basert på farging av intakte lysosomer ved hjelp av et lysosompermeabelt fargestoff ("lysotracker Red DND-99") bidra til bedre forståelse av effekt av oxLDL på lysosomene og lysosomale enzymer.

Det ville vært nyttig å analysere enzymaktiviteten av legumain- og cathepsin B i patologisk plakkmateriale for sammenligning med proteinuttrykk av enzymene i plakk og resultater av enzymaktivitetsmålinger fra celleforsøk i denne studien.

REFERANSER

1. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
2. Foreningen_for_utgivelse_av_norsk_legemiddelhandbok. *Norsk legemiddelhandbok for helsepersonell 2007*. [cited; Available from: <http://www.legemiddelhandboka.no>.
3. Jerome, W.G. and P.G. Yancey, *The role of microscopy in understanding atherosclerotic lysosomal lipid metabolism*. Circulation, 2003. **9**(1): p. 54-67.
4. Dahl, A., C. Lund, and D. Russell, *Aterosklerose og hjerteinfarkt*. Tidsskrift for den norske legeforening, 2007. **127**: p. 892-896.
5. Spagnoli, L.G., et al., *Role of inflammation in atherosclerosis*. J Nucl Med, 2007. **48**(11): p. 1800-15.
6. Takahashi, K., M. Takeya, and N. Sakashita, *Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals*. Med Electron Microsc, 2002. **35**(4): p. 179-203.
7. Tabas, I., *Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(11): p. 2255-64.
8. Chen, J.Q., et al., *In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(23): p. 2766-2771.
9. Lutgens, S.P., et al., *Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease*. Faseb J, 2007. **21**(12): p. 3029-41.
10. Liu, J.A., et al., *Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2004. **24**(8): p. 1359-1366.
11. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
12. Papaspyridonos, M., et al., *Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1837-44.
13. Girona, J., et al., *Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF-alpha secretion by THP-1 human macrophages*. Free Radic Biol Med, 1997. **23**(4): p. 658-67.
14. Fuhrman, B., et al., *Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation in vivo: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF-R)*. Atherosclerosis, 2008. **196**(2): p. 598-607.
15. Aukrust, P., et al., *Inflammation in coronary artery disease: potential role for immunomodulatory therapy*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2005. **3**(6): p. 1111-24.
16. Whatling, C., et al., *Effect of macrophage differentiation and exposure to mildly oxidized LDL on the proteolytic repertoire of THP-1 monocytes*. Journal of Lipid Research, 2004. **45**(9): p. 1768-1776.
17. Shashkin, P., B. Dragulev, and K. Ley, *Macrophage differentiation to foam cells*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(23): p. 3061-72.
18. Li, W., et al., *Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(7): p. 1124-30.
19. Persson, J., J. Nilsson, and M.W. Lindholm, *Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages*. Lipids Health Dis, 2006. **5**: p. 17.

