

Atorvastatin hemmer aktiviteten av cysteinproteaser og stimulerer sekresjonen av MMP-9

Anny Thi Tran



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematiske-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2012

Atorvastatin hemmer aktiviteten av cysteinproteaser og stimulerer sekresjonen av MMP-9

Anny Thi Tran



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematiske-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2012

Veiledere & medveiledere:

Professor Rigmor Solberg

Professor Harald Thidemann Johansen

Doktorgradsstipendiat Robert Smith

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Avdeling for Farmasøytisk biovitenskap på Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2011 til juni 2012.

Jeg ønsker å rette en kjempestor takk til mine veiledere, Professor Rigmor Solberg og Harald Thidemann Johansen for god oppfølging, veiledning, rådgivning og støtte og ikke minst for et stort engasjement under skriveprosessen. Stor takk til stipendiat Robert Smith, for din tilgjengelighet, veiledning, motivasjon og evne til å løse alle tekniske problemer som måtte oppstå. Stor takk til avdelingsingeniør Hilde Nilsen og stipendiat Lise Berven for god opplæring og veiledning i den praktisk delen av oppgaven, og for å ha tatt hånd om RAW-cellene mine i mitt fravær. Takk til Eva Skovlund for statistiske innspill.

Jeg ønsker å takke alle i 4. etasje, medelever og dere på det "lille kontoret" for latter, hygge og gode kaker på fredagene, og takk til Linn Løkken Jacobsen for hyggelig sang, motivasjon og godt humør under masterskrivingen. Jeg har trivdes svært godt i deres selskap.

Jeg vil også takke min familie og venner for all støtte, motivasjon og forståelse de har vist gjennom hele studietiden.

Mange takk til min kjære Khanh, som alltid har vært der for meg og gitt meg masse støtte og glede under masterstudiet.

Blindern, Mai 2012

Anny Thi Tran

Abstract

Besides the established effects of statins on lowering plasma cholesterol, new studies indicate that the statins exhibit additional effects (pleiotropic effects) that could explain their therapeutic success. Recently, it was shown that mRNA for the cysteine proteases legumain and cathepsin B was down-regulated in monocytes/macrophages from patients treated with atorvastatin. In the atherosclerotic plaque, transformed macrophages play a pivotal role in pathophysiology and legumain has previously been found to be upregulated in human unstable versus stable atherosclerotic plaques. The proteolytic machinery of macrophages is considered to be a critical factor in the progression of atherosclerosis. Here we present data on the effects of atorvastatin on the regulation in macrophages of the cysteine proteases legumain and cathepsin B, as well as the matrix metalloproteases MMP-2 and -9.

In this study murine RAW 264.7 macrophages were used as a cell model and stimulated with atorvastatin lactone and/or mevalonolactone. Legumain and cathepsin B were analyzed by activity measurements using specific fluorogenic substrates and immunoblotting, whereas MMP-2 and -9 were analyzed by zymography. Cell viability was measured by MTS-analyses.

Increasing concentrations of atorvastatin exhibited a dose-dependent reduction of both legumain and cathepsin B activities in the macrophages and addition of mevalonolactone seemed to partly prevent these effects. Surprisingly, macrophages secreted increased levels of MMP-9 when exposed to increasing concentrations of atorvastatin. No differences were observed for MMP-2. No consistent effect of mevalonolactone was observed. Atorvastatin caused reduced viability of RAW cells when exposed to high concentrations. Mevalonolactone was able to prevent some of these effects on cells treated with atorvastatin.

To conclude, atorvastatin reduces activity and protein expression of legumain and cathepsin B in RAW macrophages by inhibiting the mevalonate synthesis. Also, atorvastatin has a stimulating effect on the secretion of MMP-9 from RAW macrophages. Mevalonolactone has a protecting effect on cell viability when treated with atorvastatin.

Sammendrag

I tillegg til de etablerte kolesterolsenkende effektene av statiner, indikerer nye studier at statiner utviser tilleggseffekter (pleiotrope effekter) som kan forklare deres terapeutiske suksess. Nylig ble det vist at mRNA for cysteinproteasene legumain og cathepsin B ble nedregulert i monocytter/makrofager hos pasienter behandlet med atorvastatin. Makrofager spiller en sentral rolle i utviklingen av aterosklerotiske plakk, og det er nylig gjort funn som viser at legumain og cathepsin B er oppregulert i ustabile plakk i forhold til stabile plakk. Det proteolytiske maskineriet hos makrofager er ansett å være en kritisk faktor i progresjonen av aterosklerose. I masteroppgaven ble fokuset rettet mot effektene av atorvastatin på makrofager og reguleringen av cysteinproteasene legumain og cathepsin B, samt matriks metalloproteasene MMP-2 og -9.

