

Betydningen av legumain og cystatin E/M for aktivering av caspase-3

Masteroppgave av
Dlvin Salem Hame



Masteroppgave i farmasi
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematiske-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

15. mai 2014

Betydningen av legumain og cystatin E/M for aktivering av caspase-3

Dlvin Salem Hame



Masteroppgave i farmasi
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematiske-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

Veiledere:

Professor Rigmor Solberg

Professor Harald Thidemann Johansen

Stipendiat Robert Smith

© Dlvín Salem Hame

2014

Betydningen av legumain og cystatin E/M for aktivering av caspase-3.

Dlvín Salem Hame

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap på Farmasøytisk institutt under veiledning av professor Rigmor Solberg, professor Harald Thidemann Johansen og stipendiat Robert Smith.

Først av alt vil jeg rette en inderlig takk til mine hovedveiledere Rigmor Solberg og Harald Thidemann Johansen for all den gode veiledning, oppfølging, rådgivning og et store engasjement under hele mitt arbeid med masteroppgaven. En takk også til Robert Smith for gode innspill, hjelp til tekniske problemer og ikke minst din tilgjengelighet underveis. Samtidig vil jeg rette en takk til avdelings-ingeniør Hilde Nilsen for god opplæring i det praktiske laboratorie-arbeidet.

Jeg ønsker også å takke alle mine medstudenter i kull 2014 for fem fine år, og alle i 4.etasje i Gydas vei. Tiden sammen med dere har gitt meg mange gode erfaringer som jeg vil bringe med meg videre i livet.

Takk til mamma, pappa, og alle mine søsken som alltid har hatt troen på meg, og som har støttet meg gjennom disse fem årene. Sist, men ikke minst, vil jeg takke min kjære Abdi for støtte i medgang og motgang i alle disse årene. I tillegg takker jeg mine venninner Bettol, Rojin, Esra og Sigri som har vært der for meg og holdt motet mitt oppe i tunge stunder.

Blindern, mai 2014

Dlvin Salem Hame

Innholdsfortegnelse

Forord	IV
Innholdsfortegnelse	V
Sammendrag	VII
1 Innledning.....	1
1.1 Celledød.....	1
1.1.1 Apoptose.....	1
1.1.2 Nekrose.....	5
1.1.3 Autofagi.....	5
1.2 Apoptose- aktivatorer	6
1.2.1 Staurosporin	6
1.2.2 Leu-Leu-OMe.....	6
1.3 Proteaser	7
1.3.1 Legumain.....	8
1.3.2 Caspaser	10
1.4 Proteasehemmere.....	11
1.4.1 Cystatin E/M	11
1.4.2 E64d	11
Mål med oppgaven	12
2 Materialer og metoder	13
2.1 Kjemikalier og reagenser.....	13
2.2 Utstyr	15
2.3 Cellelinjer, splitting, høsting	16
2.3.1 HEK293.....	16
2.3.2 M38L.....	17
2.3.3 M4C.....	17
2.4 Splitting, telling, utsåing og dyrking av celler til forsøk	17
2.5 Høsting av celler.....	18
2.6 Enzymaktivitetsmåling	19
2.6.1 Caspase-3	19

2.6.2	Legumain.....	20
2.7	Måling av totalprotein	20
2.8	Elektroforese og immunoblotting.....	21
2.9	Statistiske analyser	23
3	Resultater.....	24
3.1	Staurosporin øker aktiviteten av caspase-3 i M4C-celler	24
3.2	Staurosporin reduserte aktiviteten av legumain.....	26
3.3	Inhibisjon av caspase-3-aktivitet i HEK-cellelinjer stimulert med 1 µM staurosporin i 4 timer	28
3.4	Leu-Leu-OMe øker caspase-3-aktivitet i M38L celler.....	30
3.5	Leu-Leu-OMe reduserer legumainaktivitet i HEK-celler	34
3.6	Inhibisjon av caspase-3 aktivitet i HEK-cellelinjer stimulert Leu-Leu-OMe 500 µM	38
4	Diskusjon.....	41
4.1	Valg av cellemodeller.....	41
4.2	Staurosporin øker Caspase-3 aktiviteten i M4C-celler.....	42
4.3	Legumainaktiviteten redusert med staurosporin i HEK-cellelinjer.....	44
4.4	Caspase-3 aktivitet øker i M38L celler etter stimulering med Leu-Leu-OMe	45
4.5	Leu-Leu-OMe reduserer legumainaktivitet i HEK-celler	47
4.6	Prosesser som kan føre til caspase-3 aktivitet	47
5	Konklusjon	51
	Referanseliste	52
	Vedlegg	56

Sammendrag

Apoptose er programmert celledød for å fjerne uønskede celler og er en felles egenskap for alle flercellede organismer. Caspase-3 er involvert i intracellulære signalkaskader ved apoptose. En ubalanse i regulering av apoptose kan føre til kreftutvikling. Apoptose spiller en viktig rolle i flere andre sykdommer som immunologisk, iskemiske, og nevrodegenerative sykdommer.

For å undersøke betydningen av proteasen legumain og proteaseinhibitoren cystatin E/M for caspase-3 aktivitet, ble det brukt HEK293 (normale kontroll celler), M38L (overutrykker legumain) og M4C (overutrykker cystatin E/M) celler. Cellene ble stimulert med dødsstimulerende stoffer som staurosporin og Leu-Leu-OMe. Staurosporin er kjent for å være en kinasehemmer. Leu-Leu-OMe øker lysosomal membranpermeabilitet. Proteaser som er involvert i apoptose vil dermed frigjøres fra lysosomer til cytosol. Legumain som befinner seg i lysosomene, kan frigjøres til cytosol og dermed påvirke aktiviteten av caspase-3 eller andre proteaser.

Cellene ble stimulert med staurosporin i 0-24 timer. Legumain og caspase-3 aktivitet ble målt. Resultatene viste at caspase-3 aktiviteten økte etter staurosporin behandling i M4C celler. Resultatene på legumainaktivitetsmålingene viste en tendens til at staurosporin har noe reduserende effekt på legumainaktiviteten.

Det ble også undersøkt effekten av Leu-Leu-OMe på caspase-3 og legumainaktivitet i HEK293, M38L og M4C celler i 0-24 timer. Det ble observert økt caspase-3 aktivitet i M38L celler. Det ble også utført doserespons med Leu-Leu-OMe med ulike konsentrasjoner inkubert i 4 timer. Caspase-3 aktivitet var økt i M38L celler i alle konsentrasjoner. Immunoblotting viste tilstedeværelse av aktiv form for caspase-3 med molekylvekt på 17 kDa i M38L celler i alle konsentrasjonene, men i HEK293 og M4C celler ble det vist tilstedeværelse av aktiv form for caspase-3 kun i de høye konsentrasjoner. Legumainaktivitetsmålinger viste å være redusert etter stimulering med Leu-Leu-OMe i ulike tider og konsentrasjoner i alle celletyper.

Staurosporin og Leu-Leu-OMe påvirker cellene til økt caspase-3 aktivitet, men resultatene tyder på at det skjer via to ulike mekanismer. Dette fordi staurosporin ga høyest caspase-3 aktivitet når det var mye cystatin E/M, men Leu-Leu-OMe ga høyest caspase-3 aktivitet når cellene inneholdt mye legumain (M38L celler). Mekanismene for dette er ukjent og trenger videre studier.

Forkortelser og forklaringer

Forkorting	Forklaring
Ac-DEVD-AMC	N-acetyl-aspartat-glutamat-valin-aspartat-7-amino-4-metylkumarin
Ala	alanin
Asn	asparagin
Asp	asparat
CO ₂	karbondioksid
dH ₂ O	destillert vann
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagles Medium”
DMSO	dimetylsulfoksid
DNA	deoksyribonukleinsyre
DTT	ditiotreititol
E64d	l-trans-epoksysuksinyl-leucin-3-metylbutylamid-etylester
FBS	føtalt bovint serum, kalveserum
GAPDH	glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase
HEK	human embryonic kidney
kDa	kilodalton
Leu-Leu-OMe	L-leucyl-L-leucine-metylester
M38L	Legumain-transfekterte HEK293 celler
M4C	cystatin E/M-transfekterte HEK293
nM	nanomolar
PBS	fosfatbufret saltvann

rpm

omdreininger per minutt

Z-Ala-Ala-Asn-AMC benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-amino-4-metylkumarin

1 Innledning

1.1 Celledød

Celledød defineres som et irreversibelt tap av plasmamembranens integritet. Historisk sett er celledød blitt delt inn i tre typer hos pattedyrceller som skilles etter morfologiske endringer ved hjelp av lys og elektronmikroskopi; nekrose, apoptose og autofagi. Alle tre typene kan føre til celledød [1], [2]. I motsetning til nekrose, er apoptose en regulert, energi-avhengig form for celledød som fører til fagocytose av cellulære rester av naboceller. Celledød oppstår ofte i komplekse, flercellede organismer for å opprettholde vevshomeostase. Et eksempel er når celler dør under embryonal utvikling. For at organene skal utvikles riktig, er celledeling, og celledifferensieringen viktig, men det viktigste er at uønskede celler fjernes. Vevet mellom fingre og tær må fjernes for at hender og føtter få sin endelig utforming. Et annet eksempel på celledød ved vevsvedlikehold, er når celledød skjer av infiserte celler ved cytolytiske effektorceller i immunsystemet [3]. Celledød er en viktig fysiologisk regulator for utviklingsprosessen, vevshomeostase og stressrespons, men det er også en beskyttende tumorundertrykkende mekanisme. Kreftceller generelt finner ulike veier for å unngå celledød som i normale celler virker som en beskyttende mekanisme for å fjerne skadede celler. Som et resultat av dette, vil en populasjon av motstandsdyktige celler med akkumulert genetiske og epigenetiske abnormaliteter bidra til malign transformasjon [4]. Enhver forandring av den homeostatiske balansen mellom overlevelse og død er derfor en kritisk faktor i kreftutvikling.

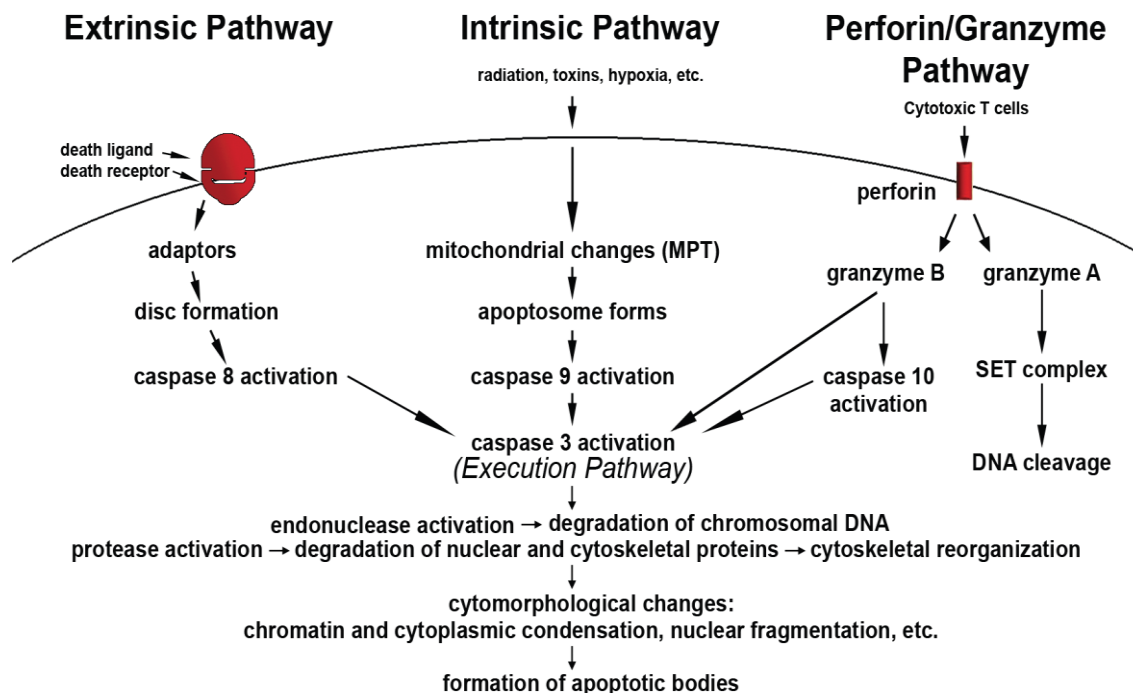
1.1.1 Apoptose

Begrepet apoptose ble først introdusert av Kerry og medarbeiderne til å beskrive fysiologiske prosesser av programmert celledød hos eukaryote organismer [5]. Apoptose er en viktig og grundig studert vei av programmert celledød, som er sentralt i forskjellige fysiologiske prosesser [6]. Programmert celledød, hvor "selvmord"-programmet blir aktivert inne i cellen, fører til fragmentering av DNA, krymping av cytoplasma, membranendringer og celledød uten nedbrytning eller skade på nabocellene (figur 1.2). Mekanismen er viktig for flere cellulære prosesser [7]. To signaler er involvert for å sette i gang apoptose (figur 1.1), døds-reseptor

signalveien «extrinsic» aktiveringsvei, og mitokondriell signalveien «intrinsic» aktiveringsvei. I immunsystemet er apoptose helt nødvendig for utvikling av immunologisk toleranse, ved at T- og B-lymfocytter som gjenkjenner kroppens egne celler som antigener elimineres [8]. Lysosomene spiller en rolle i apoptose ved å frisette lysosomale proteaser ut i cytosol og deretter trigge intracellulære kaskader og apoptose [9].

«Extrinsic» aktiveringsvei (døds-reseptorsignalvei): aktiveres ved ligand-bundet dødsreseptorer, hovedsakelig TNF-TNFR1, Fasl-Fas og TRAIL-DR4 eller –DR5. Medlemmer av TNF-ligand familien er først og fremst type II transmembran proteiner som er ordnet i stabile homotrimere [10]. De utøver sine biologiske funksjoner på cellemembran. Døds-reseptorer tilhører tumor nekrose faktor reseptor (TNFR)-superfamilien og kan generelt ha flere funksjoner, herunder initiere apoptose. TNF reseptor (TNFR)-superfamilien er karakterisert ved tilstedeværelsen av cystein-rike domener (CRD) ved å mediere binding mellom ligander og type I transmembran reseptorer. Blant annet er TNFR1 (TNF-reseptor-1), CD95 (eller Fas) og TRAIL reseptorer DR4 og DR5 best karakterisert for induksjon av apoptose [10].

Døds-reseptor stimulering resulterer i oligomerisering av reseptorer og rekruttering av protein Fas- forbundet dødsdomene (Fadd) og caspase - 8, som danner en død - induserende signal kompleks (DISC). Det skjer autoaktivering av caspase -8 ved DISC. Caspase-8 vil deretter aktivere effektor caspaser, som caspase -3, -6 og -7 (figur 1.1), og andre proapoptotiske faktorer som Bcl-2-familieproteinet Bid. Aktivering av Bid, danner en link mellom «intrinsic» aktiveringsvei og «intrinsic» aktiveringsvei [11].

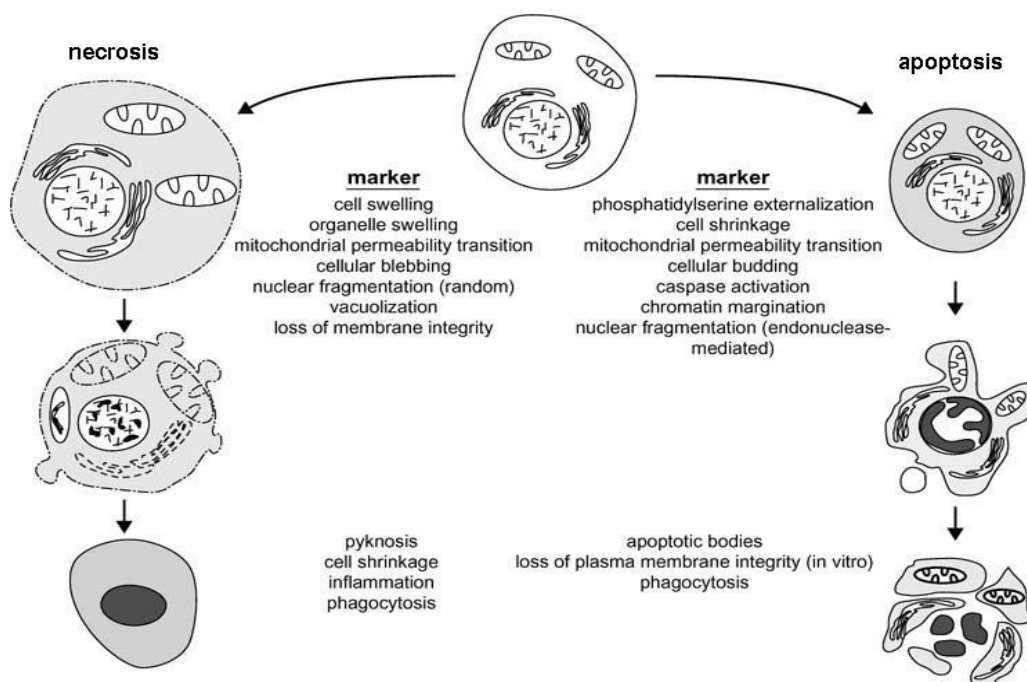


Figur 1.1 skjematisk fremstilling av apoptotiske signalveier. De to hovedveiene er «extrinsic» og «intrinsic», samt en perforin/granzym vei. Alle de 3 veiene krever spesifikke utløsende signaler for å kunne begynne en energiavhengig kaskade av molekylære hendelser. Hver vei aktiverer initiator caspaser (8, 9, 10) som vil aktivere effektor caspase-3 som fører til apoptose [11].

«Intrinsic» aktiveringsvei: er en indre reaksjonsvei som skjer i mitokondriene og er mediert av diverse apoptotiske stimuli, som aktiverer den mitokondrielle veien (figur 1.1). I mitokondriene kan den ytre membranen bli permeabel (MOMP). MOMP er mediert og kontrollert av Bcl-2 familiemedlemmene. Når MOMP skjer, vil det inntreffe celledød gjennom frigjøring av molekyler som er involvert i apoptose eller tap av mitokondrielle funksjoner. Blant annet vil cytokrom c frigjøres fra mitokondriene til cytoplasma og initiere en caspase kaskade. Cytosolisk cytokrom c binder seg til apoptose protease - aktiverende faktor 1 (Apaf -1) og procaspase-9, som genererer en intracellulær kompleks kjent som " apoptosome ". Innenfor apoptosomet er caspase -9 aktivert, noe som fører til aktivering av caspase - 3. De to veiene av apoptose , «Extrinsic» aktiveringsvei (dødsreseptorsignalvei) og «Intrinsic» aktiveringsvei (mitokondrielle veien), aktiverer caspase -3 (figur 1.1) som deretter aktiverer andre proteaser og nukleaser som er involvert i programmert celledød [10].