20. Yuan, X.M., et al., *Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(2): p. 208-18.
21. Buono, C., et al., *Liver X receptors inhibit human monocyte-derived macrophage foam cell formation by inhibiting fluid-phase pinocytosis of LDL*. J Lipid Res, 2007. **48**(11): p. 2411-8.
22. Zelcer, N. and P. Tontonoz, *Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 607-14.
23. Janowski, B.A., et al., *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 728-31.
24. Sun, B., et al., *Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI*. J Lipid Res, 2007. **48**(12): p. 2560-70.
25. Alberts, B., et al., *Molecular biology of the cell*. 4. ed. 2002, New York: Garland Science.
26. Wen, Y. and D.S. Leake, *Low density lipoprotein undergoes oxidation within lysosomes in cells*. Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1337-43.
27. Li, W., et al., *Cytocidal effects of atheromatous plaque components: the death zone revisited*. Faseb J, 2006. **20**(13): p. 2281-90.
28. Larsson, D.A., et al., *Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(6): p. 902-10.
29. Li, W. and X.M. Yuan, *Increased expression and translocation of lysosomal cathepsins contribute to macrophage apoptosis in atherogenesis*, in *Signal Transduction Pathways, Chromatin Structure, and Gene Expression Mechanisms as Therapeutic Targets*. 2004. p. 427-433.
30. Dickinson, D.P., *Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. **13**(3): p. 238-75.
31. Turk, B., *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 785-99.
32. Sajid, M. and J.H. McKerrow, *Cysteine proteases of parasitic organisms*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **120**(1): p. 1-21.
33. Turk, V., B. Turk, and D. Turk, *Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities*. Embo J, 2001. **20**(17): p. 4629-33.
34. 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 Lett, 1998. **441**(3): p. 361-5.
35. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Families of cysteine peptidases*. Methods Enzymol, 1994. **244**: p. 461-86.
36. Barrett, A.J. and N.D. Rawlings, *Families and clans of cysteine peptidases*. Perspectives in Drug Discovery and Design, 1996. **6**: p. 1-11.
37. Chen, J.M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 8090-8.
38. Ishidoh, K. and E. Kominami, *Processing and activation of lysosomal proteinases*. Biological Chemistry, 2002. **383**(12): p. 1827-1831.
39. Garcia-Touchard, A., et al., *Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1119-27.
40. Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J. & Barrett, A.J. . *MEROPS: the peptidase database*. 2008 [cited; Available from: <http://merops.sanger.ac.uk/>].
41. Shutov, A.D. and I.A. Vaintraub, *Degradation of Storage Proteins in Germinating-Seeds*. Phytochemistry, 1987. **26**(6): p. 1557-1566.

42. Fischer, J., et al., *The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of Vicia seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis*. Plant Molecular Biology, 2000. **43**(1): p. 83-101.
43. Haranishimura, I., Y. Takeuchi, and M. Nishimura, *Molecular Characterization of a Vacuolar Processing Enzyme Related to a Putative Cysteine Proteinase of Schistosoma-Mansoni*. Plant Cell, 1993. **5**(11): p. 1651-1659.
44. Ishii, S., *Legumain - Asparaginyl Endopeptidase*, in *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases*. 1994. p. 604-615.
45. Halfon, S., et al., *Autocatalytic activation of human legumain at aspartic acid residues*. Febs Letters, 1998. **438**(1-2): p. 114-118.
46. Kembhavi, A.A., et al., *The 2 Cysteine Endopeptidases of Legume Seeds - Purification and Characterization by Use of Specific Fluorometric Assays*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993. **303**(2): p. 208-213.
47. International Union of Biochemistry and Molecular, B. and E.C. Webb, *Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. 1992, San Diego: Academic Press. xiii, 862 s.
48. Dalton, J.P., L. HolaJamriska, and P.J. Brindley, *Asparaginyl endopeptidase activity in adult Schistosoma mansoni*. Parasitology, 1995. **111**: p. 575-580.
49. Li, D.N., et al., *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38980-90.
50. Manoury, B., et al., *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 695-9.
51. Mattock, K.L., et al., *Expression and activity of the cysteine protease, legumain, is up-regulated in unstable REGIONS OF human atherosclerotic plaques*. Atherosclerosis, 2007. **193**(2): p. S4-S4.
52. Maunsbach, A.B., *Isolation of kidney lysosomes*. Methods Enzymol, 1974. **31**(Pt A): p. 330-9.
53. Haranishimura, I., et al., *Vacuolar Processing Enzyme Responsible for Maturation of Seed Proteins*. Journal of Plant Physiology, 1995. **145**(5-6): p. 632-640.
54. Barrett, A.J., N.D. Rawlings, and J.F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2. ed. Vol. 2. 2004: Elsevier Academic Press.
55. 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**: p. 327-334.
56. Chen, J.M., et al., *Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase*. Biol Chem, 2001. **382**(5): p. 777-83.
57. Mai, J., et al., *Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12806-12.
58. Murthy, R.V., et al., *Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(6): p. 2293-9.
59. Liu, C., et al., *Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy*. Cancer Res, 2003. **63**(11): p. 2957-64.
60. Choi, S.J., et al., *Identification of human asparaginyl endopeptidase (legumain) as an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27747-53.