I denne studien ble RAW 264,7 makrofager fra mus brukt som cellemodell. Makrofagene ble stimulert med økende konsentrasjoner av atorvastatin med eller uten mevalonolakton til stede. Aktivitet av legumain og cathepsin B ble målt ved bruk av enzymspesifikke substrater og proteinuttrykk ble bestemt ved hjelp av immunoblotting. Sekresjon av MMP-2 og -9 ble analysert ved hjelp av zymografi. Celleviabilitetsmålinger ble utført med MTS-analyser.

Resultatene viste at økende konsentrasjoner av atorvastatin forårsaket en doseavhengig reduksjon av legumain- og cathepsin B-aktivitet hos makrofager. Tilleggsbehandling med mevalonolakton motvirket deler av atorvastatineffektene. Overraskende nok utviste atorvastatin stimulerende effekter på sekresjon av MMP-9, mens det ikke ble observert noen forandringer i sekresjon av MMP-2. Behandlingene av makrofagene med atorvastatin alene viste en reduserende effekt på celleviabiliteten, noe som ble delvis motvirket ved tilsetning av mevalonolakton.

Konklusjon: Atorvastatin reduserer aktivitet og proteinuttrykk av legumain og cathepsin B i RAW-makrofager gjennom hemming av mevalonsyresyntesen. Atorvastatin har en stimulerende effekt på sekresjon av MMP-9 fra RAW-makrofager og en reduserende effekt på celleviabiliteten, noe som blir delvis motvirket ved tilsetning av mevalonolakton.

Innholdsfortegnelse

Forord	1
Abstract	2
Sammendrag	3
Innholdsfortegnelse	4
Forkortelser	6
1. Innledning.....	10
1.1 Aterosklerose	10
1.2 Proteaser	12
1.3 Legumain	14
1.3.1 Autoaktivering av legumain	14
1.3.2 Legumain i aterosklerotiske plakk	16
1.4 Cathepsiner	16
1.4.1 Cystatiner hemmer legumain og cathepsiner	17
1.4.2 Cathepsiner regulerer vevsmodellering.....	18
1.4.3 Cathepsin B	20
1.5 Matriks metalloproteaser (MMP-er).....	21
1.6 Statiner.....	22
1.6.1 Statinerspleiotrope effekter	22
1.6.2 Statiner og aterosklerose	25
2. Mål for oppgaven	26
3. Materialer og metoder	27
3.1 Kjemikalier og reagenser.....	27
3.2 Utstyr	28
3.3 Celledyrking	29
3.3.1 RAW 264,7 celler.....	29
3.3.2 Tining og utsåing av celler	29
3.3.3 Splitting og telling av celler	29
3.3.4 Høsting av celler.....	30
3.4 Celleforsøk.....	30
3.4.1 Celleforsøk med atorvastatin med eller uten mevalonolakton	30
3.4.2 Tillaging av oppløsninger med atorvastatin og mevalonolakton	30

3.5	Totalproteinmåling	32
3.6	Enzymaktivitetsmåling	33
3.6.1	Måling av legumainaktivitet.....	33
3.6.2	Måling av cathepsin B-aktivitet	34
3.7	Måling av celleviabilitet (MTS)	34
3.8	Western blotting	35
3.9	Zymografi	36
3.10	Statistiske analyser	37
4.	Resultater.....	38
4.1	Endret morfologi av RAW 264,7 makrofager etter behandling med atorvastatin og/eller mevalonolakton	38
4.2	Viabilitetsmålinger av RAW-makrofager etter behandling med atorvastatin med eller uten mevalonolakton	39
4.3	Atorvastatin hemmer legumain- og cathepsin B-aktivitet i RAW 264,7 makrofager	40
4.4	Forsterket atorvastatineffekt på reduksjon av enzymaktivitet i celler inkubert i fravær av serum versus med serum	43
4.5	Effekt av atorvastatin og mevalonolakton på sekresjon av MMP-2 og -9 fra RAW 264,7 makrofager	46
5.	Diskusjon.....	50
5.1	Valg av cellemodell og analysemetoder	51
5.2	Atorvastatin hemmer legumain og cathepsin B.....	52
6.	Konklusjon	57
	Litteraturliste	58
	Appendiks.....	64

Forkortelser

A-MuLV	”Abelson murine leukemia virus”
AL	Atorvastatinlakton
Apo-E	Apolipoprotein E
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
BSL	”Biosafety level”
CoQ ₁₀	Coenzym Q10
C _{max}	Maksimal plasmakonsentrasjon
DMSO	Dimetylsulfoksid
DTT	Ditiotreitol
EGF	Epidermal vekstfaktor
EC	Endotelceller
ECL	Enhanced chemiluminescens
ECM	Ekstracellulær matriks
FPP	Farnesyl pyrofosfat
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase
GGPP	Geranylgeranyl pyrofosfat
GTP	Guanosin trifosfat
HMG-CoA	Tre-hydroksey-3-metylglutaryl koenzym A
HRP	”Horseradish” peroksidase