Nekrose er en giftig prosess som er energiavhengig, dette i motsetning til apoptose. Selv om apoptose og nekrose er forskjellige i morfologien og mekanismene (figur 1.2), er det også noe sammenheng mellom disse to veiene. Mye kan tyde på at nekrose og apoptose representerer

morfologiske uttrykk for en felles biokjemisk nettverk beskrevet som "apoptose-nekrose kontinuum". Faktorer som ved en apoptose fører til økt caspase-3 aktivitet, vil ved en nekrose føre til reduksjon av caspaser og ATP. Om cellen dør av nekrose eller apoptose, er avhengig av hvilke signaler cellen får, vevstype, utviklingsstadiet av vevet og det fysiologiske miljøet. Nekrose og apoptose kan også oppstå samtidig avhengig av varigheten av stimuli, omfanget av ATP-nedbrytning og tilgjengeligheten av caspaser. Nekrose er en ukontrollert og passiv prosess som rammer store deler av cellen, men apoptose er mer kontrollert og energiavhengig prosess og påvirker kun individuelle eller grupper av celler. Tapet av cellemembran under nekrose resulterer i utslipp av cytoplasmatisk innhold i omkringliggende vev, som fører til betennelse i vevet (figur 1.2). Men apoptose slipper ikke sitt innhold ut, cellene krymper, DNA fragmenterer og dermed oppstår det ingen inflammasjon [11], [12].



Figur 1.2. Celledød ved nekrose og apoptose. Celler dør vanligvis ved to mekanismer, nekrose eller apoptose. Celler som dør ved nekrose har forskjellig morfologi, sammenlignet med de som dør ved apoptose. Videre kan celler som dør av nekrose og apoptose bli identifisert ved markører for hver vei [12].

1.1.2 Nekrose

Begrepet nekrose brukes for en form for celledød som ikke er programmert, men tilfeldig. I motsetning til apoptose, er nekrose en passiv form for celledød uten avanserte regulatoriske mekanismer som er mer karakteristisk for apoptose. Årsakene til nekrotisk celledød slik som varmestress eller giftige stoffer kan i mange tilfeller også inducere apoptotisk celledød [3]. Andre ytre faktorer som infeksjoner kan også forårsake nekrose. Nekrotisk celledød starter gjerne med morfologiske forandringer, cellen sveller, oppløst endoplasmatiske retikulum (ER), mitokondriene sveller og ødelegges, ribosomer frigjøres fra ER og cytoplasma oppløses. Disse medfører til frigivelsen av cellulære komponenter (figur 1.2) som igjen resulteres i form av inflammasjon i vevet [13], [2].

1.1.3 Autofagi

Autofagi er en prosess der celler bryter opp sine egne bestanddeler. Dette skjer ved at cellen danner en membran rundt sine egne komponenter, som er isolert i form av vesikler. Videre vil lysosomene tømme enzymer som bryter ned disse vesiklene i cytoplasma. Vesiklene blir degradert og resirkulert som igjen vil gi inflammasjon rundt celler i vevet [14]. Autofagi er "tilfeldig" celledød som opprettholdes i alle eukaryote celler fra gjær til mennesker. Autofagi skjer i 7 triner og på et basalnivå under normale vekstvilkår. Den er involvert i nedbrytningen av skadede eller gamle organeller. Autofagi induseres ved cellulære påkjenninger, inkludert sult, vekst, eller opphopning av «misfolded» proteiner. Hos pattedyr har autofagi vært innblandet i enten patogenesisen eller involvert i en lang rekke sykdommer, inkludert neurodegenerative sykdommer, kroniske bakterie- og virus-infeksjoner, aterosklerose og kreft. Det er også involvert i medfødt og adaptiv immunrespons til ulike patogener. Defekter i autofagi kan føre til opphopning av dysfunksjonell mitokondrie og gi økt oksidativt stress med skade på membranene, proteiner, og DNA. Skade på DNA er en potensial kilde til genetisk ustabilitet. Derfor kan defekter i autofagi bidra til utvikling av kreft [14], [15].

Defekter i autofagi og apoptose kan oppstå både sekvensielt og samtidig gjennom mutasjoner. Dette kan bidra til konstitutiv aktivering av fosfoinositid 3-kinase/AKT/mTOR «target of rapamycin». Kreftceller som mangler autofagi og apoptose er mer utsatt enn andre for nekrotisk celledød i respons til hypoksi / iskemi og / eller næringsmangel. [15], [14].

1.2 Apoptose- aktivatorer

1.2.1 Staurosporin

I 1977 ble alkaloidet staurosporin isolert fra bakterien *Streptomyces staurosporeus* i 1977. Det er blitt karakterisert som et sterkt induser av apoptose i mange forskjellige celletyper [16]. Den hovedbiologiske aktiviteten av staurosporin er hemming av proteinkinase C (PKC) og cyklin - avhengig kinase (CDKs). Svulster med invasiv og metastatisk potensial har ofte høye nivåer av cykliner og CDKs [17]. Staurosporin hemmer CDKs og er et lovende antikreftmiddel. Mekanismen der staurosporin inducerer apoptose, derimot, er fortsatt ikke helt klart. Men noen studier har funnet at Bcl-2 overekspresjon var ikke effektivt i å beskytte celler fra apoptose etter staurosporin behandling. Det er vist gjennom studier at den mitokondrielle apoptotiske veien spiller en avgjørende rolle i staurosporin-indusert apoptose. Studier har vist at staurosporin øker aktiviteten av caspase-3 og dermed aktivere apoptose [18]. Men det er også vist at staurosporin inducerer apoptose via caspase-uavhengig mekanisme. Det er derfor foreslått flere mekanismer som kan være involvert i staurosporin-indusert apoptose, og disse kan variere mellom ulike celletyper. I samme studiet ble det undersøkt apoptose-induserende potensiale for staurosporin i dyrkede melanom cellelinjer. Det ble rapportert relativ høye nivåer av apoptose i de fleste melanomcellelinjer gjennom både caspase-avhengig og caspase-uavhengig apoptose. Mens caspaser spiller en avgjørende rolle i tidlig apoptose, kan AIF (apoptose-induserende faktor) være involvert i apoptose på sene stadier etter staurosporin behandling. Selv om den mitokondrielle apoptotiske vei ble aktivert av staurosporin, kan overekspresjon av Bcl-2 bare forsinke og delvis inhibere staurosporin-indusert apoptose. Dette tyder på at staurosporin inducerer apoptose av melanom med en ikke-konvensjonell mitokondriell apoptotisk vei [18]. Staurosporin effekten i HEK-cellelinjer på caspase-3 og legumainaktivitet er ikke studert før.

1.2.2 Leu-Leu-OMe

L - leucyl L -leucin- metylester (Leu-Leu-OMe) er en polymer som kan permeabilisere lysosommembran og indusere celledød. Leu-Leu-OMe dreper humane leukocytter som CD8 +- T-celler og monocytter, men ikke B-celler. Leu-Leu-OMe blir tatt opp gjennom reseptor-mediert endocytose, og deretter omdannes til (Leu-Leu)_n-OMe, der $n > 3$) ved hjelp av DPPI i lysosomer, som er antatt å føre til ødeleggelse av lysosomene og DNA-fragmentering, og

forårsaker apoptose. Leu-Leu-OMe gjør at det blir lekkasje i lysosomene slik at innholdet frigjøres til cytosol [19]. Lysosomene er grunnleggende for cellevekst og dermed vil hemming og ødeleggelsen av lysosomer føre til celledød. I en studie er det undersøkt hvordan lysosomal skade forårsaker DNA fragmentering i celler som er behandlet med Leu-Leu-OMe. Det ble rapportert at Leu-Leu-OMe induerte tap av lysosomal membranintegritet slik at det skjedde lekkasje. Tapet av lysosomene ble hemmet av en DPPI-hemmer, men ikke av caspase-3 hemmer (Ac-DEVD-CHO), noe som tyder på at Leu-Leu-OMe er avgjørende for lysosomal tap. Det ble videre rapportert fra studiet at lekkasje av lysosomene vil deretter aktivere caspase-3 lignende protease via en ukjent mekanisme. Denne aktiveringen av caspase-3 lignende protease vil da føre til reduksjon i cellestørrelse og DNA fragmentering [20]. Det kreves flere studier for å belyse hvilken mekanisme som er involvert ved økt caspase-3 aktivitet under tap av lysosomal membranintegriteten og lekkasje av lysosomene. Effekten av Leu-Leu-OMe på caspase-3 og legumainaktivitet i HEK-cellelinjer er ikke studert før.

1.3 Proteaser

Proteaser er proteolytiske enzymer som er gruppert i metallo-, serin-, cystein-, treonin- og asparaginsyre –protease (1). Denne klassifiseringen er basert på deres katalytiske mekanismer. De regulerer fysiologiske prosesser som celleoverlevelse , apoptose [21], [22].

Proteaser er enzymer som hydrolyserer peptidbindinger. De kan deles inn i eksopeptidaser, som er enzymer som virker nær den terminale enden av polypeptidkjeden, og endopeptidaser, som spalter interne peptidbindinger i substratet. Den mest omfattende oversikten vedrørende klassifisering av proteaser og deres inhibitorer har blitt utarbeidet i MEROPS database [22].

Cysteinproteaser er proteolytiske enzymer med cystein i det aktive setet. Cystatiner regulerer aktiviteten av cysteinproteaser og tap av cystatinfunksjon resulterer i ukontrollert enzymaktivitet som kan føre til en rekke lidelser. Cysteinproteaser er enzymer som bruker en «cysteine residue» som nukleofil til å kløyve peptidbindinger. Spaltingen er hydrolytisk og irreversibel. Det er mulig å organisere disse proteasene i familier basert på likheter i primærstrukturen. Dessuten kan familier med likheter i sekundær og / eller tertiær strukturer klassifiseres i "klaner" på bakgrunn av karakteristiske strukturer og egenskaper [23].

Cysteinproteaser danner en av de store gruppene av proteolytiske enzymer, og kan deles opp i omtrent 30 separate familiene på grunnlag av deres struktur og funksjon. Tre familier av cystein endopeptidaser har vært kjent for å være representert i pattedyr. Den mest tallrike er papain familien (C1), som omfatter cathepsin B, H, L, S og V. Disse er hovedsakelig lysosomale enzymer, ansvarlig for proteolyse i lysosomal/endosomal system og også skiller ut for å utøve aktivitet ekstracellulært. Andre cysteinproteaser er calpain (familie C2) og caspase (tidligere interleukin 1 β - converting enzyme, C14). Legumain tilhører familien (C13) og kan legges til listen over cysteinproteaser i pattedyr [24].

Klanen CA består primært av familiene C1 (cathepsiner) og C2 (calpainer). I klanen CD, er familiene C13 (legumain), C14 (caspaser) og C50 (separase) inkludert. Det er betydelige forskjeller i substrat-spesifisiteter mellom klan CA og CD: Mens cathepsin og calpainer foretrekker en hydrofob aminosyre i posisjon P2, foretrekker legumain og caspaser en spesifikk aminosyre i posisjon P1 (asparagin og aspartat, henholdsvis). Fra et tradisjonelt synspunkt, har det generelt vært slik at cysteinproteaser primært har intracellulære lokaliseringer og funksjoner. Cathepsin og legumain er blitt beskrevet som lysosomale enzymer som vanligvis krever surt miljø for å bli aktiverte. Caspaser har en sentral rolle i celledøds mekanismer (apoptose) og blir aktivert i cytosol. Calpainer er cysteinprotease som er lokalisert og involvert i noen prosesser i cytosol [25].

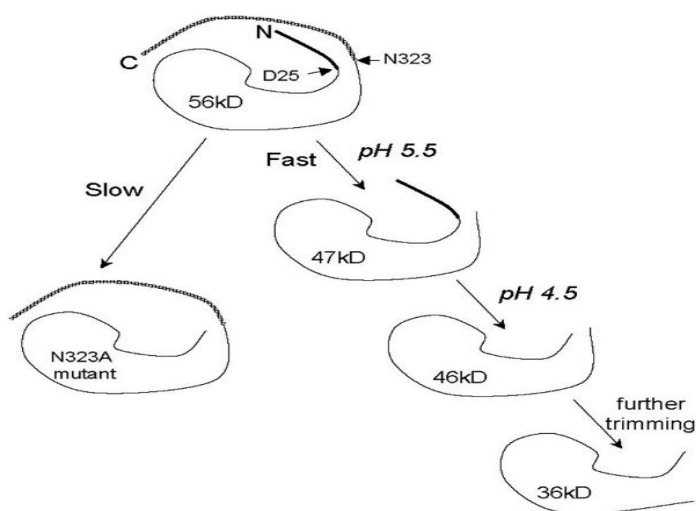
1.3.1 Legumain

Legumain er en cystein endopeptidase som først ble oppdaget i plantefrøet fra *Vicia sativa L.* (1982) [26]. Enzymet ble først kalt protease B. Til å begynne med ble enzymet renset som en cystein protease ansvarlig for modningen av frø lagringsproteiner [27]. Senere har den samme cystein protease blitt oppdaget hos pattedyr (human og grissnyre) i 1997 [24]. Dette enzymet ble kalt legumain, fordi tilsvarende enzym var allerede oppdaget hos planter. Et annet navn for dette enzymet er asparaginyln endopeptidase (AEP) [24]. Etter oppdagelsen av enzymet hos pattedyrceller, er den blitt klonet og sekvensert fra menneske og mus. Det er også funnet lave nivåer av legumain i alle vev, men det er funnet høyest nivåer i nyrene [27]. Aminosyre-sekvenser av legumain viser at det tilhører klanen CD av cysteinproteaser i C13-familien. Legumain hos pattedyr finnes hovedsakelig i lysosomer og det er studert i humane celler, deriblant nyrer fra gris, mus og rotte [28]. Selv om legumain er primært lagret i de lysosomale vesikler, har enzymet også blitt rapportert å være observert i det ekstracellulære mikromiljøet i

tumor og forbundet med matriks og cellemembran [29], [30]. Derfor er de ekstracellulære funksjoner av legumain også interessant å studere.

Human legumain har en viktig fysiologisk funksjon som et enzym i antigen presentasjon. Legumain som er en endopeptidase spalter bare på karboksylterminalen for asparagin ved hydrolyse. Denne spaltningen er veldig uvanlig for en endopeptidase, og sannsynligvis er dette årsaken til seint oppdagelsen av legumain. Legumain er først og fremst i lysosomer og trenger sur pH for å bli aktivert. Legumain gjennomgår autoaktivering og hemmes av cystatin E/M. En forskjell på legumain og caspasene er lokalisering, legumain er aktiv i lysosomene ved sur pH, mens caspasene er aktive i cytosol under nøytral pH. Asparagin ligner på asparatet hvis det blir sur pH, og da kan også legumain spalte asparatet, som betyr at det oppnåes caspase-lignende aktivitet [26] [28].

Legumain autoaktiverer trinnvis ved sur pH og videre avspaltning mediert av andre proteaser. Ved prosessering spaltes sekvenser i C-ende av proteasen. Legumain syntetiseres som et preproenzym og videre blir dette til et proenzym når preproenzym transporteres til lysosomene. Prosessering fra inaktiv til aktiv legumain er vist i figur 1.3. Ved pH 6,0 observeres prolegumain (inaktiv) og har en molekylvekt på kDa 56. Ved å redusere pH til 5,5 vil prolegumain prosesseres videre til 47 kDa som også er inaktiv form av legumain. Ved å redusere pH enda mer, prosesseres inaktiv legumain til aktiv form med molekylvekt på 46 kDa. Videre prosessering er ikke autoaktivert og *in vivo* skjer prosessering av 46 kDa til aktiv moden form for legumain på 36 kDa via andre proteaser. Legumain er mest stabil ved pH 4,2-5,5 og har maksimal aktivitet ved pH 6,4 [24, 31].



Figur 1.3. cellulær prosessering av legumain [31].

Legumain er oppregulert i de fleste krefttyper og inflammatoriske sykdommer hos mennesker, mest sannsynlig som følge av høy uttrykk i populasjoner av aktiverte makrofager. Innenfor svultens miljøet, legumain aktivitet antas å fremme tumorigenese [32].

Det er indikert at legumain er uttrykt i både tumorceller og tumorassosierte endotelceller, både intracellulært og på overflaten av cellen. Legumain overekspresjon i svulster hos mus ble bekreftet ved immunoblotting, men legumain er også uttrykt av noen normale vev. Det er karakterisert legumain uttrykk i normale menneskelige vev og svulster. Ekspresjonen av legumain var høyest for prostata kreftsvulster og positivt for de fleste prøver fra bryst og tykktarmskreft. Tidligere studier har vist at legumain spiller en rolle i aterosklerose. Det er vist økt ekspresjon av legumain på mRNA og proteinnivå i ustabile plakk sammenlignet med stabile [30].

1.3.2 Caspaser

Caspaser er en familie av cysteinprotease som kutter intracellulære proteiner på den C-terminale enden for aspartat-enheter. Caspaser er involvert i apoptose, profilering og inflammasjon. Når caspaser blir aktivert, kløyves substrater, som fører til en kaskade og gir en biologisk respons. Navnet caspase betyr cystein-avhengige aspartat-spesifikk protease. Enzymatiske egenskaper av caspaser er styrt av en dominant spesifisitet for protein-inneholdende substrater Asp og ved bruk av en cystein-sidekjeden for å katalysere peptidbinding spalting. Caspaser aktiveres ved at det skjer kløyving karboksylterminalt for aminosyre aspartat (Asp). Caspase zymogener består av et lang N-terminal prodomenet. Caspaser oppstår enten som monomerer eller dimerer, dette vil avgjøre egenskapene til caspaser. Under caspase aktivering vil det katalytiske domenet spaltes i en stor (α) og en liten (β) subenhet som interagerer med hverandre [33]. Caspaser er delt inn i to hovedgruppe, avhengig av om de er apoptotiske (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, og -10) eller inflammatoriske (caspase-1, -4, -5, -11, -12, og -13). Apoptotiske caspaser kategoriseres som initiator (caspase-2, -8, -9 og -10) og effektorer (caspase-3, -6, og -7). Initiator caspaser består av lang prodomenet. Effektor caspaser består av kort prodomenet som blir aktivert av initiator caspaser [34], [35].

Alle caspaser er produsert i cellene som katalytisk inaktive zymogener og må gjennomgå proteolytisk prosessering og aktivering under apoptose. Caspasene aktiveres ved avspaltning av den N-terminale enden (prodomenet). Når caspasene blir aktive, er de en heterodimer. Alle

initiator caspasene er preget av å inneholde regulatoriske sekvenser i prodomenet DED (Death Effector Domain) eller CARD (caspase Recruitment Domain) som muliggjør rekruttering inn i initieringskompleksene [36].

1.4 Proteasehemmere

1.4.1 Cystatin E/M

Naturlige hemmere av cysteinproteaser er medlemmer av cystatin superfamilie, og det er tre store familier eller typer cystatiner hos pattedyr. Cystatin E/M er et glykoprotein og er glykosylert på N-terminal ende. Cystatin E / M er en sterk inhibitor av legumain og av cathepsin B, L og V. Hemming av cystatin E / M i kreftceller ga økt invasjonen, motilitet og hyperproliferasjon av kreftceller, noe som tyder på at hemming av cystatin E / M gir betydelig økt proteolytisk aktivitet av cathepsin B og L og legumain [37]. Sammenhengen mellom cystatin E/M og caspase-3 er ikke studert før.