61. Zeeuwen, P.L., et al., *Evidence that unrestricted legumain activity is involved in disturbed epidermal cornification in cystatin M/E deficient mice*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(10): p. 1069-79.
62. Nishimura, Y., M. Higaki, and K. Kato, *Identification of a Precursor Form of Cathepsin-D in Microsomal Lumen - Characterization of Enzymatic Activation and Proteolytic Processing Invitro*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987. **148**(1): p. 335-343.
63. Morita, Y., et al., *Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells*. FEBS Lett, 2007. **581**(7): p. 1417-24.
64. Clerin, V., et al., *Expression of the cysteine protease legumain in vascular lesions and functional implications in atherogenesis*. Atherosclerosis, 2008.
65. Promochem, L. *Product description*. 2008 [cited; Available from: <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-202&searchProgram=ATCC&CFID=11113111&CFTOKEN=48857196>].
66. Dahl, T.B., et al., *Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization*. Circulation, 2007. **115**(8): p. 972-80.
67. Bradford, M.M., *Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
68. Johansen, H.T., C.G. Knight, and A.J. Barrett, *Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis*. Anal Biochem, 1999. **273**(2): p. 278-83.
69. Werle, B., et al., *Assessment of cathepsin L activity by use of the inhibitor CA-074 compared to cathepsin B activity in human lung tumor tissue*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1995. **376**(3): p. 157-64.
70. Barrett, A.J. and H. Kirschke, *Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L*. Methods Enzymol, 1981. **80 Pt C**: p. 535-61.
71. Spencer, T.A., et al., *Pharmacophore analysis of the nuclear oxysterol receptor LXRalpha*. J Med Chem, 2001. **44**(6): p. 886-97.
72. Repa, J.J., et al., *Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1524-9.
73. Auwerx, J., *The Human Leukemia-Cell Line, Thp-1 - a Multifaceted Model for the Study of Monocyte-Macrophage Differentiation*. Experientia, 1991. **47**(1): p. 22-31.
74. Halvorsen, B., et al., *Interleukin-10 enhances the oxidized LDL-induced foam cell formation of macrophages by antiapoptotic mechanisms*. J Lipid Res, 2005. **46**(2): p. 211-9.
75. Almlöf, M., et al., *Legumain expression and activity increases in differentiating THP-1 cells*. 2007: Oslo.
76. Steinberg, D., *Oxidized low density lipoprotein--an extreme example of lipoprotein heterogeneity*. Isr J Med Sci, 1996. **32**(6): p. 469-72.
77. Hoppe, G., J. O'Neil, and H.F. Hoff, *Inactivation of lysosomal proteases by oxidized low density lipoprotein is partially responsible for its poor degradation by mouse peritoneal macrophages*. J Clin Invest, 1994. **94**(4): p. 1506-12.
78. Li, W., et al., *Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(2): p. 177-84.

79. O'Neil, J., G. Hoppe, and H.F. Hoff, *Phospholipids in oxidized low density lipoproteins perturb the ability of macrophages to degrade internalized macromolecules and reduce intracellular cathepsin B activity*. *Atherosclerosis*, 2003. **169**(2): p. 215-24.
80. O'Neil, J., et al., *Inactivation of cathepsin B by oxidized LDL involves complex formation induced by binding of putative reactive sites exposed at low pH to thiols on the enzyme*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **23**(2): p. 215-25.
81. Zeng, J., et al., *Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols*. *Biochem J*, 2006. **398**(2): p. 197-206.
82. Hayden, J.M., et al., *Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(1): p. 26-35.
83. Tranheim Kase, E., et al., *22-Hydroxycholesterols regulate lipid metabolism differently than T0901317 in human myotubes*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1761**(12): p. 1515-22.
84. Popa, C., et al., *The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(4): p. 751-62.
85. Shi, G.P. and G.M. Dolganov, *Comprehensive transcriptome of proteases and protease inhibitors in vascular cells*. *Stroke*, 2006. **37**(2): p. 537-41.
86. Sukhova, G.K., et al., *Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(3): p. 576-83.
87. Lee, S.Y., R.P. Cherla, and V.L. Tesh, *Simultaneous induction of apoptotic and survival signaling pathways in macrophage-like THP-1 cells by Shiga toxin 1*. *Infect Immun*, 2007. **75**(3): p. 1291-302.
88. Lee, S.Y., et al., *Shiga toxin 1 induces apoptosis in the human myelogenous leukemia cell line THP-1 by a caspase-8-dependent, tumor necrosis factor receptor-independent mechanism*. *Infect Immun*, 2005. **73**(8): p. 5115-26.