Forkortelser

HIS-tag	Polyhistidin ”tag”
IC ₅₀	“Half maximal inhibitory concentration”
ICAM	Intracellulært adhesjonsmolekyl
IEL	“Internal elastic lamina”
IFN	Interferon
IκB	Inhibitorisk κB-bindende protein
IKK	IκB-kinase
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LDLR	Low-density lipoprotein receptor
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
Lp-PLA2	Lipoprotein-assosiert fosfolipase A2
MCP-1	Makrofag kjemoattraktant protein-1
MHC	Major histocompatibility complex
ML	Mevalonolakton
MMP	Matriks metalloprotease
mRNA	“Messenger” ribonukleinsyre
MTS	(3-(4,5-Dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid
N ₂	Nitrogen
NADPH	Nikotinamid adenine dinukleotid fosfat

Forkortelser

NF- κ B	Kjernefaktor κ B
NK	Natural killer
NO	Nitrogenoksid
ox-LDL	Oxidized low-density lipoprotein
PAF	Plateaktiverende faktor
PDGF	Platederivert vekstfaktor
PES	Fenazin etolsulfat
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
rhLeg	Rekombinant humant prolegumain
SDS	Natriumdodekylsulfat
SEM	Standardfeil (standard error of the mean)
SMC	Glatte muskelceller
TEMED	Tetrametyletylendiamin
TF	Vevsfaktor
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteases
TM	Trombomodulin
TNF α	Tumor nekrosefaktor- α
TLR	Toll-like reseptor
UV	Ultrafiolett
VCAM-1	Vaskulær celleadhesjonsmolekyl-1
Z-Ala-Ala-Asn-NH ₂ Mec	Benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-

Z-Arg-Arg- NH₂Mec

asparagin-7-(4-metyl)-kumarylamid

Benzyloksykarbonyl-arginin-arginin-7-
amino-4-metylkumarin

1. Innledning

1.1 Aterosklerose

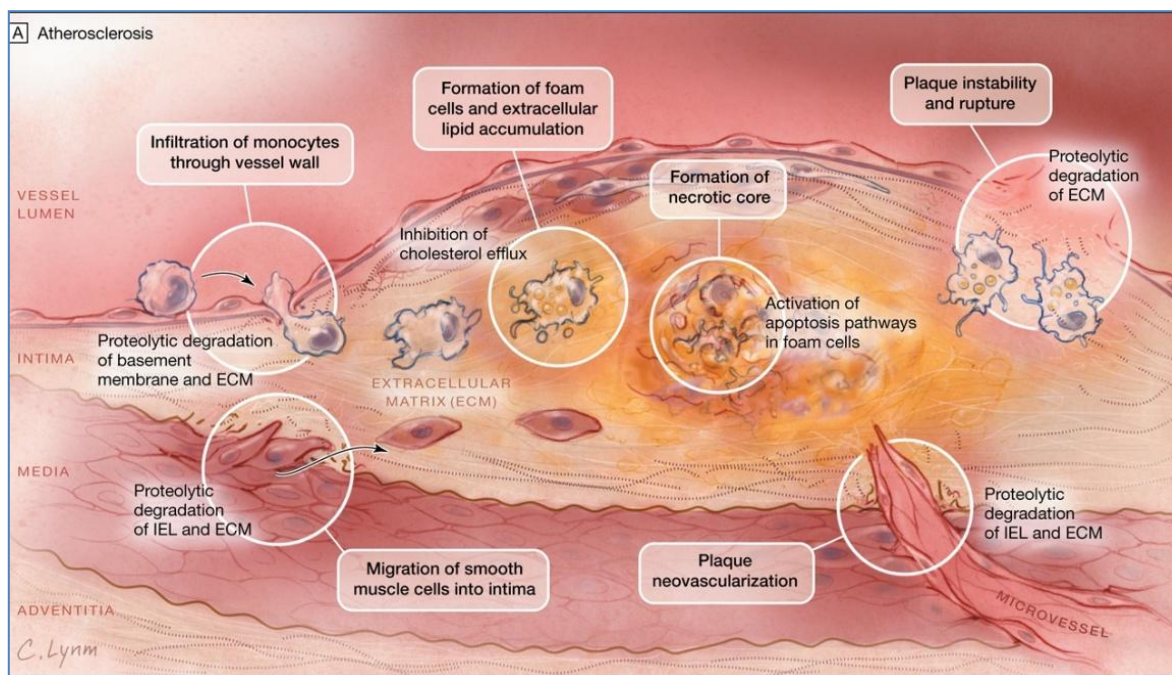
Aterosklerose er en kronisk, inflammatorisk sykdom som utgjør en viktig dødsårsak i den vestlige verden. Utviklingen av aterosklerose skjer gradvis over tid, og kjennetegnes ved avleiring av lipoproteiner, degradering og remodellering av ekstracellulær matriks, migrasjon og proliferasjon av aktiverte, glatte muskelceller, og overrekruttering av monocytter/makrofager i arterielle lesjoner [1, 2].