1.4.2 E64d

E64 er isolert fra *Aspergillus japonicus* i 1978 og er cysteinprotease inhibitor (1-trans - epoxysuccinyl - L-leucylamido (4-guanidino) butane). E-64 ble først vist til å hemme papain. Senere ble det oppdaget at E64 var rapportert å hemme to andre pattedyr- cysteinproteaser: cathepsin L og calpain. [38]. En studie fra 1981 undersøkte effekten av E64 på flere andre proteaser. Det ble rapportert at E64d (10 µM) inaktiverte papain, cathepsin B, H, og L. Disse proteasene viste å reagere relativt raskt. Det finnes flere former for E64, blant annet E64d. D-formen er celle permeabel. For at E64d skal ha effekt så er det viktig at det kommer inn i cellen for å hemme cathepsiner direkte [38].

Mål med oppgaven

Målet med denne oppgaven er å finne ut om legumain spiller noe rolle i apoptose og om det er noen sammenheng mellom legumain og caspase-3. Som cellemodeller vil cellelinjene HEK293, M38L (overuttrykker legumain) og M4C (overuttrykker cystatin E/M) bli brukt til å:

- Etablere og utvikle en metode for måling av caspase-3 aktivitet.
- Studere effekten av staurosporin på caspase-3 og legumain.
- Studere effekten av Leu-Leu-OMe på caspase-3 og legumain.
- Forbehandle celler med proteaseinhibitor (cystatin E/M eller E64d) før stimulering med staurosporin eller Leu-Leu-OMe og studere sammenhengen mellom inhibitor, legumain, cathepsiner og caspase-3.

2 Materialer og metoder

2.1 Kjemikalier og reagenser

AC-Asp-Glu-Val-Asp-AMC, I.1660.0005, caspase-3 substrat	Bachem, Budendorf, Sveits
Aceton, 20066.296	VWR international S.A.S, France
Albuminstandard (23209)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006)	Bio-Rad Laboratories Inc , California, USA
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell	Promega Corporation, Madison, USA
Colchicine (C9754)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MI, USA
E64d, E8640	Sigma-Aldrich, St.Louis, MI, USA
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium, gibco® (42430-025)	Life Technologies, Carlsbad California, USA
DMSO- Dimetylsulfoksid, (CH ₃) ₂ SO (D2650)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MI, USA
DTT, ditiotreititol (438117)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MI, USA
Fetal Bovine Serum, sv 30160.03	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
G418 disulfate salt solution (060M0812)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MI, USA
Geit anti-human polyklonalt antistoff mot Caspase-3 (AF-605-NA)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Geit anti-human polyklonalt antistoff mot legumain (AF-2199)	R&D Systems, Minneapolis, USA

Kanin anti-geit polyklonalt, immunoglobulin, P0160	Dako, Glustrup, Danmark
Leu-Leu-OMe, G-25500001	Bachem, Budendorf Sveits
Mus anti-human monoklonalt antistoff mot GAPDH (F0111)	Santa Cruz Biotechnology Inc, Texas, USA
Natriumklorid, NaCl (1.06404.1000)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumpyruvat	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel, Novex® (NP0322)	Life Technologies, Carlsbad California, USA
NuPAGE® Antioxidant, Invitrogen™ (NP0005)	Life Technologies, Carlsbad California, USA
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies, Carlsbad California, USA
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) (NP0001)	Life Technologies, Carlsbad California, USA
Penicillin/Streptomycin (100X) cat nr 15564641	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Ponceau løsning (P71701L)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MI, USA
Precision Plus Protein™ DUAL color	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Restore™ Western Blot Stripping Buffer (21059)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Staurosporin, S 5921	Sigma-Aldrich, St.Louis, MI, USA
Sodium Pyruvate Solution (100mM), cat nr 11501871	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Supersignal® West Dura Extended Duration Substrate (34076)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Tris (base), (T1503)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MI, USA
Trypan blue stain 0,4 % (T10282)	Life Technologies, Carlsbad California, USA

Trypsin-EDTA 0,25%, GIBCO® (25200-056)	Life Technologies, Carlsbad California, USA
Tryptanblått	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tween 20 (170-6531)	Bio-Rad Laboratories Inc
Tørrmelk	Normilk, Levanger, Norge
Z-Ala-Ala-Asn-AMC, legumainsubstrat	Bachem, Budendorf Sveits
Zeocin	Sigma-Aldrich, St.Louis, MI, USA

2.2 Utstyr

BioHit Optifit tip pipettspisser, 10, 200, 1000, 5000 µl	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy; Finland
ECL Semi-dry blotters Blottemaskin	Amersham Biosciences, Storbritannia
Corning 75 cm ² dyrkningsflaske	Corning Incorporated
Corning® sentrifugerør	Corning Incorporated
Costar 96-brønnersbrett. Svart	Corning Incorporated
Costar 96-brønnersbrett, gjennomsiktig	Corning Incorporated
Costar® 5 ml pipette	Corning Incorporated
Costar® 10 ml pipette	Corning Incorporated
Costar® 25 ml pipette	Corning Incorporated

Countess automated cell counter	Invitrogen, Life Technologies
Dri-Block DB-2A	Techne, Storbritannia
Heraeus Fresco 21 Centrifuger	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Holten LaminAir LAF-benk	Medinor, Oslo, Norge
Inkubatorskap- Galaxy 170S	Eppendorf, Connecticut, USA
Molecular Imager® ChemiDoc TM XRS+ with Image Lab™ Software	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Olympus CKX41 Mikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
SUB Aqua 12 vannbad	Grant, Cambridge, England
The Belly Dancer	Stovall Life Science Greensboro, NC, USA
XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Life Technologies, USA

2.3 Cellelinjer, splitting, høsting

2.3.1 HEK293

Human embryonic kidney 293 (HEK293) celler (CRL-1573™, American Type Culture Collection transformert cellelinje med adenovirus type 5 i kromosom 19). Dette gjør at HEK293 har egenskaper til å bli transfektert og produsere genprodukter [39]. HEK cellelinje har vært mye brukt som et verktøy for produksjon av proteiner. Den viktigste egenskapen med HEK293 celler er at de har enkel og rask reproduksjon, gir muligheter til å produsere funksjonelle proteiner, og enkle å vedlikeholde, translasjon og bearbeiding av proteiner [39].

2.3.2 M38L

M38L celler er monoklonale HEK293 celler som er transfektert med humant cDNA for legumain og som derfor overuttrykker legumain [40]. M38L cellene må få antibiotika i celleflasker når cellene dyrkes fordi plasmidet med legumain cDNA er resistensgener og derfor må disse behandles med 160 µl av 50mg/ml Geneticin (G418), alle HEK cellene vil dø, men ikke plasmidet med resistensgen og legumain cDNA.

2.3.3 M4C

M4C er HEK293 monoklonale celler som overtrykker cystatin E/M. Plasmidet som er brukt til transfeksjon er pTracer vektor som inneholder cystatin E/M sDNA og resistensgen. Zeosin dyres sammen med m4c, som tar liv av cellene, men ikke plasmidet som resistensgen. Det er resistensgen mot zeosin i plasmidet, og derfor skal zeosin (15 µM av 100mg/ml) tilsettes når M4C celler dyrkes [40].

2.4 Splitting, telling, utsåing og dyrking av celler til forsøk

HEK293, M38L og M4C celler som var dyrket i dyrkningsflasker splittes når cellene er 80-90 % konfluente. Trypsin 0,25 % tas fra fryseren og tines i badevann ved 37 °C til splitting. Dyrkingsmedium med og uten serum (vedlegg) tas fra kjøleskap til utsåing og splitting.

Dyrkeflaskene tas fra inkubator til celleforsøk. Dyrkingsmedium suges av og kastes, 10 ml DMEM serumfritt medium tilsettes for å skylle cellene i flasken og 2 ml trypsin 0,25 % tilsettes for å løsne celler. Celleflaskene inkuberes i 37 °C i 5 minutter. Når alle cellene er løsnet, tilsettes 10 ml DMEM med serum for å stoppe aktiviteten av trypsin. Cellesuspensjonen suges forsiktig opp og overføres til 50 ml sentrifugerør. Cellesuspensjonen sentrifugeres i 5 minutter ved 800 rpm. Medium/trypsin suges forsiktig av og cellepelletten resuspenderes i 10 ml nytt DMEM medium med serum, og dette skal blandes godt forsiktig.

Et volum på 20 µl av cellesuspensjon blandes med 20 µl trypanblått i et eppendorfrør. Ca. 10 µl av denne blandingen tas ut og cellene telles automatisk i celledetektor (Countess™). Konsentrasjon skal beregnes for å ta ut riktig mengde til celleforsøk. En ml cellesuspensjon sås

ut pr brønn i 6-brønners brett per cellelinje. Cellene inkuberes i 24 timer ved 37 °C og 5 % CO₂.

Resten av celleduspensjonen skal brukes for å dyrke nye celleflasker av hver cellelinje til neste forsøk. Cellene dyrkes i DMEM-medium med serum. M38L celler og M4C celler får antibiotika i celleflaskene. Zeosin 15 µl av 100mg/ml tilsetter M4C celleflaske og G418 160 µl av 50mg/ml tilsetter M38L celleflaske. Celleflaskene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ til neste forsøk. Cellene fikk nytt medium hver 2-3 dager. For å hindre kontaminering ble det benyttet aseptisk teknikk og LAF-benk under hele laboratoriearbeidet.

2.5 Høsting av celler

Cellene i 6-brønners brett høstes slik: medium suges av og kastes eller overføres til merkede eppendorfrør hvis det observeres løse celler. Cellene vaskes med 1 ml 1xPBS, medium suges forsiktig av og kastes. Tilsettes 0,3 ml (brønner med 250.000 celler) eller 0,5 ml (brønner med 500.000 celler) av lysisbuffer med pH 5,8 når legumainaktivitet skal måles (vedlegg) eller RIPA-buffer med pH 7,4 når caspase-3 aktivitet skal måles (vedlegg), og bruk en skrape for å løsne cellene. Deretter overføres cellelysater til merkede eppendorfrør til analyse. Eventuelle eppendorfrør med løse celler i mediet sentrifugeres 800 rpm i 5 minutter, mediet suges forsiktig av og kastes, vaskes med 1 ml 1xPBS. Eppendorfrør sentrifugeres igjen ved 800 rpm i 5 minutter. PBS suges forsiktig av og kastes. Tilsett lysisbuffer eller RIPA-buffer i rør, cellelysater overføres til nye merkede eppendorfrør.

Prøver som er lysert med lysisbuffer fryse-tines ved henholdsvis -70 °C og varmeblokk 30 °C før legumainaktivitet måles. Fryse prøvene ved -70 °C (ca 15 min). Gjenta fryse-tine prosessen 2 ganger før rørene sentrifugeres 10 000 G i 5 minutter. Pipettér av supernatanten og overføres til nye merkede eppendorfrør til analyse.

2.6 Enzymaktivitetsmåling

2.6.1 Caspase-3

Denne metoden er utviklet fra prinsippene gitt av Slagvold [41]. Alle prøvene som har vært lysert med RIPA-buffer må analyseres for caspase-3-aktivitet med en gang fordi caspase-3 tåler ikke frysing, og de lyserte celler inneholder aktiv caspase-3. Prinsippet for metoden er at det brukes en buffer, og peptidsubstrat gjenkjennes av enzymet. Det lages en løsning med RIPA-buffer og tilsettes reduksjonsmiddel (DTT) (vedlegg). Denne måtte lages ny for hver enzymmåling. Reduksjonsmiddel gjør at caspase-3 forblir aktiv når RIPA-buffer er ved pH=7,4. Peptidsubstrat (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) tilsettes brønner med prøve eller blindprøve. Peptidsubstratet spaltes av aktiv caspase-3. Økningen i fluorescens per sekund måles i en mikroplateleser.

Et volum 20 µl av prøvene eller blindprøven fordeles over 96-brønners brett i triplikater. Et volum på 100 µl buffer tilsettes fra autoinjektor, prøvene ristes, så tilsettes 50 µl substrat fra autoinjektor. Caspase-3 aktivitet måles som økning i fluorescens per tidsenhet (sekund). Verdien for blindprøven er ofte negativ, og skal trekkes fra alle målinger. Brettet ble målt 2 ganger og tiden mellom første og andre måling varierte fra 16-20 timer. Denne metoden ble valgt på grunn av biologiske årsaker. Aktiviteten i første måling var så lav, at det var vanskelig å måle noen aktivitet, derfor ble det valgt å vente flere timer for å kunne observere caspase-3 aktivitet. Første måling ble trukket fra siste måling. Differansen mellom første og siste måling (df) ble korrigert for blindprøven, og dividert med antall sekunder mellom første og siste måling. Caspase-3 aktiviteten ble så beregnet i forhold til µg totalprotein (kap. 2.5, høsting av celler) i prøvene.

2.6.2 Legumain

Mikroplatemetode brukes for å måle legumainaktivitet beskrevet av Chen et al [24] og Johansen et al [42]. Hjelpeløsning inneholder legumain assaybuffer med pH 5,8 (vedlegg) og reduksjonsmiddel (DTT) som gjør at cysteinproteasene blir aktive. Substrat tilsettes og økning i fluorescens per tidsenhet måles i en mikroplateleser. Det må gå minst 10 minutter fra tilsetning av reduksjonsmiddel til måling av legumainaktivitet for å sikre aktivisering av legumain[24], [42]. Substratløsningen (vedlegg) ble laget av 200 µl 2,5 mM Z-Ala-Ala-Asn-AMC og 14,5 ml assaybuffer med sluttkonsentrasjon i brønnen 10 µM.

Det pipetteres 20 µl av prøven (cellelysat) eller blindprøven i triplikat i en sort mikroplate. Som oftest kan målingene fra blindprøven bli negative.

Mikroplaten settes i plateleseren i Victor, et volum på 100 µl av legumain hjelpeløsning tilsattes brønnene ved hjelp av autoinjektor nr 1. Deretter tilsettes 50 µl av substratløsning i brønnene ved hjelp av autoinjektor nr 2. Det måles enzymaktivitet som økning i fluorescens.

Slik blir legumainaktivitet målt i de første forsøkene (3.2) i metoden ovenfor. Siden det var svært lavere nivå av legumain i HEK293 og M4C cellelinjene, så blir legumainaktivitet målt på litt annerledes måte i disse. Konklusjonen er at i M38L celler med mye legumain, kan enzymaktivitet måles i løpe av kortere tid enn HEK293 og M4C. Derfor blir det bestemt at de prøvene med M38L cellelinjer skulle måles i 30 minutter. Legumainaktivitet måles i 30 minutter i alle celletyper i de første forsøkene (3.2), men de siste forsøkene (3.5) måles legumainaktivitet i 10 minutter for M38L celler. For HEK293 og M4C ble det målt som start og endepunkt tilsvarende som caspase-3 (2.4.1) aktivitet i de siste (3.5) legumain forsøkene.

2.7 Måling av totalprotein

Totalproteinmåling ble utført etter prosedyren beskrevet av Bradford [43]. Coomassie-fargestoff ble brukt å måle totalprotein i prøvene. Fargestoffet er i en sur løsning som bindes til proteinet, dette gjør at det skjer endringer i absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm. Ved 595 nm måles absorbansen i mikroplateleser.

Standard konsentrasjonsområdet 0-400 µg/ml som var basert på albumin 2000 µg/ml (stock) ble fortynnet i lysisbuffer eller RIPA-buffer. Et volum på 10 µl prøve eller standard i duplikater ble tilsatt i mikroplatebrønner. Fargereagens ble laget ved å fortynne fargeløsning fra Bio-Rad i forhold 1:5 (vedlegg). Et volum på 200 µl fargereagens ble tilsatt alle brønner med cellelysatprøver og standard. Platen settes inn i Viktor og absorbansen måles ved 595 nm. Det brukes en standardkurve av albuminfortynning til å finne totalkonsentrasjon av proteiner i cellelysatprøvene.

2.8 Elektroforese og immunoblotting

Immunoblotting brukes til å identifisere, kvantifisere, separere og bestemme størrelsen på spesifikke proteiner i cellelysaten. I utgangspunktet, gelelektroforese brukes til å skille denaturert proteiner. Proteinene blir deretter overført til en nitrocellulosemembran for deteksjon ved hjelp av antistoffer som er spesifikke for målprotein [44].

Det velges å applisere 9 µg totalprotein i hver brønn på gelen. Dette regnes for hver prøve og uttak av cellelysaten beregnes ved hjelp av totalproteinmålingen (2.5). Det er ønske om å oppkonsentrere prøvene. Dette gjøres ved acetonfelling (vedlegg). Etter at prøven er tørket, løses de i 5 µl LDS 4xsample buffer, 2 µl DTT (0,5 M) (og 13 µl dH₂O, slik at det blir 20 µl totalt. Deretter varmes/kokes prøvene i 10 minutter ved 70 °C. Kokning og buffer fører til denaturering av proteiner slik at proteiner folder seg ut og kan få muligheten til å kunne vandre på gelen. SDS gir proteinene en negativ ladning. DTT fører til mer denaturering av proteiner ved å bryte disulfidbindingene, slik at det blir mulig å separere proteiner etter deres molekylvekt. SDS fortynnes med dH₂O og helles i elektroforesekar (vedlegg). Gelen plasseres i elektroforesekar og 13 µl (9 µg) av prøven og 10 µl av proteinstandard (Precision plus proteiner standarder) appliseres på gelen. Det brukes 4-12 % Bis-Tris gel for legumain og 12 %. Elektroforese settes i gang ved 200 V i ca. 50 minutter. Proteinene separeres fordi SDS har tilført proteinene negativ ladning og dermed vil proteiner vandre etter størrelse med strøm fra minus til pluss gjennom gelen ved forskjellige hastigheter avhengig av molekylvekts størrelse.

Deretter overføres proteiner i gelen til en nitrocellulosemembran og det brukes elektrisk strøm ved 32 mA per gel i 70-80 minutter. Denne metoden kalles elektroblotting og det gjør at proteinene blir tilgjengelig for antistoffpåvisning. Deretter farges gelen med Ponceau for å se at det er proteiner på membran, som kontroll på at proteiner er overført fra gelen til membran.

Membranen blokkeres med fettfri tørrmelk i T-TBS (vedlegg). Membranen blokkeres for å hindre at det skjer interaksjon mellom membran og antistoff. Derfor skal blokkeres ikke-spesifikk binding i 1 time slik at melkeproteiner fester seg på alle steder hvor de målproteiner vi er interessert i ikke har festet, på den måten vil målproteiner ikke blokkeres. Primærantistoff (tabell 2.1), fortynnes i 10 ml melk. Inkuberes over natt på kjølerom med vipping. Dagen etter tilsettes sekundærantistoff (tabell 2.1) som er fortynnet i 2 ml melk og 8 ml T-TBS. Inkuberes 45-60 minutter ved romtemperatur og vipping. Når primærantistoff tilsettes membranen vil antistoff feste på bindingsstedene for det spesifikke proteinet (målproteiner) som skal detekteres og sekundærantistoff bindes spesifikk til det primærantistoff.