APPENDIKS

Løsninger

Celledyrking og høsting

THP-1 dyrkningsmedium:

RPMI 1640 medium med 2 mM L-glutamin og 1,5 g/L natriumkarbonat	500 ml
1 M HEPES	5 ml
Glukose (10 %)	22,5 ml
14,3 M 2-merkaptoetanol	2 µl
100 mM natriumpyruvat	5 ml
FBS gold	50 ml
10000 U/ml penicillin og 10 mg/ml streptomycin	5 ml
250 µg/ml fungizone (amphotericin B)	5 ml

Løsning til fortynning av trypanblått:

NaCl	9 mg
dH ₂ O	ad 1 ml

Trypanblått (0,4 % (w/v))

Trypanblått	400 mg
Løsning til fortynning av trypanblått	ad 100 ml
Sterilfiltreres før bruk (0,22 µm)	

1 x PBS:

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

Lysisbuffer (pH 5,8):

Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	100 mM
Na ₂ (EDTA)	1 mM
n-oktyl-β-D-glukopyranosid	1 % (w/v)

Lysisbuffer med proteaseinhibitor:

Lysisbuffer	10 ml
”Complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets”	1 tablett

Måling av enzymaktivitet**Legumain-assaybuffer (pH 5,8):**

C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	39,5 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	121 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
CHAPS	0,01 %
DTT (tilsettes rett før bruk)	1 mM

Legumain-substratløsning (34 μM):

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

Cathepsin B-assaybuffer (pH 5,5):

Natriumacetat (NaC ₂ H ₄ O ₂ ·3H ₂ O)	200 mM
Na ₂ EDTA	4 mM
DTT (tilsettes rett før bruk)	8 mM

Cathepsin B-substratløsning (68 μM):

1 mM Z-Arg-Arg-NHMec (løst i DMSO)	680 μl
dH ₂ O	9,32 ml

Western blotting**Gelbuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8):**

Tris (base)	36 g
dH ₂ O	ad 200 ml

Stacking gelbuffer (0,5 M Tris HCl, pH 6,8):

Tris (base)	3 g
dH ₂ O	ad 200 ml

SDS (10 %):

SDS	5 g
dH ₂ O	ad 200 ml

Ammoniumpersulfat (10 %):

Ammouniumpersulfat	5 g
dH ₂ O	ad 50 ml

2X Sample buffer:

0,5 M Tris-HCl pH 6,8	6,25 ml
SDS-løsning (10 %)	5 ml
Glyserol 99,5 %	7,5 ml
dH ₂ O	ad 50 ml

Separasjonsgel (12 %), 4 geler:

dH ₂ O	8,72 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	6,5 ml
Monomer løsning (akrylamid)	10,4 ml
SDS-løsning (10 %)	260 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	130 µl
TEMED	13 µl

Stacking gel (4 %), 4 geler:

dH ₂ O	12,2 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	5 ml
Monomer løsning (akrylamid)	2,6 ml
SDS-løsning (10 %)	200 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	100 µl
TEMED	20 µl

Elektroferesebuffer (pH 8,3):

Tris (base)	7,6 g
Glysin	36 g
SDS	2,5 g
dH ₂ O	2,5 l

Blottingbuffer (pH 8,3):

Tris (base)	12 g
Glysin	58 g
Metanol	800 ml
dH ₂ O	ad 4 l

T-TBS (pH 7,5):

Tris (base)	2,42 g
NaCl	11,68 g
Tween 20	1 ml
dH ₂ O	ad 2 l

Blotto:

Fettfri tørrmelk	25 g
T-TBS	500 ml

Fremkallingsløsning:

“Kodak X-Ray developer”	120 ml
H ₂ O	280 ml

Fix-løsning:

“Kodak X-Ray fixer”	120 ml
H ₂ O	280 ml

Stripping-buffer:

2-merkaptoetanol	0,35 ml
SDS (10 %)	10 ml
0,25 M Tris, pH 6,8	12,5 ml
dH ₂ O	ad 50 ml

Prosedyrer

Mellomversjon-metode for analyse av totalprotein

”Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate” ble fortynnet med destillert vann (4:15) og sterilfiltrert. Albumin standard (0-100 µg/ml) ble fortynnet i lysisbuffer (se appendiks, løsninger) og brukt til å opprette en standardkurve. Det ble tilsatt 50 µl standard eller prøve i en Nunc 96-brønners mikrotiterplate. Alle standarder og prøver ble tilsatt som duplikater. Deretter ble alle brønner tilsatt 150 µl fortynnet fargereagens. Mikrotiterplaten ble inkubert i romtemperatur i 5 minutter før absorbansen ble målt ved 595 nm og 25 °C i en mikroplateleser (Wallac 1420 Victor³ Multilabel counter). Standardkurven ble brukt til beregning av totalproteinkonsentrasjoner av cellelysatprøver.

Prosedyre for TCA-felling av cellelysatprøver til Western blotting

Prøvene måles for totalprotein på forhånd.

1. 900 µl cellelysatprøve overføres til et nytt eppendorfrør.
2. 90 µl 100 % TCA tilsettes og blandes ved hjelp av vortex.
3. Prøvene settes deretter på is i minst 30 minutter etterfulgt av sentrifugering i 5 min ved 10 000 x g og 4 °C grader i 5 minutter. Supernatanten suges forsiktig av og kastes.
4. 900 µl 1 % TCA tilsettes til pelleten som blandes ved hjelp av vortex. Rørene sentrifugeres og supernatanten kastes.
5. Pelleten tilsettes 30 µl NaOH og blandes ved hjelp av vortex til alt er løst.
6. Det tilsettes 30 µl 2 X samplebuffer, 10 % β-merkaptoetanol, 5 % bromfenolblått og 1X Sample buffer. Sluttkonsentrasjonen av prøvene blir 1 µg/µl totalprotein.
7. Prøvene kokes i vannbad i 5 min slik at proteinene denatureres.

Prosedyre for Western blotting

Støping av gel

1. Gelstøpingsformen settes sammen. Det kontrolleres at støpeformen er tett og står i vater.
2. 12 % separasjonsgel lages etter oppskrift (se appendiks, løsninger). Ammoniumpersulfat og TEMED tilsettes til slutt. Løsningen blandes med pipette og tilsettes i støpeformen til ca. 2 cm fra toppen.
3. 200 μ l isobutanol tilsettes på toppen av hver gel før gelen stivner. Isobutanol fjerner bobler og glatter overflaten.
4. Gelløsningen settes til stivning i 45 minutter.
5. Det skylles med destillert vann for å fjerne rester av isobutanol, og tørkes av med papir.
6. 4 % Stacking gel lages etter oppskrift (se appendiks, løsninger) og formene fylles helt opp. Kammer plasseres i hver gel.
7. Gelløsningen settes til stivning i 45 minutter.
8. Støpeformen tas fra hverandre med kniv og hver gel vaskes med destillert vann, slik at gelrester fjernes.
9. Gelene kan eventuelt pakkes inn i fuktig papir og oppbevares i kjøleskap i 3- 4 dager.

Gelelektroforese

1. Gelene festes til et elektroforesekar, som kobles til kjøleslanger og fylles med elektroforesebuffer.
2. Kammene tas forsiktig ut og brønnene skylles med elektroforesebuffer. 15 μ l prøve (tilsvarer 15 μ g protein) og 5 μ l "Precision Plus Protein Standard" tilsettes i brønnene, for å kontrollere at proteiner ble overført fra gel til nitrocellulosemembran.
3. Elektroforesekaret kobles til kjøleslanger og strøm (200 V). Strøm (200 V) og elektroforesen settes i gang (1 time og 20 minutter).