Ekstracellulær matriks (ECM) består hovedsakelig av elastin og kollagen, og er essensielt for homeostasen i arterieveggen. ECM fungerer som et adhesivt substrat for vaskulære, endotelceller (EC) og glatte muskelceller (SMC). Det videresender overlevelsessignaler til naboceller, binder og holder igjen lipoproteiner, og virker som et reservoar for vekstfaktorer [3]. Elastin og kollagen bidrar også til styrken, robustheten og den strukturelle integriteten i arterieveggen [4, 5]. I normale vev er uttrykk og ”turnover” av ECM strengt regulert, men ved skade eller remodellering av vevet ved tilstander som aterosklerose, vil en forstyrrelse i reguleringen kunne bidra til forekomst og progresjon av sykdommen. Utviklingen av aterosklerose kan deles inn i 3 stadier; initiering, progresjon og komplikasjoner. Patologiske prosesser som gjenspeiler stadiene er proteolyse, translokasjoner av monocytter fra blodsirkulasjonen, progressiv migrasjon av SMC gjennom elastiske lamina, og brudd i arterieveggen [6, 7].

Makrofager er sterkt assosiert med kroniske inflammasjoner, herunder aterosklerose. De fungerer som ”scavenger” celler, såkalte mediatorceller i immunsystemet, og har evne til å frigjøre kjemotaktiske molekyler, cytokiner og proteaser. Makrofager deltar i opptaket og metabolismen av lipider i den tidlige fasen av aterogenesen, og kan fremskynde prosessen ved hjelp av flere mekanismer [8]. Monocytter differensieres til makrofager når de rekrutteres av kjemoattraktanter til områder med endotelskade. Dette skjer ved binding på overflaten av EC, via vaskulær celledhesjonsmolekyl-1 (VCAM-1), og kjemoattraktanter som makrofag kjemoattraktant protein-1 (MCP-1) [9]. Monocyttene vil deretter migrere fra lumen og infiltrere basalmembranen og subendotelet ved hjelp av adhesjonsmolekyler, som ”lymphocyte function-associated antigen 1” (LFA-1) og $\alpha_v\beta_3$ -integrin, hvor de differensieres

til makrofager og tilegner seg fagocytisk aktivitet. Videre vil makrofagene proliferere, ta opp og akkumulere oksidert "low-densitylipoprotein" (ox-LDL) og utvikles til lipidfylte skumceller. Disse skumcellene vil gjennom apoptose eller nekrose danne grunnlaget for den nekrotiske lipidkjernen i aterosklerotiske plakk [10, 11].

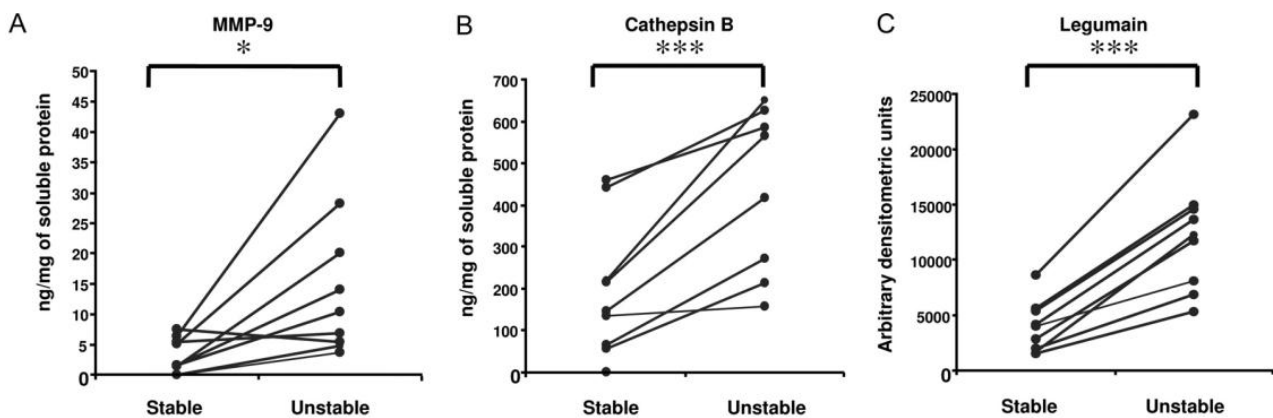
Aktiverte makrofager og skumceller utskiller proteaser og vevsfaktorer som degraderer basalmembranen, ECM og "internal elastic lamina" (IEL) i arterieveggen (Fig. 1-1). Dette vil forårsake remodelleringer av vev, hvor SMC migrerer fra media, og hvor T-lymfocytter og monocytter migrerer fra lumen til intima [10]. ECM-degradering kan også medføre neovaskularisering i plakk, hvor små blodkar vokser fra vasa vasorum i adventitia og tunica media.