Sekundære antistoff som tilsettes har Horseradish Peroxidase (HRP, et enzym) på seg. Ved fremkalling tilsettes en fremkallingsløsning (vedlegg). Fremkallingsløsning inneholder et substrat, HRP enzymet spalter dette substrat og det dannes et lys. Det lyset som kommer fra HRP blir fanget i digitalet kamera, da blir det vist som proteinbånd. Mengde av lyset som dannes, er avhengig av antall målproteiner (legumain, caspase-3). Det er en mål på hvor mye proteiner det er i cellelysater. Vi er interessert å sammenligne ulike cellelysater med forskjellige behandlinger, derfor er det viktig at det er likt mengde proteiner applisert på gelen. Molekylvekten på proteinstandardbåndene ble brukt for finne ut molekylvekten av proteinbåndene for caspase-3 eller legumain.

For deteksjonen av GAPDH ble samme membranene som for caspase-3 og legumain, reblottet og strippet ved å tilsette nytt primær og sekundærantistoff. Membranene ble kvantifisert som ("housekeeping"-kontroller). GAPDH brukes som kontroll på at det er like mye protein i alle celler i brønnene.

Tabell 2.1 Oversikt over antistoffer brukt ved immunoblotting

Protein	Primær antistoff	Fortynning	Sekundær antistoff	Fortynning
Caspase-3	Geit anti-human polyklonalt antistoff mot caspase-3	1:250	Kanin anti-geit immunoglobulin /HRP	1:5000
Legumain	Geit Anti-human polyklonalt antistoff mot legumain.	1:1000	Kanin anti-geit immunoglobulin /HRP	1:5000
GAPDH	Mus anti-human monoklonalt antistoff mot GAPDH	1:30000	Geit anti-mus IgG(H+L)-HRP-konjugat	1:1500

2.9 Statistiske analyser

I denne oppgaven er dataene fra enzymaktivitetsmålinger presentert som gjennomsnitt \pm standardfeil (SEM) eller relativ gjennomsnitt \pm (SEM) sammenlignet med kontroll. Gjennomsnittsverdiene er beregnet fra 2-3 paralleller. Antall forsøk (n) varierer fra 3-4. De statistiske analysene er utført ved hjelp av Graphpad Prism 5 for Windows. Et signifikantsnivå på $p \leq 0,05$ og to-utvalgs t-test (students paired t-test) er brukt som statistisk modell for å undersøke signifikansen mellom de ulike behandlinger i enzymaktivitetsmålinger. Det er også brukt lineær regresjon for å studere enzymaktivitet med økende inkubasjonstid eller økende konsentrasjon av Leu-Leu-OMe i M38L celler, sammenhengen er tilnærmet lineær.

3 Resultater

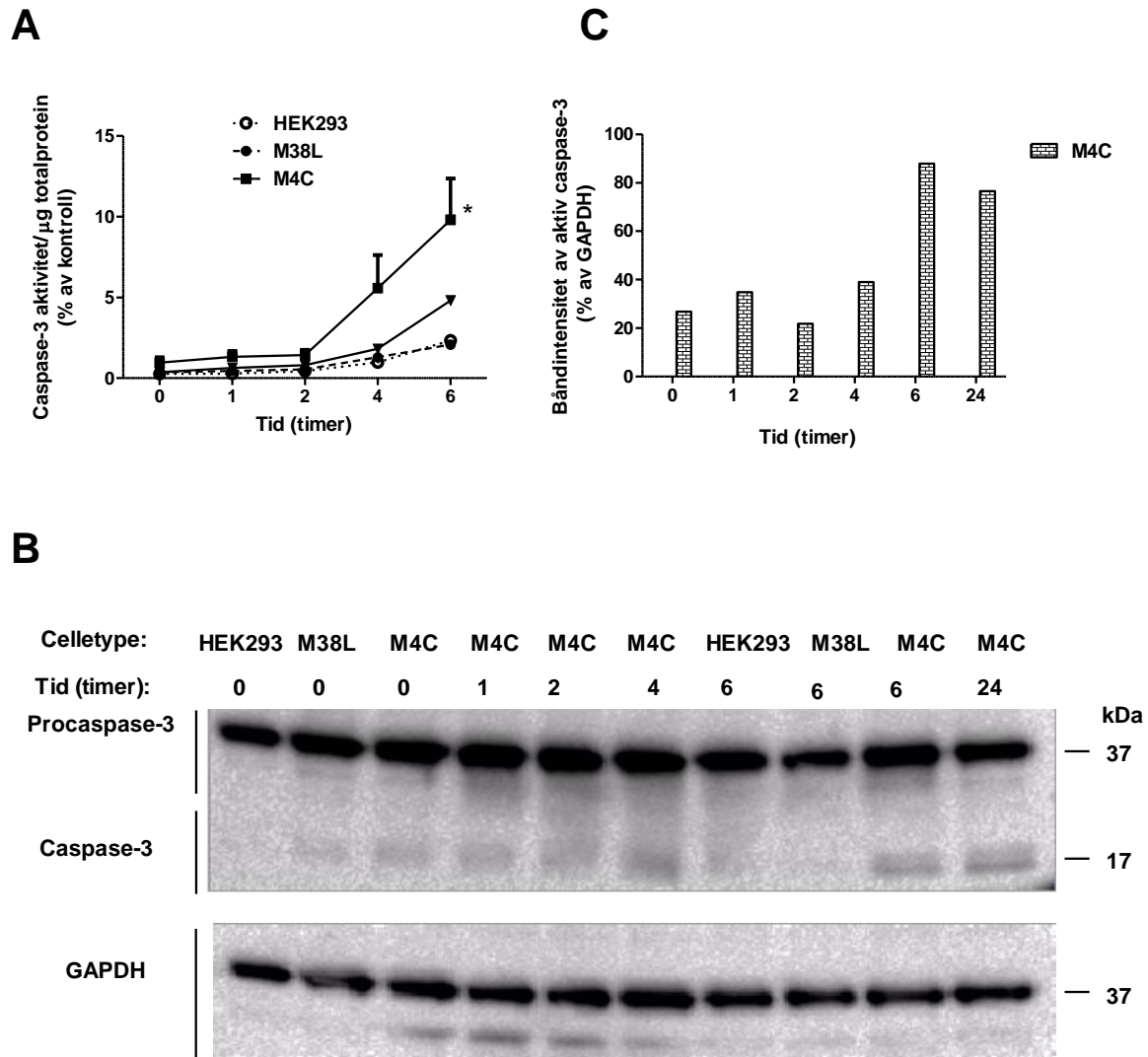
3.1 Staurosporin øker aktiviteten av caspase-3 i M4C-celler

I denne studien ble native HEK293 (kontroll), M38L (overuttrykker legumain) og M4C (overuttrykker cystatin E/M) celler stimulert med eller uten apoptoseinduserende staurosporin (1 μ M) i ulike tidsperioder (0, 1, 2, 4, 6 og 24 timer). Cellene ble høstet i RIPA-buffer og cellelysaten analysert for caspase-3-aktivitet med fluorescerende peptidsubstrat (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) for å undersøke effekten av staurosporin på caspase-3 aktiviteten. Aktiviteten ble beregnet i forhold til μ g totalprotein i prøvene.

Resultatene viste at effekten av staurosporin førte til signifikant økning av caspase-3 aktivitet i M4C celler som overuttrykker cystatin E/M når cellene var stimulert i 6 timer sammenlignet med ustimulerte celler (figur 1A). Det ble observert lav basalaktivitet av caspase-3 i alle celletypene, men høyest i M4C cellene fra 2 timer (figur 1A). I M4C celler er caspase-3 aktivitet økt 9 ganger fra 0 til 6 timer. I HEK293 celler var caspase-3 aktivitet 8 ganger økning fra 0-6 timer. Når det gjelder M38L celle er caspase-3 aktivitet 5 gange økning fra 0-6 timer. En nedgang på 85% caspase-3 aktivitet ble observert i M38L celler etter 6 timer stimulering sammenlignet med M4C celler 6 timer stimulering. Det ble observert 5-6 ganger økning i caspase-3 aktivitet for M4C celler i forhold til caspase-3 aktivitet i 6 timer stimulering med staurosporin for HEK293 og M38L. Etter 24 timers inkubering var derimot caspase-3-aktiviteten redusert i forhold til 6 timer i M4C celler.

Immunoblotting (figur 1B) av cellelysaten viste tilstedeværelse av procaspase-3 på 37 kDa i ustimulerte celler av alle celletypene. Svake bånd for aktiv form av caspase-3 på ca. 17 kDa ble også detektert i ustimulerte M38L og M4C celler. Etter 2 timers stimulering med staurosporin var det forskjell på celletypene og aktiv form av caspase-3 var økt i M4C celler og høyest etter 6 timers inkubering (figur 1B og 1C), men ikke i HEK293 og M38L celler (figur 1B). Stimulering med 1 μ M staurosporin i 6 timer for M38L celler viste derimot fravær av aktiv form for caspase-3 bånd. Blottet ga inntrykk av økt prosessering av procaspase-3 til aktiv form

i M4C med økende inkubasjonstid, og kvantifiseringen av caspase-3 i forhold til de respektive "housekeeping"-kontrollene (GAPDH) bekreftet dette (figur 1C).



Figur 1. Caspase-3 i HEK-cellelinjer etter behandling med staurosporin (1 μ M). Native HEK293-celler, M38L (overutrykker legumain) og M4C (overutrykker cystatin E/M) celler (500.000/brønn) ble sådd ut og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før tilsetning av staurosporin (1 μ M) i 0-24 timer. Cellene ble høstet i RIPA-buffer (pH 7,4) og analysert for caspase-3-aktivitet (A, n=2 for HEK293 og M38L, n=3 for M4C), immunoblotting (B) og kvantifisering av immunobånd (C). Kvantifisering av immunobånd i forhold til GAPDH (C). * indikerer $p < 0,05$, det ble brukt to utvalgs t-test, ikke normaliserte data, sammenlignet mot kontroll i M4C celler.

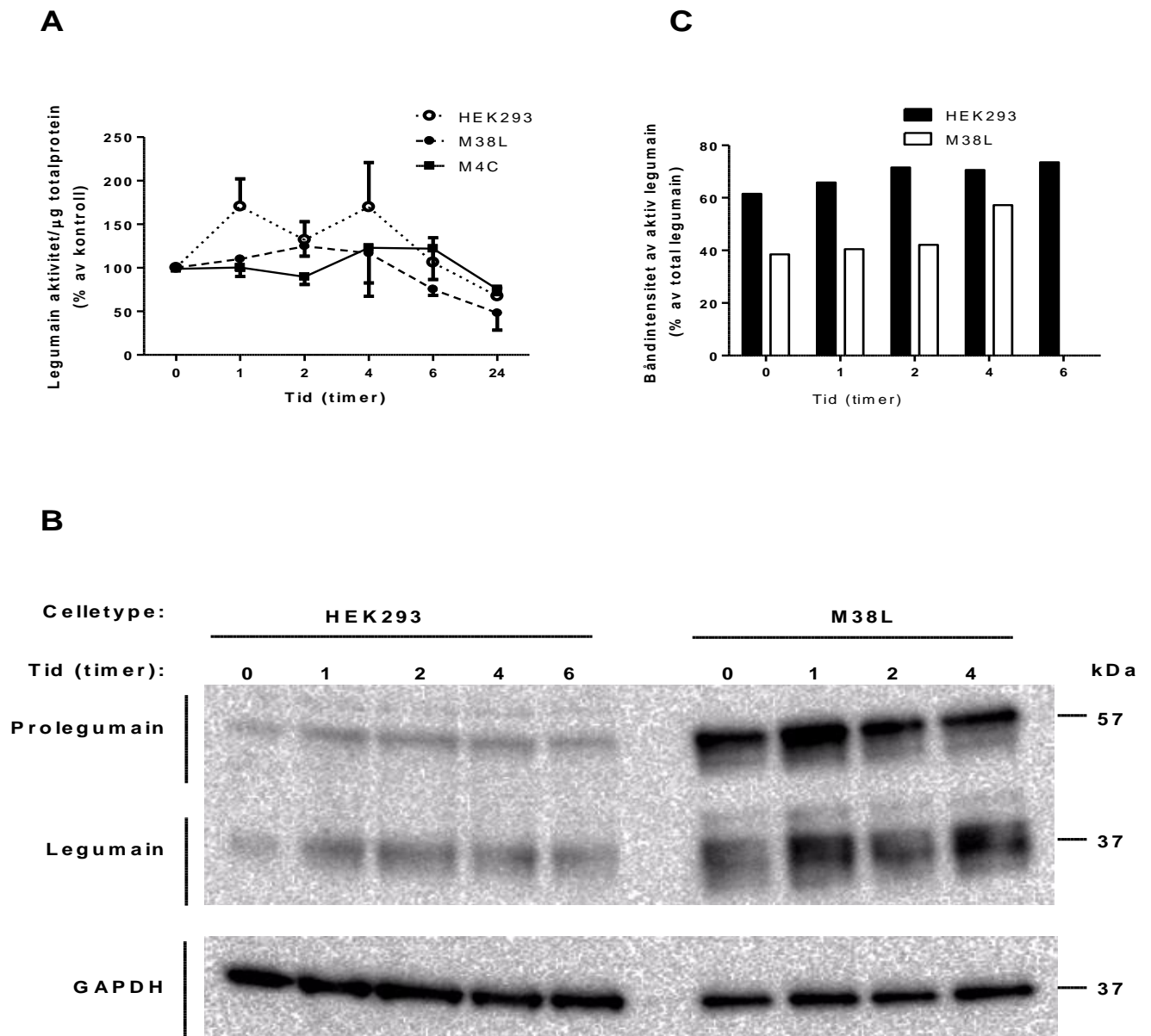
3.2 Staurosporin reduserte aktiviteten av legumain

Tilsvarende forsøk som i 3.1 ble utført på native HEK293, M38L og M4C celler stimulert med og uten staurosporin (1 μ M) i ulike tider. Cellene ble i dette forøket høstet i legumain lysisbuffer og analysert for legumainaktivitet med et fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC) og aktiviteten ble beregnet i forhold til μ g totalprotein i prøvene.

Resultatene viste at aktiviteten av legumain ble ikke noe særlig påvirket etter stimulering med staurosporin (figur 2A). Det ble observert litt reduksjon av legumainaktiviteten etter 24 timer i alle HEK-cellelinjene. Aktiviteten av legumain ble ikke observert i 1, 2, 4 og 6 timer stimulert med staurosporin. Reduksjon med 33 % i legumainaktivitet ble observert i staurosporin-behandlede M38L-celler (overuttrykker legumain) etter 24 timer sammenlignet med ustimulerte celler, men det ble også observert reduksjon av aktivitet av legumain i native HEK293 celle med 53 % og i M4C celler med 25 % etter 24 timer. Reduksjonen var ikke statistisk signifikant fra 0-24 timer på legumainaktivitet i M38L, HEK293 og M4C celler.

Cellenes morfologi ble studert ved lysmikroskopi under inkuberingen og viste at morfologien var tydelig endret i alle celletypene etter behandling med staurosporin i 24 timer med flere løse celler og mer runde celler sammenlignet med celler uten behandling.

Immunoblotting ble utført for å undersøke molekylvektformene av legumain i cellelysate. Det ble observert tilstedeværelse av både ferdig prosessert legumain (36 kDa) og prolegumain (56 kDa) (figur 2B). Begge molekylvektformene ble detektert i native HEK293 og i M38L celler, og proteinnivået reflekterte legumainaktivitetsnivået i cellene. Svake proteinbånd for legumain intermediatformer (46/47 kDa) ble også observert i M38L cellene. Kvantifisering av båndene viste en økende prosessering av prolegumain (56 kDa) til aktiv legumain (36 kDa) (figur 2C).



Figur 2. Legumain i HEK-cellelinjer over tid etter tilsetning av staurosporin ($1 \mu\text{M}$). Native HEK293, M38L (overutrykker legumain) og M4C (overutrykker cystatin E/M) celler (250.000/brønn) ble sådd ut og inkubert i 24 timer ved 37°C og $5\% \text{CO}_2$ før tilsetning av staurosporin ($1 \mu\text{M}$) i 0-24 timer. Cellelysaten ble høstet i lysisbuffer (pH 5,8) og analysert for legumainaktivitet (A, $n=3$), immunoblotting (B, HEK293 og M38L, $n=1$) og kvantifisering av legumain immunobånd (C). GAPDH ble brukt som kontroll (B). Figuren (A) viser normaliserte gjennomsnittsverdier \pm SEM i forhold til ubehandlede kontrollceller (A, $n=3$). Det ble brukt To-utvalgs t-test men viste ingen signifikante forskjeller mellom ulike tider i alle cellypene.