Blotting

1. Nitrocellulosemembraner, filterpapir og cellofan fuktes i 5-10 minutter i blottingbuffer (se appendiks, løsninger). Gelen gjøres klar til blotting ved å fjerne stacking gelen
2. Membraner, geler, filterpapir og cellofan settes sammen som en "sandwich" i blottemaskinen (ECL Semi-dry Blotters). Det tilføres blottingbuffer mellom hvert lag og luftbobler fjernes.

3. Strøm kobles til (32 mA per gel) og det blottes i 45 minutter.
4. Ferdige blott farges i 1 minutt med Ponceau S løsning og skylles i destillert vann. Dette viser hvor mye protein som er overført fra gel til membran. Membranene med proteinbånd kopieres i kopimaskin.

Deteksjon

1. Membranene tilsettes 10 ml T-TBS (se appendiks, løsninger) i 10 minutter.
2. Membranene blokkes i 10 ml Blotto (se appendiks, løsninger) i 60 min ved romtemperatur og vipping.
3. Etter blokking helles Blotto av. Det tilsettes 10 ml Blotto med primærantistoff for hver membran. Fortynningen avhenger av type primærantistoff. Membranene inkuberes med vipping over natt i kjølerom.
4. Neste dag vaskes membranene 3-4 ganger i 5-15 min med Blotto (10 ml) ved vipping i romtemperatur.
5. Sekundært antistoff tilsettes (1 ml for hver membran) og membranene inkuberes 45-60 min ved romtemperatur og vipping.
6. Det vaskes 2 ganger i 5-15 min i Blotto ved romtemperatur og vipping.
7. Membranen skylles 2 ganger med T-TBS (se appendiks, løsninger). Deretter vaskes det 2 ganger i 10 minutter med T-TBS ved vipping i romtemperatur.

Fremkalling

1. Membraner inkuberes i 1 minutt i ECLTM Blotting Detection Reagents, og pakkes deretter inn i plastfolie.
2. I mørkerom legges film med membranene for eksponering. Ved deteksjon av cathepsin B, eksponeres filmen i 30 sekunder, 1 minutt og 5 minutter. Ved deteksjon av legumain eksponeres filmen i 5 og 45 minutter.
3. Filmen legges i fremkallingsløsning (se appendiks, løsninger) i ca. 30 sekunder. Deretter skylles filmen i vann før den legges i fix-løsning (se appendiks, løsninger) i 5 minutter. Filmen skylles til slutt i vann i 1 minutt, og henges til tork.

Stripping av membraner

1. Membranene settes i 50 ml stripping-buffer og varmes i vannbad (50 °C) med vipping hvert 5. minutt.
2. Membranene vaskes 2 ganger med 10 ml T-TBS og blokkes i blotto i minst 1 time (romtemperatur). Etter blokking tilsettes primært antistoff og deteksjon og fremkalling utføres etter beskrivelse ovenfor.

Isolering og oksidativ modifisering av LDL

LDL ble isolert fra humant plasma ved sekvensiell ultrasentrifugering i tetthetsområdet 1,019-1.063 g/ml og dialysert mot PBS ved 4 °C. Prøvene ble lagret i flytende nitrogen og brukt innen 3 uker. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved bruk av "BCA protein assay" (Pierce, Rockford, IL) og BSA ble brukt som standard.

LDL ble oksidativt modifisert i et cellefritt system. For å fjerne EDTA før oksidering, ble LDL dialysert ytterligere mot EDTA-fritt PBS (pH 7,4). LDL med 10 µM CuSO₄ ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Oksideringen ble avsluttet ved avkjøling og tilsetning av EDTA (200 µM sluttkonsentrasjon) og butylert hydroksytoluen (40 µM sluttkonsentrasjon). For å bestemme oksidasjonsgraden ble prøvene analysert for innhold av oksideringsproduktet lipidperoksid (LPO) og elektroforetisk mobilitet (R_m) ble bestemt.