Figur 1-1: De ulike patologiske prosessene involvert i utviklingen av aterosklerose [12].

Mikrovaskulaturen vil forsyne plakket med leukocytter og plasmakomponenter som lipoproteiner [9]. På denne måten bidrar makrofager og skumceller til plakkruptur og trombedannelse, som resulterer i økt morbiditet og mortalitet [10].

Studier har vist at det skjer en endring i genuttrykket i arterier fra de er normale til de blir aterogene. Det er blant annet vist en oppregulering av gener som uttrykker cysteinproteasene legumain og cathepsiner, og matriks metalloproteaser. Disse proteasene har funksjoner som bidrar til destabilisering av aterosklerotiske plakk, ved økt inflammasjon og degradering av den fibrøse kappen. Det er forsket på stabile og ustabile aterosklerotiske plakk hvor man sammenlikner genuttrykket i de forskjellige plakkene. Resultater viser en signifikant økning i proteinuttrykk av de forskjellige proteasene i ustabile i forhold til i stabile plakk (Fig.1-2). Stabile plakk kjennetegnes mikroskopisk ved en intakt, fibrøs kappe med en glatt overflate, mens ustabile plakk gjerne har erosjoner i intima, sprekker i den tynne og fibrøse kappen, eksponering av nekrotisk kjerne og preg av tromber og blødninger innad i plakket [13].

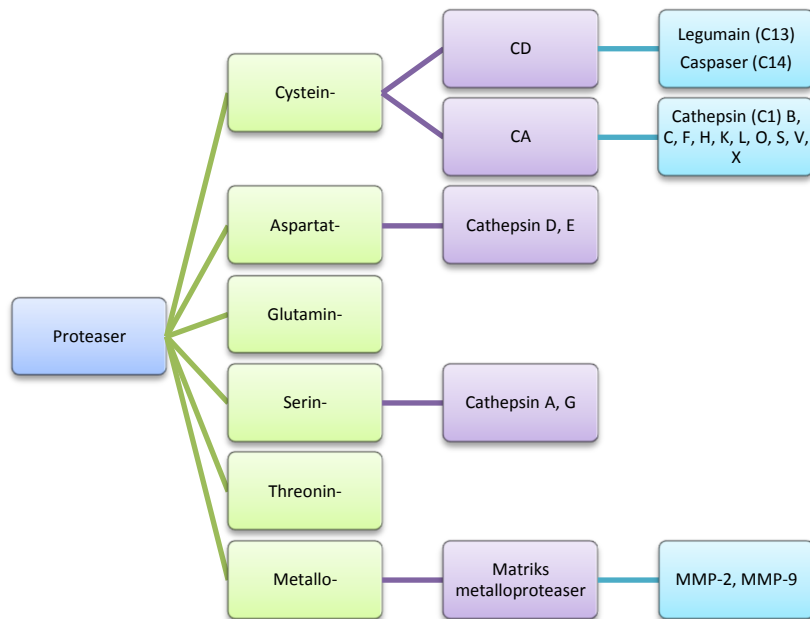


Figur 1-2: Proteinnivåer av MMP-9 (A), cathepsin B (B) og legumain (C) i stabile og ustabile aterosklerotiskeplakk i halspulsåren (Carotis arterien) fra pasienter [13].

1.2 Proteaser

Proteolytiske enzymer (proteaser) utøver forskjellige mekanismer for hydrolysering av substrater. Basert på denne egenskapen klassifiseres de som enten serin-, cystein-, threonin-, asparagin-, metallo- eller glutaminproteaser (Fig.1-3). Sistnevnte er den eneste subtype som ikke er identifisert i pattedyr. Proteaser kløyver proteinsubstrater spesifikt enten fra N- eller C-terminalen (eksopeptidaser eller henholdsvis aminopeptidaser og karboksypeptidaser), og/eller inne i et protein (endopeptidaser). Proteaser ble først assosiert med

proteindegraderinger relatert til fordøyelse av mat og intracellulær ”turn over”. Senere ble det kjent at proteaser også inngår i reguleringen av viktige fysiologiske prosesser som progresjon av cellyklus, celleproliferasjon og -død, DNA-replikasjon, vevsmodelleringer, hemostase (koagulasjon), sårheling, immunrespons, fibrinolyse, antigenprosessering også videre [14, 15].



Figur 1-3. Oversikt over de ulike hovedgrupper av proteaser og tilhørende klaner

Proteolytiske enzymer kan inngå i patogenesen av aterosklerose i ulike trinn, som infiltrasjon av leukocytter i subendoteliale områder, migrasjon av SMC til intima, degradering av ECM, destabilisering av plakk og neovaskularisering. Ulike proteaser som tilhører familier av matriksmetallo-, serin- og cysteinproteaser har vist seg å være involvert i aterosklerose [16].