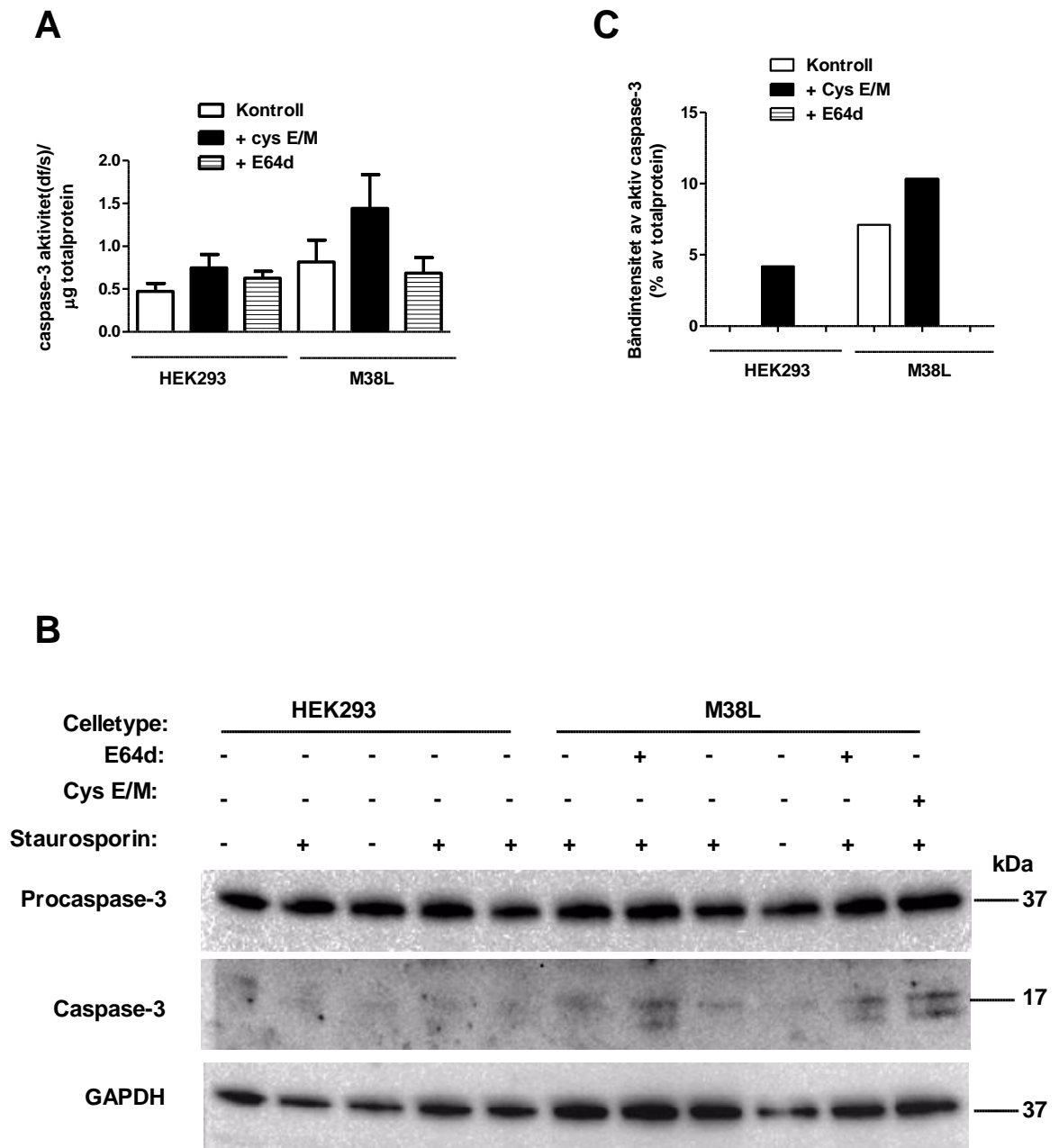
3.3 Inhibisjon av caspase-3-aktivitet i HEK-cellelinjer stimulert med 1 μ M staurosporin i 4 timer

Cysteinproteasehemmere som ble valgt til dette forsøket var cystatin E/M som hemmer legumain primært [40], og E64d som hemmer cathepsiner [38]. For å undersøke effekten av disse cysteinproteasehemmere med hensyn på caspase-3-aktivitet, ble denne studien utført på native HEK293 og M38L celler. Cellene ble forbehandlet med cystatin E/M (50 % M4C-kondisjonert medium) eller E64d (10 μ M) i 24 timer før stimulering med staurosporin (1 μ M) i 4 timer. I tillegg til celler som ble tilsatt inhibitorer, ble det også utført prøver med DMSO (som kontroll for E64d) og prøver som ble tilsatt HEK293 kondisjonert medium (som kontroll for cystatin E/M) i både HEK293 og M38L celler. Disse prøvene ble også stimulert med staurosporin som deretter ble prøvene sammenlignet med prøver tilsatt inhibitorer. Disse cellene høstet og overført til nye eppendorfrør, og caspase-3 aktivitet og immunoblotting ble utført. Caspase-3 aktivitetsmålingene i celler med DMSO og HEK293 kondisjonert medium stimulert med staurosporin ga samme resultater som for celler med bare staurosporin. Derfor ble det valgt å bruke enzymaktivitetsmålingene for prøver med bare staurosporin som kontroll for sammenligne med HEK293 og M38L tilsatt E64d eller cystatin E/M.

Cellene ble i dette forsøket høstet i RIPA-buffer og analysert for caspase-3-aktivitet med et fluorescerende peptidsubstrat (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) og aktiviteten ble beregnet i forhold til μ g totalprotein i prøvene.

Resultatene viste at caspase-3-aktivitet var på 1,6 ganger økning i celler stimulerte med staurosporin som var tilsatt cystatin E/M, sammenlignet med celler uten cystatin E/M stimulert staurosporin alene i M38L celler og HEK293 celler (figur 3A). Caspase-3 aktivitet ble ikke påvirket i HEK293 og M38L celler som fikk E64d sammenlignet med celler som bare fikk staurosporin (figur 3A).

Immunoblotting (figur 3B) viste procaspase-3 på 37 kDa i både HEK293 og M38L celler. Tilstedeværelse av aktiv form av caspase-3 på ca. 17 kDa var tilstede i både HEK293 og M38L celler som fikk cystatin E/M, men aktiv caspase-3 var ikke detektert i HEK293 ustimulerte celler. Det var ikke vist aktiv form av caspase-3 i noen av cellene behandlet med E64d.



Figur 3. Caspase-3 i HEK-cellelinjer etter forbehandling med cystatin E/M eller E64d før stimulering med staurosporin. Native HEK293 og M38L (overuttrykker legumain) celler (500.000/brønn) ble sådd ut og behandlet med eller uten (kontroll) cystatin E/M (50 % M4C-kondisjonert medium) eller E64d (10 µM) i 24 timer før tilsetning av staurosporin (1 µM) i 4 timer. Cellelysat ble høstet og analysert for caspase-3 ved aktivitet (A), immunoblotting (B) og kvantifisering av immunobånd (C). Kontrollcellene for M38L og HEK293 ble forbehandlet med DMSO eller HEK293 kondisjonert medium før stimulering med staurosporin. Det ble applisert 9 µg totalprotein av cellelysaten ved elektroforese og immunoblotting (B).

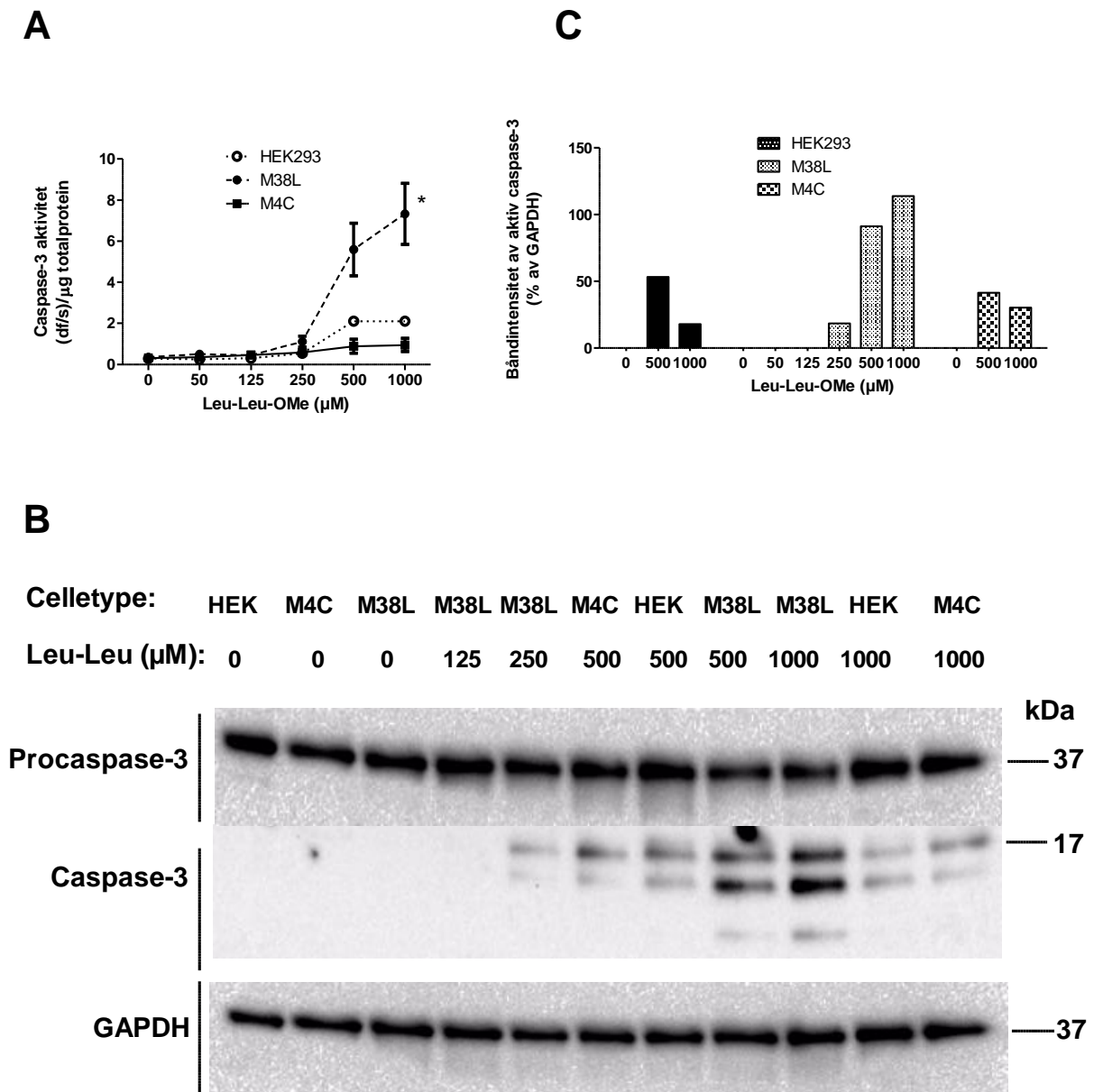
3.4 Leu-Leu-OMe øker caspase-3-aktivitet i M38L celler

Dette forsøket ble utført tilsvarende som 3.1 på native HEK293, M38L og M4C celler, men stimulert med Leu-Leu-OMe som apoptose induser. For å studere effekten av Leu-Leu-OMe på caspase-3 aktivitet ble det utført både doserespons- og tidsresponsforsøk. Effekten av Leu-Leu-OMe på caspase-3 er ikke tidligere studert i HEK-cellelinjer. Cellene ble sådd ut 24 timer før tilsetning av Leu-Leu-OMe (500 μM) i 0-24 timer (tidsrespons). For doseresponsforsøkene ble cellene stimulert med ulike konsentrasjoner av Leu-Leu-OMe (0, 50, 125, 250, 500, og 1000 μM) i 4 timer. Cellene ble høstet i RIPA-buffer og lysatene analysert for caspase-3-aktivitet med et fluorescerende peptidsubstrat (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) og aktiviteten ble beregnet i forhold til μg totalprotein i prøvene.

Resultatene på doseresponsen viste en doseavhengig økning i caspase-3 aktivitet etter 4 timers inkubering med økende konsentrasjon av Leu-Leu-OMe i M38L celler (figur 4A). Caspase-3 aktivitet var signifikant høyere i M38L celler med 1000 μM sammenlignet med ustimulerte celler. Aktiviteten i caspase-3 økning var 3,5-7 ganger høyere i M38L sammenlignet med M4C og HEK293 celler stimulert med 1000 μM Leu-Leu-OMe (figur 4A). Aktivering av caspase-3 var observert når konsentrasjonen var over 125 μM i M38L celler. Caspase-3 aktivitet var økt med 20 ganger i M38L celler som fikk 1000 μM og 15 gangers økning i celler som fikk 500 μM sammenlignet med ustimulerte celler. For HEK293 og M4C var aktiviteten observert etter 250 μM stimulert sammenlignet med celler uten stimulering, men mye lavere aktivitet sammenlignet med M38L celler. Det er lineær sammenheng mellom aktivitet og dose.

Immunoblotting av M38L celler med 250, 500 og 1000 μM av Leu-Leu-OMe viste tilstedeværelse av både procaspase-3 (37 kDa) og aktiv form av caspase-3 (17 kDa, og lavere kDa) (figur 4B). Det ble observert bånd for aktiv form for caspase-3 med 500 μM og 1000 μM i HEK293 og M4C celler. Det ble også observert bånd for procaspase-3 i alle cellelysater. Det ble observert høyere prosessering av procaspase-3 (37 kDa) til aktiv caspase-3 (17 kDa) i M38L stimulert med 500 og 1000 μM sammenlignet med HEK293 og M4C med samme konsentrasjon. Alle celletyper uten stimulering av Leu-Leu-OMe viste derimot fravær av aktiv

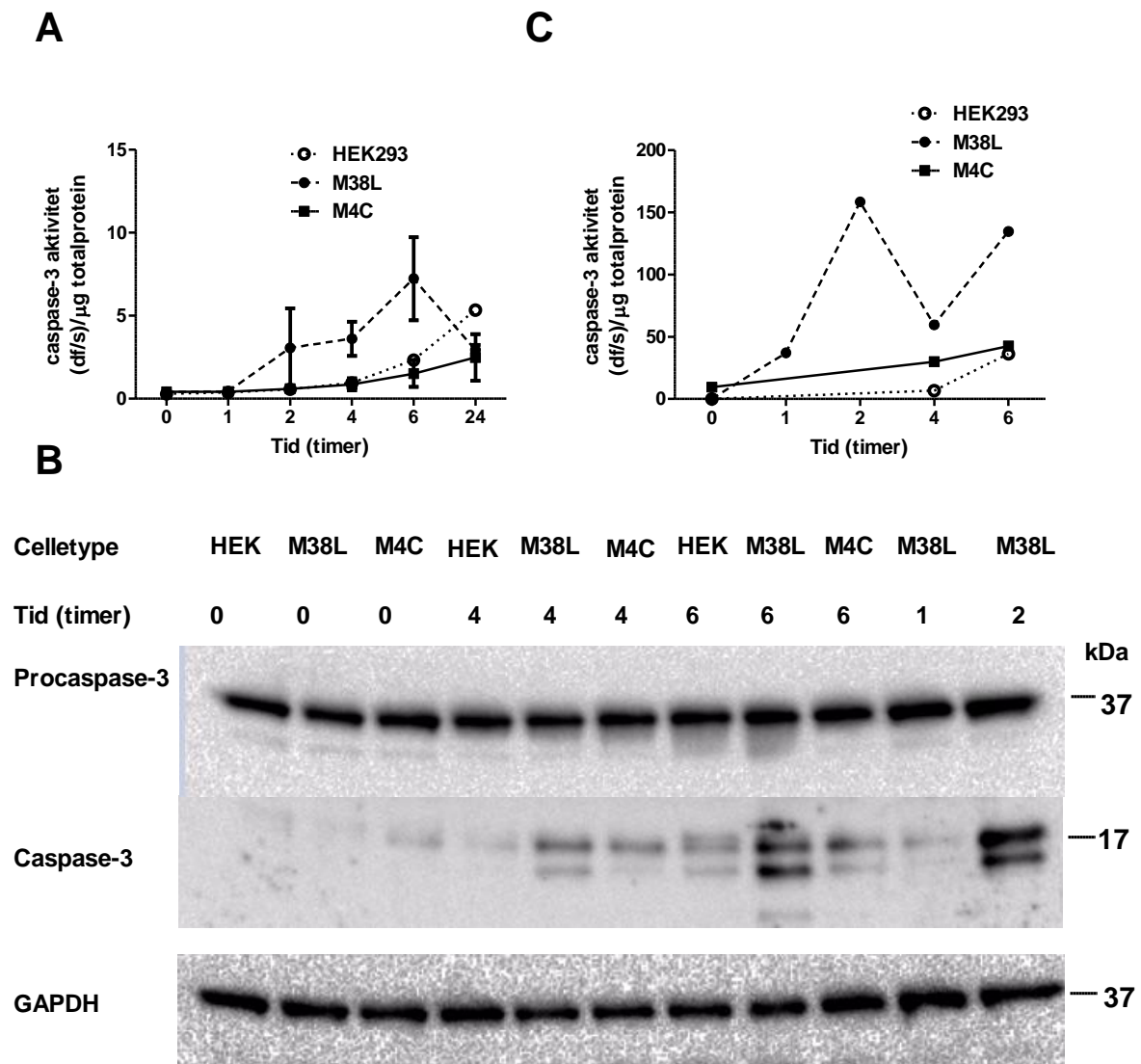
form for caspase-3 aktivitet. Disse funnene er i samsvarende med caspase-3 aktivitetmålingene (figur 4A). Kvantifisering av caspase-3 båndene i forhold til GAPDH er vist i figur 4C.



Figur 4. Caspase-3 i HEK-cellelinjer etter behandling med Leu-Leu-OMe i ulike konsentrasjoner i 4 timer. Native HEK293, M38L (overutrykker legumain) og M4C (overutrykker cystatin E/M) celler (500.000/brønn) ble sådd ut og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før tilsetning av Leu-Leu-OMe (0, 50, 125, 250, 500, 1000 µM) i 4 timer. Cellelysaterne ble høstet i RIPA-buffert (pH 7,4) og analysert for caspase-3-aktivitet (A, n=3), immunoblotting (B, n=1) og kvantifisering av immunobånd i forhold til GAPDH (C). GAPDH ble brukt som kontroll (B). * indikerer p < 0,05, det er brukt to utvalgs t-test, ikke normaliserte data, sammenlignet mot kontroll i M38L celler.

Tidsresponsstudiet med 500 μ M Leu-Leu-OMe på HEK293, M38L og M4C celler i 0, 1, 2, 4, 6 og 24 timer viste økende caspase-3 aktivitet i M38L celler (figur 5A). Allerede etter 1 timers stimulering var det høyere caspase-3-aktivitet i M38L celler sammenlignet med HEK293 og M4C. Etter 6 timer var det 16 gangers økning av caspase-3 aktivitet i M38L celler sammenlignet med 1 timers stimulering. Etter 6 timer stimulering var caspase-3 aktivitet 4-11 ganger høyere i M38L sammenlignet med HEK293 og M4C celler. Det var ingen forskjell mellom HEK293 og M4C i caspase-3 aktivitet de 6 første timene etter stimulering, men det kan tyde på at det var høyere caspase-3 aktivitet i HEK293 celler fra 6 til 24 timer, men ikke signifikant forskjell. Etter behandling i 24 timer med Leu-Leu-OMe (500 μ M) var gjennomsnittlig caspase-3-aktivitet på same nivå som etter 2 timers behandling i M38L.

Målingen av caspase-3 aktivitet var i samsvar med immunoblotting (figur 5B). Det ble observert bånd for aktiv form for caspase-3 i M38L celler som var stimulert i 2, 4, og 6 timer. Det ble vist et svakt bånd i celler stimulert i 1 time. Svake båndet for aktiv caspase-3 var også detektert i HEK293 og M4C celler etter 4 og 6 timers stimulering. I caspase-3 aktivitets målinger var det økende caspase-3 aktivitet med økende inkubasjonstid med Leu-Leu-OMe, men kvantifisering av båndene viste liten forskjell i økning av caspase-3 aktiv form i M38L celler etter økende inkubasjonstid med Leu-Leu-OMe. I HEK293 og M4C var dette i samsvar med aktivitetsmålingene, og figur 5C viser at det er større båndintensitet av aktiv form for caspase-3 etter 6 timer. Kvantifisering av caspase-3 båndene var i totalproteinet (figur 5C).



Figur 5. Caspase-3 i HEK-cellelinjer etter behandling med Leu-Leu-OMe (500 μ M) i ulike tider. Native HEK293, M38L (overutrykker legumain) og M4C (overutrykker cystatin E/M) celler (500.000/brønn) ble sådd ut og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før tilsetning av Leu-Leu-OMe (500 μ M) i 0-24 timer. Cellelysaten ble høstet i RIPA-buffert (pH 7,4) og analysert for caspase-3 aktivitet (A, n=3), immunoblotting (B, n=1) og kvantifisering av immunobånd (C).