Cysteinproteaser danner en stor gruppe av proteolytiske enzymer, som kan inndeles etter deres molekylære strukturer. Fire familier av cysteinendopeptidaser er påvist i pattedyr. Den største familien er papainfamilien (C1), som inkluderer cathepsin B, H, L, S med flere. Disse er hovedsakelig lysosomale enzymer som er ansvarlige for proteolyse i lysosomale/endosomale systemer, men kan også skilles ut ekstracellulært. I den cytosoliske cellefraksjonen er det enzymer som er medlemmer av 3 andre familier av

cysteinendopeptidaser: calpainfamilien (C2), legumain (C13) og caspasefamilien (C14). Disse proteasene medierer begrenset proteolyse av cytosoliske substrater [14, 17].

1.3 Legumain

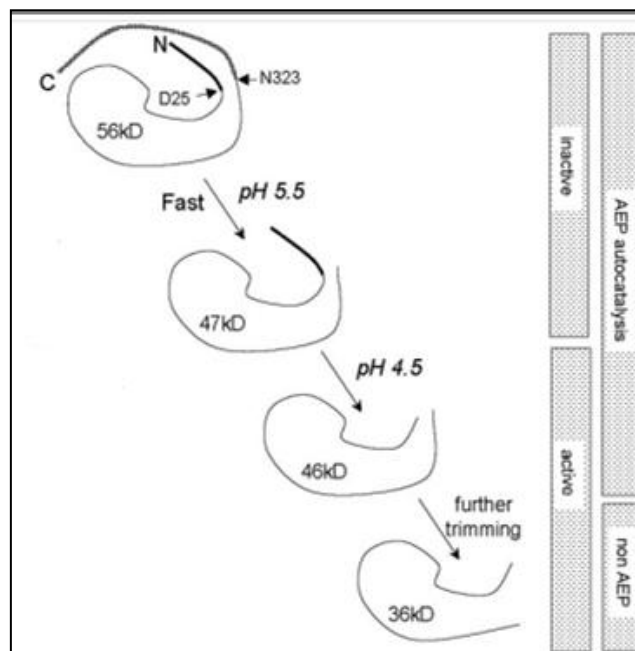
Legumain, også kalt asparaginyln-endopeptidase, tilhører som nevnt C13-familien av cysteinproteaser [16, 17]. Legumain er en lysosomal endopeptidase, som aktiveres autokatalytisk, og utviser en meget høy spesifisitet for kløyving av proteinsubstrater på C-terminal side av asparagin [17]. Denne spesifisiteten er uvanlig for lysosomale enzymer [18]. Både *in vitro* og *in vivo* studier indikerer at legumain deltar i prosesseringen av cysteinproteasene cathepsin B, H og L, i aktiveringen av matriks metalloprotease 2 (MMP-2), i prosesseringen av α -thymosin og i degraderingen av fibronektin [19-22]. Legumain finnes i mange celletyper, og ble først oppdaget i belgfrukter og kornvarer hvor den fungerer som et vakuoleprosesserende enzym. Plantelegumain har også blitt vist å kunne trigge virusindusert, programmert celledød [23].

Enzymet ble senere påvist i parasitter (1993) og deretter i pattedyr (1997), og er vist å utgjøre et viktig nøkkelenzym i prosesseringen av fremmed-antigener, som tetanustoksiner, ”major histocompatibility complex klasse II” (MHC II) komplekser, og i destruksjonen av autoantigener [17, 24-27]. Videre kan legumain aktivere toll-like reseptor 9 (TLR-9) og bidrar dermed i den medfødte immunresponsen mediert av dendrittiske celler [28]. Overuttrykk av enzymet er assosiert med økt invasjon og metastase av mange tumorer. Proteasen er på grunn av dette og dens nøyaktige substratspesifisitet et attraktivt målmolekyl for lokal aktivering av prodrugs i tumorvev [29, 30]. Legumain kan i tillegg ha protease-uavhengige egenskaper ved at det C-terminale fragmentet har vist en hemmende effekt på osteoklastdannelse og benresorpsjon [31, 32].

1.3.1 Autoaktivering av legumain

Legumain eksisterer i mange ulike mammalske vev, som i nyrer, placenta, milt, lever og testikler [33]. Blant disse organene, er enzymaktiviteten høyest i nyrer, hvor legumain hovedsakelig er uttrykt i proksimale tubuli [20]. I legumain-”knock out”-mus er det blitt vist forstørrede lysosomer, og at prosesseringen av lysosomale peptidaser i nyrene var ufullstendig. Dette indikerer at legumain kan ha en viktig rolle i lysosomale funksjoner i

proksimale tubuli [20, 22]. Under fysiologiske forhold er legumain tilstede i sure endosomale og/eller lysosomale områder, og utøver funksjoner i intracellulær proteindegradering [8, 13, 22]. Enzymet er i likhet med cathepsinene i C1-familien, ustabilisert ved nøytral pH. Legumain utviser størst enzymaktivitet ved pH 6,6, og oppnår en optimal enzymstabilitet ved pH 5,5. Når pH går under 5,5 vil inaktivt, helkjedet legumain på 56 kDa undergå en autokatalytisk kløyving av det C-terminale domenet ved asparagin³²³, og resultere i en intermediær form på 47 kDa (Fig.1-4). En videre senkning i pH vil medføre kløyving av det korte N-terminale peptidet ved aminosyren aspartat²⁵, og produsere den aktive formen på 46 kDa. *In vivo* vil det skje en ytterligere prosessering, noe som resulterer i en konvertering av 46 kDa-formen til den modne legumainformen på 36 kDa. Forskjellen i enzymatisk aktivitet skal ikke være signifikant forskjellig mellom de to aktive formene [17, 18]. Legumain hemmes effektivt av ulike medlemmer i cystatin protein-inhibitor familien, inkludert cystatin C, F og E/M [34, 35].



Figur 1-4: Cellulær prosessering av legumain. Inaktiv legumain proform på 56 kDa konverteres autokatalytisk til 47 kDa og aktivt 46 kDa ved senkning av pH, og videre kløyving ved hjelp av endogene proteaser resulterer i moden legumainform på 36 kDa [18].

1.3.2 Legumain i aterosklerotiske plakk

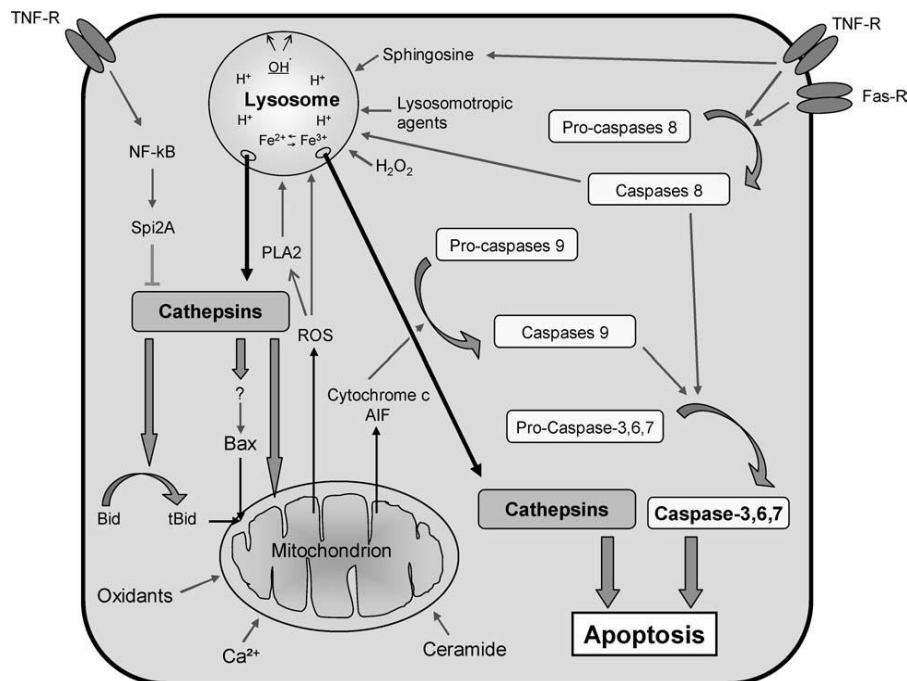
Nyere data indikerer at det skjer en oppregulering av legumain-mRNA i områder med ustabile aterosklerotiske plakk i forhold til stabile plakk, både på mRNA- og proteinnivået [8, 13, 16]. Legumain uttrykkes av makrofager *in vitro* og det er blitt observert legumain-mRNA kolokalisert med makrofager i skulderregionene i aterosklerotiske plakk. En studie har vist signifikant korrelasjon mellom uttrykk av legumain og makrofager, noe som tyder på at legumain produseres i stor grad av makrofager i plaket. Funnene av økt legumainuttrykk i ustabile plakk viser at enzymet kan ha en funksjon i destabiliseringen av den fibrøse kappen, antakeligvis ved å modulere proteaseaktivitet og medfølgende ekstracellulær matriks "turnover" [13].