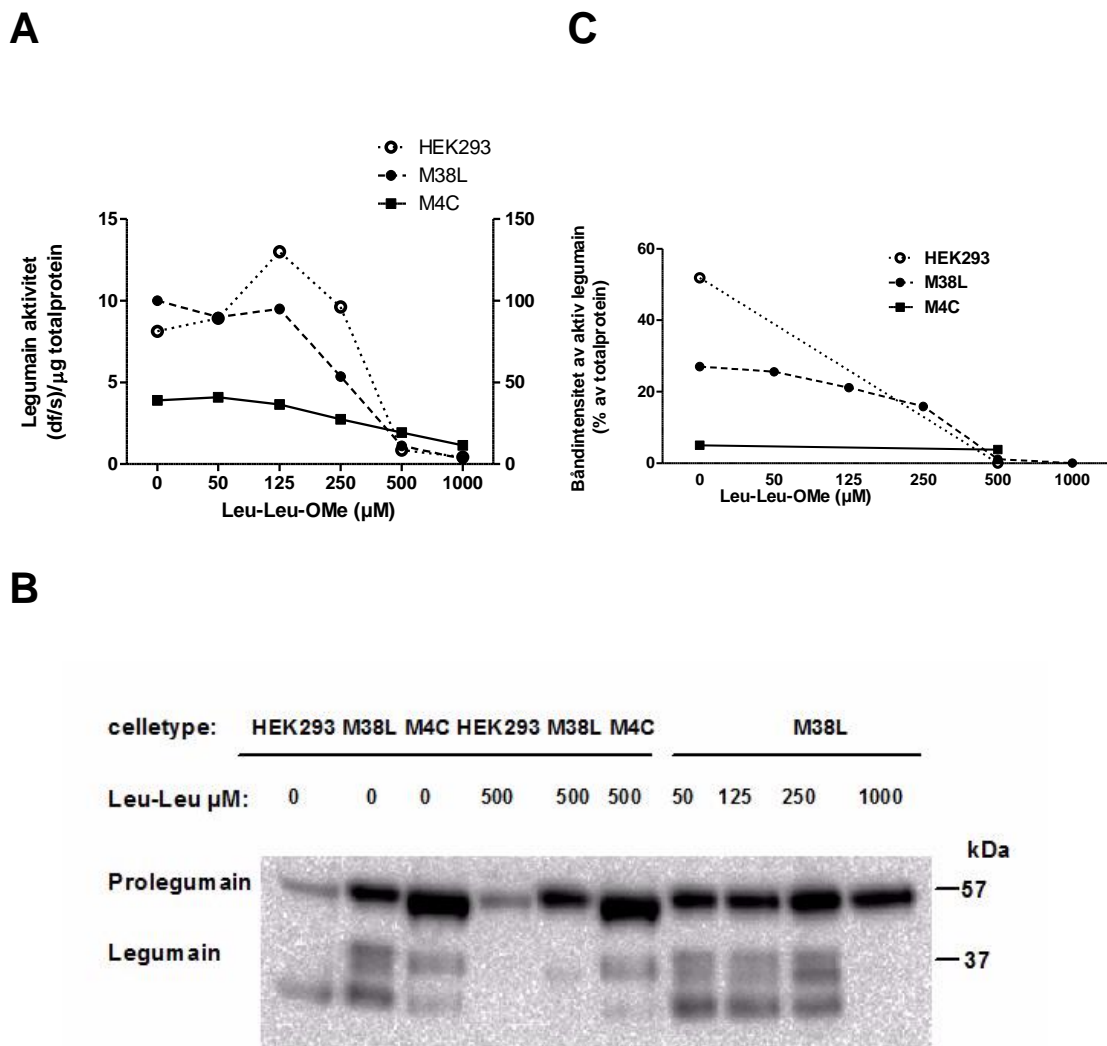
3.5 Leu-Leu-OMe reduserer legumainaktivitet i HEK-celler

Forsøket er utført tilsvarende som 3.4 stimulert med Leu-Leu-OMe. For å studere effekten av Leu-Leu-OMe på legumainaktiviteten ble det utført som doserespons og tidsrespons. Dette forsøket var utført på native HEK293, M38L og M4C celler.

I doseresponsforsøket ble det valgt å stimulere alle celletyper i ulike konsentrasjoner av Leu-Leu-OMe (0, 50, 125, 250, 500 og 1000 μM) i 1 time. Cellelysaten ble høstet i legumain lysisbuffer og analysert for enzymaktivitet med et fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC). Aktiviteten ble beregnet i forhold til μg totalprotein i prøvene.

Resultatene i dette forsøket viste at Leu-Leu-OMe reduserte legumainaktivitet i alle celletypene (figur 6A). Legumainaktiviteten begynte å redusere i alle celler med Leu-Leu-OMe i disse konsentrasjonene (250, 500 og 1000 μM) i alle celletyper. M4C celler var minst påvirket, men det begynte å redusere etter stimulering med 500 μM og 1000 μM .

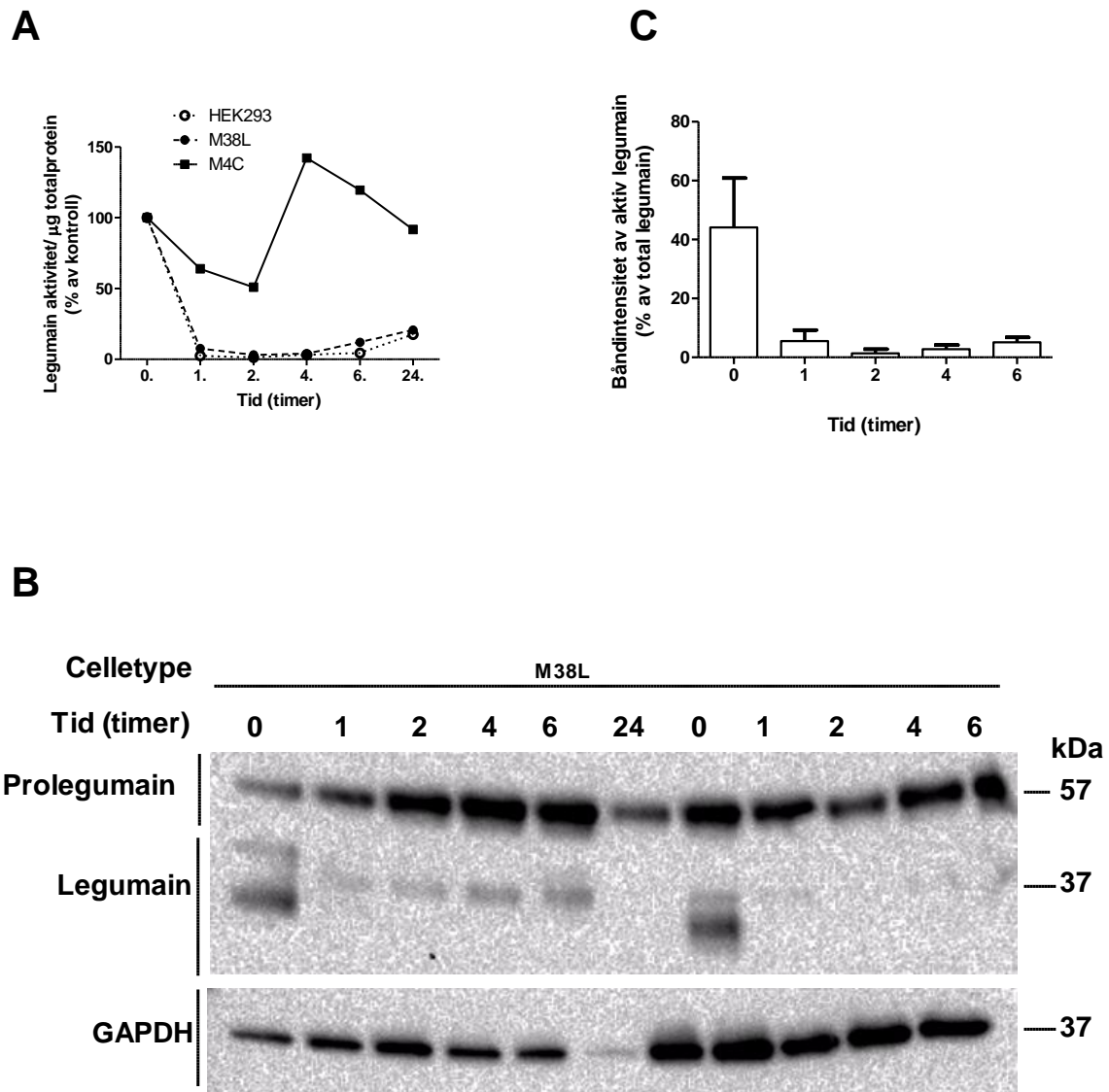
Immunoblotting (figur 6B) viste tilstedeværelse av aktiv form for legumain i alle ustimulerte celler. Det var også vist bånd for aktiv form for legumain i celler som var stimulert med Leu-Leu-OMe, men legumainbåndet var størst i celler med lave konsentrasjoner av Leu-Leu-OMe. Det ble vist bånd for prolegumain med 57 kDa i M38L celle stimulert med 1000 μM , men ingen bånd for aktiv form for legumain med 36 kDa i disse cellene. Kvantifisering av legumain båndet er i forhold til total legumain (prolegumain og aktiv form for legumain). Kvantifiseringen viste en tendens til redusert mengde av aktiv form for legumain av M38L og HEK293 celler med høye konsentrasjoner av Leu-Leu-OMe.



Figur 6. Legumain i HEK-cellelinjer etter behandling med ulike konsentrasjoner av Leu-Leu-OMe i 1 time. Native HEK293, M38L (overutrykker legumain) og M4C (overutrykker cystatin E/M) celler (500.000/brønn) ble sådd ut og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før tilsetning av Leu-Leu-OMe (0, 50, 125, 250, 500, 1000 µM) i 1 time. Cellelysaten ble høstet i lysisbuffer (pH 5,8) og analysert for legumainaktivitet (A, n=3), immunoblotting (B, n=1) og kvantifisering av immunobånd (C). For M38L celler er det normaliserte gjennomsnittsverdier ± SEM i forhold til ubehandlede kontrollceller (A, n=3).

Tidsrespons ble også utført med alle celletyper for å studere legumainaktivitet etter stimulering med Leu-Leu-OMe (500 µM) i ulike tider (0, 1, 2, 4, 6, og 24 timer). Reduksjonen varierte litt mellom ulike tider i alle celletypene (figur 7A).

Immunoblotting for å detektere uttrykk for legumain i M38L celler ble utført i prøver fra to identiske forsøk på samme gel. Immunoblotting viste at resultatene er i samsvar med legumainaktivitetsmålingene (figur 7B). Prosessering av prolegumain til aktiv legumain viste å være mindre med Leu-Leu-OMe stimulert i mer enn 2 timer ved kvantifisering i M38L celler (figur 7C). Kvantifiseringen viser prosesseringen av prolegumain til aktiv legumain så ut til å være mindre ved tilstedeværelse av Leu-Leu-OMe, noe som immunoblottet viste det samme, båndvolumene for aktiv form for legumain er større i ustimulerte celler sammenlignet med stimulerede celler.

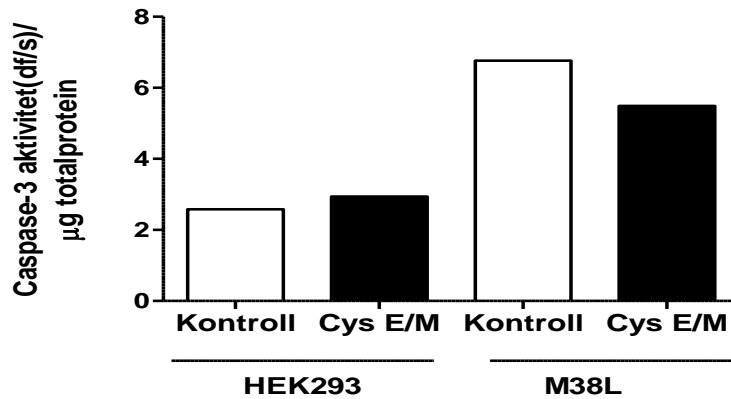
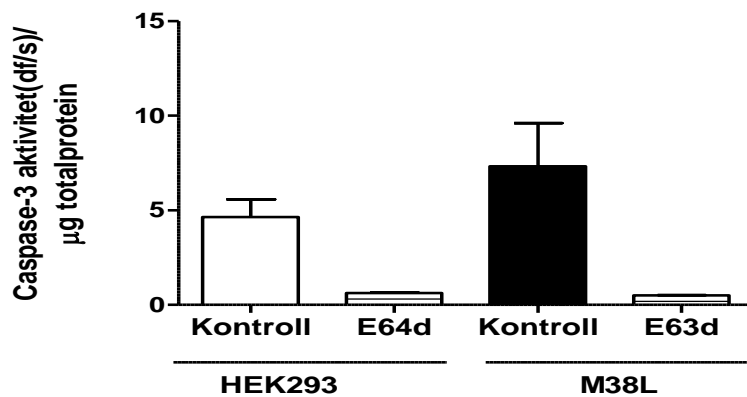


Figur 7. Legumain i HEK-cellelinjer etter behandling med Leu-Leu-OMe (500 µM) i ulike tider. Native HEK293, M38L (overutrykker legumain) og M4C (overutrykker cystatin E/M) celler (500.000/brønn) ble sådd ut og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før tilsetning av Leu-Leu-OMe 500 µM i 0-24 timer. Cellelysaten ble høstet i lysisbuffer (pH 5,8) og analysert for legumainaktivitet (A, n=3), immunoblotting (B, n=1) og kvantifisering av immunobånd (C). GAPDH ble brukt som kontroll (B).

3.6 Inhibisjon av caspase-3 aktivitet i HEK-cellelinjer stimulert Leu-Leu-OMe 500 μ M

Inhibitorer som ble valgt til dette forsøket var cystatin E/M og E64d. Forsøket ble utført på native HEK293 og M38L celler for å studere sammenhengen mellom inhibitorer, legumain, cathepsiner og caspase-3. Cellene ble forbehandlet med cystatin E/M og E64d før stimulering med Leu-Leu-OMe (500 μ M) i 4 timer. Cellene ble i dette forsøket høstet i RIPA-buffert og analysert for caspase-3-aktivitet med et fluorescerende peptidsubstrat (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) og aktiviteten ble beregnet i forhold til μ g totalprotein i prøvene. Det ble også utført prøver med tilsatt DMSO (som kontroll for E64d) og prøver som ble tilsatt HEK293 kondisjonert medium (som kontroll for cystatin E/M) på både HEK293 og M38L celler. Disse prøvene ble også stimulert med staurosporin som deretter ble prøvene sammenlignet med prøver tilsatt inhibitorer. Disse cellene høstet og overført til nye eppendorfrør, og caspase-3 aktivitet og immunoblotting ble utført. Caspase-3 aktivitetsmålingene i celler med DMSO og HEK293 kondisjonert medium stimulert med staurosporin ga samme resultater som for celler med bare staurosporin. Derfor ble det valgt å bruke celler med bare staurosporin som kontroll for HEK293 og M38L tilsatt E64d eller cystatin E/M.

Caspase-3 aktivitet HEK293 celler som fikk tilsatt cystatin E/M stimulert med Leu-Leu-OMe (500 μ M) (figur 8A) var ikke så mye påvirket sammenlignet med celler som fikk bare Leu-Leu-OMe. Det var observert reduksjon med 19 % av caspase-3 aktivitet i M38L celler tilsatt cystatin E/M sammenlignet med celler uten cystatin E/M. Men denne forskjellen på caspase-3 aktivitet er ikke signifikant forskjell sammenlignet med celler uten cystatin E/M. Resultatene viste at E64d hemmet caspase-3 aktivitet (figur 8B) i begge celletypene. Graden av redusert caspase-3 aktivitet var 89 % i HEK293 og 93 % i M38L celler sammenlignet med celler uten E64d.

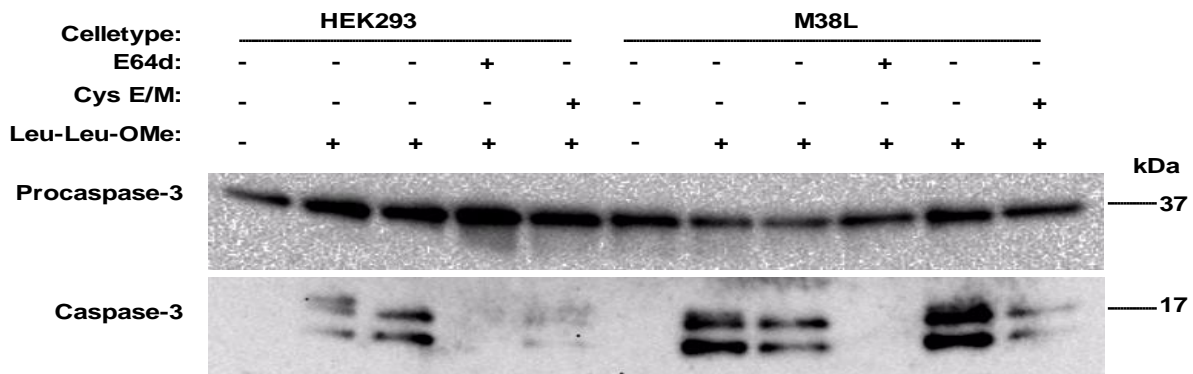
A**B**

Figur 8. Caspase-3-aktivitet i HEK-cellelinjer etter forbehandling med cystatin E/M (A) eller E64d (B) før stimulering med Leu-Leu-OMe (500 µM). Native HEK293 og M38L (overuttrykker legumain) celler (500.000/brønn) ble sådd ut og behandlet med eller uten (kontroll) cystatin E/M (50 % M4C-kondisjonert medium; A) og E64d (10 µM, B) i 24 timer før tilsetning av Leu-Leu-OMe (500 µM) i 4 timer. Cellelysat ble høstet i RIPA-buffer (pH 7,4) og analysert for caspase-3 aktivitet.

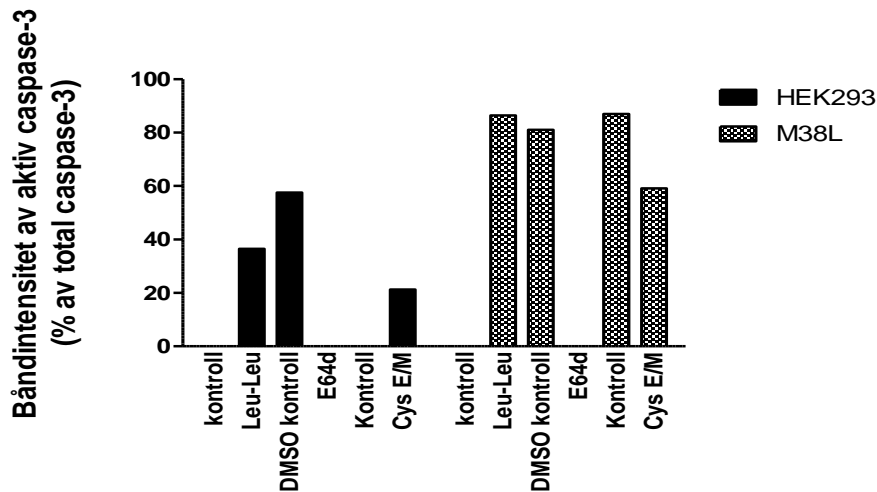
Resultatene på immunoblotting (figur 9A) viste at det var bånd for caspase-3 behandlet med DMSO eller bare Leu-Leu-OMe 500 µM, men det var ikke bånd for aktiv form av caspase-3 i både HEK293 og M38L celler som fikk E64d. Det ble observert uttrykk for aktiv form av

caspase-3 i HEK293 og M38L celler forbehandlet med cystatin E/M og celler uten cystatin E/M. Caspase-3 i celler tilsatt cystatin E/M var litt lavere sammenlignet med celler uten tilsatt cystatin E/M i HEK293. I M38L celler var det observert aktiv bånd for caspase-3 i både celler med cystatin E/M stimulert med Leu-Leu-OMe og celler som var bare stimulert med Leu-Leu-OMe, prosesseringen av procaspase-3 til aktiv var ganske lik i disse cellene (figur 9B).

A



B



Figur 9. Caspase-3 i HEK-cellelinjer etter forbehandling med cystatin E/M eller E64d og stimulering med Leu-Leu-OMe (500 μ M). Native HEK293 og M38L (overuttrykker legumain) celler (500.000/brønn) ble sådd ut og behandlet med eller uten (kontroll) cystatin E/M (50 % M4C-kondisjonert medium) eller E64d i 24 timer før tilsetning av Leu-Leu-OMe (500 μ M) i 4 timer. Cellysate ble høstet i RIPA-buffer (pH 7,4) og analysert for caspase-3 ved immunoblotting (A, $n=1$), og kvantifisering av immunobånd (B). Kontrollcellene for M38L og HEK293 ble forbehandlet med DMSO eller HEK293 kondisjonert medium før stimulering med staurosporin. Det ble applisert 9 μ g totalprotein av cellysaten ved elektroforese og immunoblotting.

4 Diskusjon

Apoptose er en nødvendig prosess for å opprettholde homeostase i multicellulære organismer. I denne oppgaven ble det studert om legumain spiller noen rolle i apoptose. Bakgrunnen for dette er at det er fortsatt usikkerhet om legumain fremmer eller hemmer apoptose. Det er ikke studert tidligere om sammenhengen mellom legumain og caspase-3 i apoptose. En studie fra 2008 har vist at legumain spalter og inaktiverer caspaser [45]. Dette betyr at legumain motvirker apoptose. En annen studie fra samme år har vist at legumain er involvert i apoptose, altså fremmer apoptose [46]. Legumain er også vist å ha tilknytning til utvikling av Alzheimer sykdom [47]. Legumain er et inaktivt proenzym ved nøytral pH og blir aktiv ved sur pH i lysosomer [48]. En hypotese går ut på at legumain frigjøres fra lysosomer til cytosol, og dermed kan utøve sin proteolytiske effekt på caspase-3 og/eller cathepsiner som direkte eller indirekte fremmer celledød [49]. For å undersøke betydningen av legumain for caspase-3 aktivitet, ble det utført forsøk hvor effekten av staurosporin eller Leu-Leu-OMe på legumain og caspase-3 aktivitet ble studert i HEK293, M38L (overutrykker legumain) og M4C (overutrykker cystatin E/M) celler og dermed undersøke sammenhengen mellom legumain og caspase-3. Videre var det også interessant å undersøke om hemming av cysteinproteaser ved cystatin E/M eller E64d påvirket caspase-3-aktiviteten i HEK293 og M38L cellene.

4.1 Valg av cellemodeller

I denne oppgaven er det brukt 3 celletyper: HEK293 (normale kontrollceller), M38L (overutrykker legumain) og M4C (overutrykker cystatin E/M) celler. M38L er celler som frigjør mye legumain til mediet og er en velegnet cellemodell for å undersøke effekten av legumainaktivitet. M4C celler produserer mye cystatin E/M som vil kunne hemme aktiv legumain. M4C celler ble valgt for å undersøke sammenhengen mellom cystatin E/M, legumain og caspase-3, og videre sammenligne dette med M38L celler [40].

I caspase-3 aktivitetmålingene ble det brukt RIPA-buffer, tilsatt DTT som er reduksjonsmiddel. Videre tilsettes et peptidsubstrat (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) som fluorescerer når det spaltes av caspase-3, og denne fluorescensen måles. I første målingene ble det valgt å måle kinetikk i 30 minutter, det var vanskelig å tolke resultatene fordi det var ikke målbar aktivitet i løpe av så kort tid og derfor måtte metoden videreutvikles og det ble valgt å

måle fluorescens første gang rett etter at bufferen og substrat var tilsatt, og så ble det målt annen gang etter 16-20 timer. Ved denne målemetoden ble det observert caspase-3 aktivitet. Denne metoden ble utviklet og brukt for cellelysater fra alle celletyper.

Det var interessant å finne ut om caspase-3 aktivitet tåler frysing. Cellelysatene som var høstet i RIPA-buffer ble først analysert for enzymaktivitetsmåling, så ble prøvene oppbevart ved -18 °C i 2-3 dager. Caspase-3 aktivitet ble deretter målt på nytt i alle HEK-cellelinjer, og det ble observert at cellene mister 50 % av caspase-3 aktivitet etter frysing sammenlignet med målingene rett etter lysering av cellene og før frysing. Derfor måtte caspase-3 aktivitet måles med en gang etter høsting av hvert celleforsøk.

4.2 Staurosporin øker Caspase-3 aktiviteten i M4C-celler

Staurosporin induserer apoptose i mange celletyper via caspase-avhengig og caspase-uavhengig mekanismer [50]. En studie har vist effekten av staurosporin på permeabiliteten av lysosomene i human fibroblaster [51]. Videre er det rapportert i denne studie at etter staurosporin behandling ble det vist tilstedeværelse av Bax «bcl2-associated X protein» i lysosomal membran. Denne studie viste videre at Bax har induisert frigjøring av cathepsin D og B fra lysosomer til cytosol. Enzymaktivitetsmålingene har vist økt cathepsin D og B aktivitet som forårsaker apoptose [51].

Caspase-3 spiller en sentral rolle i apoptose, i de fasene hvor det er morfologiske endringer, vesikler/blemmer dannes på membranen «membrane blebbing» at celler blir til flere deler, cellekrymping og kondensering av kromatin. Metoden for å påvise dette er ikke studert i denne oppgaven. For å kunne være sikkert at på at det skjer apoptose, kreves det å utføre flere analysemetoder. I denne oppgaven er det målt caspase-3 aktivitet som også er en målemetode for apoptose ved at økt caspase-3 aktivitet er et tegn til apoptose. I tillegg er det observert morfologiske endringer ved hjelp av lysmikroskopi. Andre målemetoder for apoptose kan være deteksjon av DNA fragmentering ved elektroforese eller TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling). TUNEL er en metode for rask identifisering og kvantifisering av apoptotisk cellefraksjon. Denne analysen baserer seg på at det blir observert tilstedeværelse av kutt i DNA som gjenkjennes ved terminal deoksynukleotidyl transferase [52].

I denne oppgaven ble det observert en svak økning av caspase-3 aktivitet i HEK293 og M38L celler. Resultatene viste at aktiviteten av caspase-3 ble høyere i M4C enn HEK293 og M38L. Denne økningen har sammenheng med cystatin E/M, siden M4C celler overuttrykker cystatin E/M som hemmer legumain og cathepsiner. Når legumain er hemmet, kan det føre til at proapoptotiske stoffer blir aktive og videre aktiverer caspase-3. En studie viser at staurosporin induserer apoptose i melanomceller. Det ble vist økt caspase-3 aktivitet etter 4 timers stimulering med staurosporin. Det samme ble det vist fra western blotting av aktiv form for caspase-3 [18].

Cystatin E/M er en sterk inhibitor av legumain og cathepsin B, L og V. Disse proteasene fører til økt invasjon og migrasjon av kreftceller, så ved å hemme disse proteasene vil det føre til mer invasjon, migrasjon, motilitet og hyperproliferasjon av kreftcellene [53]. Det er gjort forsøk med å hemme cystatin E/M i tumorceller, som resulterte til betydelig økt proteolytisk aktiviteter av cathepsin B, L og legumain [37]. I denne oppgaven var det derfor interessant å studere effekten av proteaseinhibitorer cystatin E/M og E64d på caspase-3 aktivitet stimulert med staurosporin for å sjekke om hemming av legumain og/eller cathepsiner påvirket caspase-3 aktiviteten. En måte å undersøke effekten av cystatin E/M på caspase-3 aktivitet er å sammenligne HEK293 celler med M4C celler. Det ble vist at caspase-3 aktivitet er høyere i M4C celler sammenlignet med HEK293 celler. Cystatin E/M påvirker cellens respons på staurosporin og gir økt caspase-3 aktivitet. Det betyr at når aktiviteten av legumain og cathepsiner er veldig lav i M4C celler på grunn av mye cystatin E/M i cellene, så er det samtidig økt caspase-3 aktivitet etter behandling med staurosporin. Hemming av legumain eller cathepsiner kan derfor være med på å øke caspase-3 aktivitet.

En annen måte å undersøke dette på er å tilsette eksogene proteaseinhibitorer cystatin E/M eller E64d til HEK293 og M38L celler før tilsetning av staurosporin. Cystatin E/M hemmer både cathepsiner og legumain. Det ble observert også observert økt caspase-3-aktivitet i HEK293 og M38L celler etter behandling med cystatin E/M. Økt caspase-3 aktivitet er et mål på celledød. En hypotese i denne oppgaven var at aktive cathepsiner forårsaket økt caspase-3-aktivitet. Cathepsiner er tidligere vist å øke caspase-3 aktivitet via den mitokondrielle veien [22]. Dersom dette var tilfelle når HEK293 og M38L celler ble tilsatt E64d og stimulert med staurosporin, så ville caspase-3 aktiviteten hemmes på grunn av at cathepsiner blir hemmet av E64d. Men det ble ikke observert noe forskjell i caspase-3 aktivitet i celler som var behandlet med eller uten

E64d, som tyder på at cathepsiner ikke har spilt noe rolle for caspase-3 aktiviteten. Derfor kan det tyde på at legumain eller cystatin E/M kan være involvert i caspase-3 aktivitet etter stimulering med staurosporin. Det kan bety at legumain er anti-apoptotisk, siden hemming av legumain med cystatin E/M ga økt caspase-3 aktivitet. Sammenhengen mellom cystatin E/M og caspaser er ikke studert før. I denne oppgaven er det funnet økende caspase-3 aktivitet etter behandling med staurosporin i celler med mye cystatin E/M. Staurosporin induserer apoptose gjennom flere mekanismer og derfor kan være mange årsaker til den observerte effekten. Hypotetisk modell for dette er omtalt i kapittel 4.6.

4.3 Legumainaktiviteten redusert med staurosporin i HEK-cellelinjer.

I denne studien har det vist at staurosporin har en tendens til reduserende effekt på legumainaktivitet i HEK393 og M38L, men det er ikke signifikant forskjell fra celler uten stimulering. Reduksjonen av legumainaktivitet ble observert først etter 6 timer, og fortsatt å være redusert i 24 timer. Det kan tenkes at legumain er fortsatt i lysosomene etter staurosporin behandling, siden det ikke var observert endring av aktivitet før 6 timer. Dersom legumain skulle vært lekket ut i cytosol etter staurosporin behandling, ville det vært redusert aktivitet kanskje før 6 timer. Legumain vil ikke være stabil ved nøytral pH, men aktivitet kan fortsatt være der, men det er vanskelig å si hvor lenge legumain er aktiv og stabil ved nøytral pH. Videre viste immunoblotting økt prosessering av prolegumain (47 kDa) til aktiv legumain (36 kDa) i M38L og HEK293 etter stimulering i ulike tider.

For å bekrefte eller avkrefte effekten av staurosporin på legumainaktivitet i HEK293, M38L og M4C celler, kreves det å utføre flere studier. Det kan være nødvendig å undersøkes dette videre med doserespons av staurosporin for å bekrefte om tendensen til redusert legumainaktivitet etter behandling med staurosporin er reelt i disse cellene.

4.4 Caspase-3 aktivitet øker i M38L celler etter stimulering med Leu-Leu-OMe

Leu-Leu-OMe er antatt å kunne føre til ødeleggelse av lysosomene og DNA-fragmentering og forårsaker apoptose. Leu-Leu-OMe gjør at det blir lekkasje i lysosomene slik at innholdet kan frigjøre til cytosol [54].

Det ble utført forsøk for å undersøke effekten av Leu-Leu-OMe på caspase-3 aktivitet i HEK293, M38L og M4C celler. Aktiviteten er doseavhengig, høyest aktivitet i celler med høyest konsentrasjon av Leu-Leu-OMe. Caspase-3 aktiviteten var høyere i M38L enn M4C og HEK293, som tyder på en sammenheng mellom caspase-3 og legumain. En studie har undersøkt effekten av Leu-Leu-OMe på caspase-3 aktivitet i forskjellige celletyper blant annet HEK293, og aktiviteten er sammenlignet med andre celletyper for å vise hvilke celletyper har størst caspase-3 aktivitet [54]. Deres mål med studien var om humane mastceller var følsomme for celledød som er induisert av Leu-Leu-OMe sammenlignet med blant annet HEK293. Humane mastceller som har sykdomsfremkallende roller i en rekke lidelser inneholder mye sekretoriske lysosomer som inneholder en rekke komponenter slik som cytokiner, og proteaser. Det ble observert at humane mastceller var følsomme for Leu-Leu-OMe induisert celledød. I de cellene som er stimulert med Leu-Leu-OMe, ble det observert caspase-3 aktivitet og bånd for aktiv caspase-3 på immunoblotting. De konkluderer videre med at HEK293 celler viste minimale tegn på lysosomal skade som respons på Leu-Leu-OMe. Våre caspase-3 aktivitetsmålingene viste lignende resultater i M38L celler som i mastcellene [54] og liten økning i caspase-3 aktivitet i HEK293 cellene som er behandlet med Leu-Leu-OMe 500 µM i 2-8 timer.

Caspase-3 aktivitet var mest økt i M38L celler behandlet med ulike konsentrasjoner i forhold til M4C OG HEK293 celler. Skade på lysosomer vil således føre til lekkasje av proteaser, inn i cytosol, noe som potensielt kan utløse apoptose [54]. Det kan tenkes at når cellene blir stimulert med Leu-Leu-OMe, blir det lekkasje på lysosomer og da blir lysosomene permeable. Proteaser som har kommet ut i cytosol har aktivert caspase-3. Ved lekkasje av lysosomer kan også andre faktorer som befinner seg i lysosomer, være involvert i caspase-3 aktivitet, et eksempel er caspase-8 som fører til caspase-3 aktivitet i cytosol. I M38L celler som inneholder mye legumain, er det størst caspase-3 aktivitet, derfor kan det tenkes at caspase-3 aktiveres direkte eller indirekte av legumain, som fremmer celledød/apoptose. I HEK293 som er normalen, er det ikke observert høy aktivitet som i M38L, det kan bety at siden det ikke er like mye legumain

i HEK293 som i M38L celler, så skjer det også mindre caspase-3 aktivering som fremmer apoptose. I M4C celler er ikke observert noe caspase-3 aktivitet, som bekrefter at hemming av legumain er ikke involvert i caspase-3 aktivitet etter Leu-Leu-OMe behandling. Derfor kan det tenkes at legumain virker proapoptotisk når celler blir stimulert med Leu-Leu-OMe. Caspase-3 aktivitets målingene er i samsvar med immunoblotting som viser størst båndvolum for aktiv form for caspase-3 i M38L celler med 1000 μM av Leu-Leu-OMe. Cellenes morfologien ble observert og det var flere runde celler og cellene var mer separerte enn celler uten stimulering. Det er vanskelig å si om celler har gått i apoptose ut ifra lysmikroskopi på laboratoriet. Men disse morfologiske hendelsene tyder på at celler ikke trives godt, og kan være et tegn på apoptose.

Det var også interessant å undersøke effekten av Leu-Leu-OMe (500 μM) i alle HEK-cellelinjer i ulike tider. Caspase-3 aktivitet var størst i M38L celler. Dette er bekreftet i immunoblotting som viste størst båndvolum for aktiv form av caspase-3 (17 kDa) i M38L celler etter 6 timers stimulering. Caspase-3 aktivitet begynte å øke etter 1 time og økte mer etter 6-24 timer.

For å undersøke om legumain eller cathepsiner forårsaker caspase-3 aktivitet i M38L og HEK293 celler, ble det tilsatt cystatin E/M og E64d. Caspase-3 aktivitet i celler som fikk cystatin E/M var litt lavere (med 19%) sammenlignet med celler uten cystatin E/M. Caspase-3 aktivitet er ikke betydelig redusert i M38L celler med cystatin E/M og derfor vil cystatin E/M ikke spille noe rolle for caspase-3 aktivitet stimulert med Leu-Leu-OMe. Caspase-3 aktivitet i HEK293 celler tilsatt cystatin E/M var ganske lik som for celler uten cystatin E/M, så cystatin E/M spiller ikke noe rolle for caspase-3 aktivitet i celler stimulert med Leu-Leu-OMe. I begge celletypene var caspase-3 aktivitet 4 ganger høyere for celler tilsatt cystatin E/M og celler uten cystatin E/M stimulert med Leu-Leu-OMe sammenlignet med ustimulerte celler. Men aktiviteten var høyere i M38L celler sammenlignet med HEK293 celler. Caspase-3 aktivitet er betydelig redusert etter tilsetning av E64d stimulert med Leu-Leu-OMe 500 μM . Dette indikerer at cathepsiner kan være årsaken til økende caspase-3 aktivitet etter lysosomal lekkasje (figur 4.1). Hypotetisk modell for dette er omtalt i kapittel 4.6.

4.5 Leu-Leu-OMe reduserer legumainaktivitet i HEK-celler

Legumainaktiviteten var redusert i HEK293, M38L og M4C etter 1 time med Leu-Leu-OMe behandling. Legumainaktivitet var doseavhengig, aktiviteten reduseres etter høyere Leu-Leu-OMe konsentrasjoner. Det ble observert allerede etter 1 time at legumainaktivitet var redusert med ca. 90 % i M38L celler. Legumainaktivitet er pH avhengig. Legumain er vist til å ha maksimal aktivitet ved pH 6,4, men samtidig ved denne pH vil legumain også være ustabil [24]. Når cellene blir stimulert med Leu-Leu-OMe, blir lysosomene permeable og dette kan gjøre at pH endres i lysosomene. Det kan tenkes denne pH endring kan ha påvirket legumainaktiviteten, siden legumainaktiviteten blir mer redusert etter høyere Leu-Leu-OMe doser. Ved lekkasje av lysosomene kan legumain lekke ut i cytosol etter Leu-Leu-OMe-indusert lysosomal permeabilitet, og i cytosol med pH 7,4 vil legumain bli inaktivert. Men det kan også være andre faktorer i cytosol som kan påvirke legumainaktiviteten ved lysosomal lekkasje. Cystatin C som er i cytosol har vist i tidligere studier at det kan ha hemmende effekt på legumain [40]. Dette ligner på våre legumainaktivitetsmålingene i M4C celler som viste liten legumainaktivitet med mye cystatin E/M etter stimulering med staurosporin og Leu-Leu-OMe.

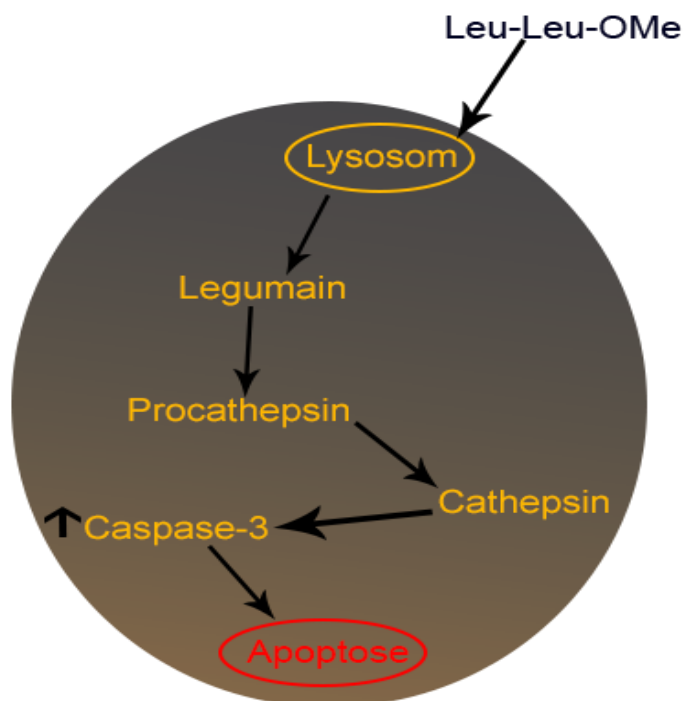
4.6 Prosesser som kan føre til caspase-3 aktivitet

Når alle tre celletyper ble stimulert med staurosporin, økte caspase-3 aktivitet mest i M4C celler (overuttrykker cystatin E/M). I M4C celler er legumain og kanskje også cathepsiner hemmet i lysosomene. Det ble vist økt caspase-3 aktivitet også for HEK293, men her går prosessen saktere. Cystatin E/M er med på å stimulere caspase-3 økning sammen med staurosporin. Tidligere forsøk har vist at staurosporin hemmer proteinkinase C (PKC) [17]. PKC er en familie av proteinkinase enzymer som er involvert å kontrollere funksjoner av mange proteiner ved fosforylering og regulering av aktiviteten. Når kinaser hemmes, kan det føre til at proapoptotiske proteaser ble aktivert slik at det oppstår apoptose. Men cystatin E/M ser også ut til å være involvert i caspase-3 aktiveringsmekanisme. Det kan tenkes at cystatin E/M hemmer en antiapoptotisk protease som videre fører til caspase-3 aktivering indirekte. Det er rapportert før at legumain og cystatin E/M møtes intracellulært og at legumain og cystatin E/M har samme lokalisering [40]. En studie har vist at legumain virker proapoptotisk ved å spalte et protein som heter SET, og skade DNA, og dermed oppstår apoptose [46]. Legumain er også vist til å være

antiapoptotisk i tumorer i en annen studie [45]. En hypotese for legumains antiapoptotisk virkningsmekanisme er utpekt i et «abstract» fra 2008 av Liu et al. [45]. I dette «abstract» er det beskrevet om at lysosompermeabiliteten endres slik at legumain kan frigjøres til cytosol etter staurosporin behandling. I cytosol virker legumain antiapoptotisk ved at legumain binder til cathepsin B og hemmer proapoptotisk proteinet Bid [45]. I tillegg beskytter legumain mot apoptose via mitokondrielle signalveien og dødsreseptor-signalveien ved at legumain inaktiverer caspase-7 og -9. Det å hemme legumain fører til at kreftcellene går inn i apoptose in vitro og in vivo [45], men denne studie er ikke blitt publisert. Men det er ikke kjent for hvordan legumain kan hemme autoaktivering av procathepsin til cathepsin. M4C celler som overtrykker cystatin E/M hemmer legumain. Hemming av legumain kan dermed føre til at cathepsiner blir autoaktivert og videre skjer det caspase-3 aktivering. Men overraskende så har resultatene i denne oppgaven vist at når det ble tilsatt eksogene inhibitor E64d, så var det ikke noe endring av caspase-3 aktivitet, dette betyr at cathepsiner er ikke involvert i caspase-3 aktiviteten etter staurosporin behandling. Da kan det være slik at når cystatin E/M hemmer legumain, så er det andre proapoptotisk stoffer som øker caspase-3 aktivitet. Det kan være flere muligheter for hvordan caspase-3 aktivitet øker i celler med mye cystatin E/M etter stimulering med staurosporin. Derfor kan en hypotese være det at lysosomene ikke blir permeable når celler blir stimulert med staurosporin, alt blir værende i lysosomer. Studier har vist at celler behandlet med staurosporin, øker caspase-3 aktivitet gjennom den mitokondrielle veien [18]. Dersom dette er tilfelle i våre resultater, kan det tenkes at når celler blir stimulert med staurosporin, frigjøres cytokrom c fra mitokondriene, som arkiveres caspase-9. Dette vil videre aktivere caspase-3. Men cystatin E/M forsterker denne effekten ved å hemme PKC, cystatin E/M i lysosomene og eller cytosol og cytokrom c fra mitokondriene fører til økt caspase-3 aktivitet. Dermed induserer apoptose.

Når alle tre celletyper ble stimulert med Leu-Leu-OMe, var caspase-3 aktivitet i M38L celler (overtrykker legumain) høyere enn HEK293 og M4C celler. Leu-Leu-OMe er kjent for å føre til lysosomlekkasje slik at innholdet lekker ut i cytosol og indusere celledød [55]. Legumain kan frigjøres fra lysosomer til cytosol. Da kan legumain aktivere procathepsiner til aktiv cathepsin direkte eller indirekte, som videre aktiverer caspase-3 (figur 4.1). Aktiv cathepsin i cytosol kan angripe mitokondriene og spalter proapoptotiske proteinet Bid. Dette fører til mitokondrieporositet, som fører til aktivering av caspase-3 [22]. Cathepsin involvering i caspase-3 aktivering ble bekreftet med celler forbehandlet med E64d som er en cathepsin hemmer. Caspase-3 ble betydelig redusert i celler som var tilsatt E64d. Mekanismen for dette

kan være at E64d hemmer cathepsiner direkte i cytosol slik at caspase-3 ikke blir aktivert. Det betyr at cathepsiner er involvert i caspase-3 økende aktivitet etter Leu-Leu-OMe stimulering i M38L og HEK293 celler. Dette forsterker våre resultater. Når legumain frigjøres til cytosol, der vil aktiv legumain ikke være stabil fordi i cytosol er det nøytral pH. Selv om stabiliteten er dårlig i nøytral pH, kan legumain fortsatt være aktiv, i hvert fall for en kort stund. Legumainaktivitetsmålingene viste at legumainaktivitet reduseres etter 2 timer. Men den aktiviteten av legumain når det først frigjøres i cytosol, er nok til å forårsake caspase-3 aktivitet, så kan legumain være aktiv en stund i det miljøet i cytosol. På laboratoriet ble observert runde celler som var løse og mindre i størrelse, det virket som om celler ikke trivdes godt, og dette kan være et tegn på at celler er i ferd med å dø. Disse morfologiske endringene ble observert i alle celletyper stimulert med staurosporin og Leu-Leu-Ome. Det var vanskelig å se om det er noe forskjell på cellens morfologi når cellene var stimulert med staurosporin eller Leu-Leu-OMe.



Figur 4.1. Caspase-3 aktivering i M38L celler etter stimulering med Leu-Leu-OMe.
Teoretisk modell som kan forklare økt caspase-3 aktivitet i celler stimulert med Leu-Leu-OMe

Samlet tyder disse resultatene på at staurosporin og Leu-Leu-OMe fører til økt caspase-3-aktivitet på helt to forskjellige måter. Caspase-3 aktiveres gjennom to ulike veier avhengig av hvilken dødsstimulerende stoff blir brukt. Resultatene tyder også på at legumain virker antiapoptotisk når det er lokalisert i lysosomer men proapoptotisk når det frigjøres til cytosol.

5 Konklusjon

Data fra denne masteroppgave viser at:

- Det ble etablert en metode for måling av caspase-3-aktivitet.
- Staurosporinstimulering førte til økt caspase-3-aktivering i celler som overuttrykker proteasehemmeren cystatin E/M (M4C celler).
- Staurosporinstimulering førte ikke til endret legumainaktivitet.
- Forbehandling av HEK293 og M38L celler med cystatin E/M før stimulering med staurosporin førte økt aktiv caspase-3.
- Forbehandling av HEK293 og M38L celler med E64d før stimulering med staurosporin førte ikke til endring av aktiv caspase-3.
- Leu-Leu-OMe stimulering førte til økt caspase-3-aktivering i celler som overuttrykker legumain (M38L celler).
- Leu-Leu-OMe stimulering førte til redusert legumainaktivitet i HEK293, M38L og M4C celler.
- Forbehandling av HEK293 og M38L celler med cystatin E/M før stimulering med Leu-Leu-OMe førte ikke til endring av aktiv caspase-3.
- Forbehandling av HEK293 og M38L celler med E64d før stimulering med Leu-Leu-OMe førte til redusert aktiv caspase

Referansliste

1. Golstein, P. and G. Kroemer, *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(1): p. 37-43.
2. Kane, A.B., *Redefining cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 1-2.
3. Ziegler, U. and P. Groscurth, *Morphological features of cell death*. News Physiol Sci, 2004. **19**: p. 124-8.
4. Cerella, C., et al., *From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment*. Biotechnol Adv, 2014.
5. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
6. Kamal, A., S. Faazil, and M.S. Malik, *Apoptosis-inducing agents: a patent review (2010-2013)*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2014. **24**(3): p. 339-354.
7. <Programmed Cell Death (Apoptosis) - Molecular Biology of the Cell - NCBI Boo.pdf>.
8. Duke, R.C., D.M. Ojcius, and J.D. Young, *Cell suicide in health and disease*. Sci Am, 1996. **275**(6): p. 80-7.
9. Repnik, U. and B. Turk, *Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death*. Mitochondrion, 2010. **10**(6): p. 662-9.
10. Jin, Z. and W.S. El-Deiry, *Overview of cell death signaling pathways*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(2): p. 139-63.
11. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
12. Cummings, B.S., L.P. Wills, and R.G. Schnellmann, *Measurement of cell death in Mammalian cells*. Curr Protoc Pharmacol, 2012. **Chapter 12**: p. Unit12 8.
13. Broker, L.E., F.A. Kruyt, and G. Giaccone, *Cell death independent of caspases: a review*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3155-62.
14. Kundu, M. and C.B. Thompson, *Autophagy: basic principles and relevance to disease*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 427-55.
15. Levine, B. and V. Deretic, *Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 767-77.

16. Omura, S., et al., *A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization.* J Antibiot (Tokyo), 1977. **30**(4): p. 275-82.
17. Antonsson, A. and J.L. Persson, *Induction of apoptosis by staurosporine involves the inhibition of expression of the major cell cycle proteins at the G(2)/m checkpoint accompanied by alterations in Erk and Akt kinase activities.* Anticancer Res, 2009. **29**(8): p. 2893-8.
18. Zhang, X.D., S.K. Gillespie, and P. Hersey, *Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways.* Mol Cancer Ther, 2004. **3**(2): p. 187-97.
19. Kobayashi, Y., et al., *Cell-type specificity of l-leucyl l-leucine methyl ester.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **272**(3): p. 687-90.
20. Uchimoto, T., et al., *Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-Leucyl-L-Leucine methyl ester.* Apoptosis, 1999. **4**(5): p. 357-62.
21. Weidle, U.H., G. Tiefenthaler, and G. Georges, *Proteases as activators for cytotoxic prodrugs in antitumor therapy.* Cancer Genomics Proteomics, 2014. **11**(2): p. 67-79.
22. Chwieralski, C.E., T. Welte, and F. Buhling, *Cathepsin-regulated apoptosis.* Apoptosis, 2006. **11**(2): p. 143-9.
23. Barrett, A.J. and N.D. Rawlings, *Evolutionary lines of cysteine peptidases.* Biol Chem, 2001. **382**(5): p. 727-33.
24. Chen, J.M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase.* J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 8090-8.
25. Rawlings, N.D., et al., *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors.* Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D503-9.
26. Alvarez-Fernandez, M., et al., *Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site.* J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 19195-203.
27. 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.
28. Chen, J.M., et al., *Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase.* Biochem J, 1998. **335** (Pt 1): p. 111-7.

29. Wu, W., et al., *Targeting cell-impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug-resistant neoplasms*. *Cancer Res*, 2006. **66**(2): p. 970-80.
30. 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.
31. Li, D.N., et al., *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(40): p. 38980-90.
32. Edgington, L.E., et al., *Functional imaging of legumain in cancer using a new quenched activity-based probe*. *J Am Chem Soc*, 2013. **135**(1): p. 174-82.
33. Pop, C. and G.S. Salvesen, *Human caspases: activation, specificity, and regulation*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(33): p. 21777-81.
34. Green, D.R. and G. Kroemer, *Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight?* *J Clin Invest*, 2005. **115**(10): p. 2610-7.
35. Kumar, S., *Caspase function in programmed cell death*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(1): p. 32-43.
36. Lavrik, I.N., A. Golks, and P.H. Krammer, *Caspases: pharmacological manipulation of cell death*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(10): p. 2665-72.
37. Briggs, J.J., et al., *Cystatin E/M suppresses legumain activity and invasion of human melanoma*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 17.
38. Barrett, A.J., et al., *L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L*. *Biochem J*, 1982. **201**(1): p. 189-98.
39. Thomas, P. and T.G. Smart, *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2005. **51**(3): p. 187-200.
40. Smith, R., et al., *Intra- and extracellular regulation of activity and processing of legumain by cystatin E/M*. *Biochimie*, 2012. **94**(12): p. 2590-9.
41. Slagsvold, H.H., et al., *High molecular weight DNA fragments are processed by caspase sensitive or caspase independent pathways in cultures of cerebellar granule neurons*. *Brain Research*, 2003. **984**(1-2): p. 111-121.
42. 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.

43. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
44. Jensen, E.C., *The basics of western blotting*. Anat Rec (Hoboken), 2012. **295**(3): p. 369-71.
45. Liu Y, W.W., Guo F, Chen Z, Sinha S, Liu C. Catalytic inactivation of caspases by legumain confers resistance to multiple apoptotic pathways. Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2008;49:1039-40.
46. Liu, Z., et al., *Neuroprotective actions of PIKE-L by inhibition of SET proteolytic degradation by asparagine endopeptidase*. Mol Cell, 2008. **29**(6): p. 665-78.
47. Basurto-Islas, G., et al., *Activation of asparaginyl endopeptidase leads to Tau hyperphosphorylation in Alzheimer disease*. J Biol Chem, 2013. **288**(24): p. 17495-507.
48. Chen, J.M., M. Fortunato, and A.J. Barrett, *Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue*. Biochem J, 2000. **352 Pt 2**: p. 327-34.
49. Clerin, V., et al., *Expression of the cysteine protease legumain in vascular lesions and functional implications in atherogenesis*. Atherosclerosis, 2008. **201**(1): p. 53-66.
50. Belmokhtar, C.A., J. Hillion, and E. Segal-Bendirdjian, *Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms*. Oncogene, 2001. **20**(26): p. 3354-62.
51. Kagedal, K., et al., *Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis--involvement of Bax?* Int J Exp Pathol, 2005. **86**(5): p. 309-21.
52. Negoescu, A., et al., *In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations*. J Histochem Cytochem, 1996. **44**(9): p. 959-68.
53. Kembhavi, A.A., et al., *The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays*. Arch Biochem Biophys, 1993. **303**(2): p. 208-13.
54. Melo, F.R., et al., *Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in human mast cells*. Scand J Immunol, 2011. **74**(4): p. 354-62.
55. Cesen, M.H., et al., *Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications*. Exp Cell Res, 2012. **318**(11): p. 1245-51.

Vedlegg

Celledyrkning

Dyrkningsmedium

500 ml DMEM (1x) med GluaMAX-1

50 ml føtal kalveserum (FBS)

5 ml Natriumpyrovat

5 ml Penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100µg/ml)

Lysisbuffer (pH 5,8)

100 mM natriumcitrat

1 mM Na₂EDTA

1% w/v N-oktyl-β-D-glukopyranosid

Caspase-3 buffer (RIPA-buffer)

25 mg 150 mM % (w/v) sodium deoxycholate

38 mg 1 mM EGTA

1 ml 1% NP-40

605 mg 50 mM tris for justering av pH 7,4

Legumainaktivitetsmåling

Legumain-assaybuffer hjelpeløsning (pH 5,8)

39,5 mM sitronsyre

121 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1 mM Na_2EDTA

0,01 % CHAPS

200 μl 200 mM (DTT) tilsettes 40 ml assaybuffer rett før bruk (1 mM)

Legumain substratopløsning (34 μM)

200 μl 2,5 mM Ala-Ala-Asn

14,5 ml legumain assaybuffer

Caspase-3 buffer (hjelpeløsning)

3618 μl RIPA-buffer

500 μl 200 mM DTT

Caspase-3 substratopløsning (20 μM)

680 μl 1 mM substratstamløsning Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC

9,32 ml RIPA-buffer

Totalproteinmåling

Fortynnet fargereagens (1:5)

10 ml Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate

40 ml dH₂O

Immunoblotting

Elektroforesebuffer

40 ml NuPAGE MPS SDS Running Buffer (20x)

dH₂O til 800 ml

500 µl NuPAGE Antioxidant tilsettes elektroforesekar

Blottebuffer

400 ml Tris/Glycine-buffer

800 ml Metanol

2,8 l dH₂O

Blokko 5 %

5 g fettfri tørrmelk

1xT-TBS til 100 ml

Fremkallingsløsning

2,5 ml SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Solution

2,5 ml SuperSignal West Dura stable Peroxide Buffer

Prosedyre for acetonfelling

- Tilsett 800 μ l iskald aceton til 200 μ l prøve (eventuelt fortynnet prøve til 200 μ l)= 80% aceton
- Vortex
- inkuber 1 time -20 °C
- Sentrifuger 20min ved 15000G og 4 °C, og avpippeter supernatanten forsiktig
- Vask med 0,5 ml kald 80% aceton
- Sentrifuger 10min ved 15000G og 4 °C og avpippeter supernatanten forsiktig.
- Tørk proteinpelletten ca 20 -30 min i romtemp. (Ikke overtørk)

Tilsett 5 μ l 4 xSample, 2 μ l 0,5 M DTT og 13 μ l vann, totalt volum 20 μ l.

Vortex. Varm prøvene i 10 min på 70°C

Forberedelse av prøver til elektroforese av HEK293 og M4C lysater

13 μ l dH₂O

5 μ l 4xLDS Sample Buffer

2 μ l 0,5 M DTT

Disse volumene tilsettes eppendorfrør med cellelysat som har vært tørket på benken i 20-30 minutter etter acetonfelling.

Vortex og varmes ved 70 °C i 10 minutter

Forberedelse av prøver til elektroforese av M38L lysater

X μ l dH₂O

+ X μ l cellelysat

= 13 μ l totalvolum

+ 5 μ l 4xLDS sample Buffer

+ 2 μ l 0,5 M DTT

Vortex og varmes ved 70 °C i 10 minutter