1.4 Cathepsiner

Cathepsiner er en familie av protolytiske enzymer som er involvert i degraderingen av ECM. ECM-degradering fører til en fortynning av den fibrøse kappen, og kan resultere i plakkruptur og trombedannelse. Basert på cathepsinenes katalytiske sete, inndeles de i cystein-, serin- og aspartatproteaser [10]. De fleste av cathepsinene er endopeptidaser, selv om cathepsin B og H også kan fungere som dipeptidyl-karboksyptidaser og -aminopeptidaser. Cathepsiner blir syntetisert som preproenzymer, som videre blir prosessert til procathepsiner ved kløyving av et prepeptid under transport til det endoplasmatiske retikulum. Det aktive cathepsinet kan deretter bli dannet etter proteolytisk kløyving av et propeptid i surt miljø, i endosomer eller lysosomer. Sistnevnte prosess involverer flere ulike proteaser. Propeptidet bidrar til økt stabilitet, bedret folding og forebygging av uønsket proteaseaktivitet. De fleste cathepsiner som cathepsin B, F, H, K, L og V utviser en optimal enzymaktivitet i surt miljø, og er svakt aktive ved nøytral pH. Cathepsin S fungerer derimot optimalt ved nøytral pH [11].

Under fysiologiske forhold er cathepsiner lokalisert intralysosomalt. Det er økende bevis for at cathepsiner også kan fungere utenfor lysosomer og endosomer. Enzymene frigjøres fra lysosomene til cytoplasma hvor de aktiverer ulike biologiske og patologiske signalveier, inkludert ECM-degradering, inflammasjon og apoptose, som respons på signaler fra

inflammatoriske cytokiner (eks. interleukin-1 β (IL-1 β), tumor nekrosefaktor- α (TNF- α), eller interferon- γ (IFN- γ)). For eksempel kan lekkasje av lysosomer resultere i en translokasjon av cathepsiner til cytosol og induksjon av apoptose gjennom en mulig caspaseavhengig mekanisme (virkningsmekanismen er ikke fullstendig klarlagt, men kan avhenge av hvilke cathepsiner som er involvert) (Fig.1-5) [10].



Figur 1-5: Lysosomale enzymer i proapoptosisk signalkaskade. Frigjøringen av cathepsiner til cytoplasma trigger en kaskade av intracellulære hendelser. Cathepsiner kan indukere apoptose og celledød ved å forsterke caspaseaktivering og katalysere degraderingen av substrater nødvendig for celleoverlevelse [36].

1.4.1 Cystatiner hemmer legumain og cathepsiner

Både legumain og cathepsiner reguleres av endogene proteaseinhibitorer kalt cystatiner [12, 37]. Cystatinfamilien inndeles i 4 subfamilier: stefiner (type 1), cystatiner (type 2), kininogener (type 3) og ulike strukturelt like men ikke inhibitoriske proteiner (type 4). Type 1 cystatiner er cystatin A og B, som lokaliseres intracellulært, men som også kan fremkomme i kroppsvæsker i målbare konsentrasjoner. Type 2 cystatiner fungerer hovedsakelig ekstracellulært og inkluderer cystatin C, F og E/M [10, 35, 37]. Cystatin C har blitt funnet i de

fleste kroppsvæsker, mens uttrykk av cystatin E/M er begrenset til lungeepitel, hudkeratinocytter og svettekjertler, og cystatin F til immunceller som CD8-positive T-celler, ”natural killer” (NK) celler og neutrofile celler [38]. Type 3 cystatiner inkluderer kininogener, som er å finne i plasma. Cystatin C, F og E/M kan danne reversible komplekser med høy affinitet til cathepsiner og legumain på to distinkte bindingssteder. På denne måten fungerer cystatiner som en beskyttelse mot irregulær aktivitet av proteaser fra lysosomer som for eksempel under apoptose eller fagocytisk degranulering [34, 35, 39]. Cystatiner virker også som et forsvar mot proteaser utskilt av prolifererende cancerceller eller av invaderende fremmedorganismer, som parasitter. Blant cystatinene er cystatin E/M den meste potente legumain-hemmeren, og cystatin C den mest potente cathepsin-hemmeren, sistnevnte med størst inhiberende effekt mot cathepsin L og S, og deretter cathepsin B og H [10, 34, 35]. Cystatin C filtreres fritt og metaboliseres i nyrene. Uforbundet med cystatin C sine proteasehemmende egenskaper, har fokuset på proteinets rolle som surrogatmarkør for mål på nyrefunksjon vært stadig voksende, og det antas å være like pålitelig som serumkreatinin i denne sammenhengen [37]. Cystatin C er detektert i normale arterier, men er betydelig redusert i aterosklerotiske og aneurismatiske lesjoner [40]. Videre er det blitt rapportert reduserte konsentrasjoner av cystatin C i serum hos pasienter med abdominale, aortiske aneurismer. Observasjonene tyder på at proteinet kan ha en anti-aterogen rolle. I motsetning til disse resultatene har epidemiologiske studier rapportert et positivt forhold mellom forhøyede nivåer av cystatin C og kardiovaskulære hendelser i utvalgte populasjoner, inkludert eldre pasienter med en etablert vaskulær sykdom, eller med økt kardiovaskulær risiko. Disse motstridende observasjonene kan indikere at en forhøyet cystatin C-konsentrasjon kan skyldes en kompensatorisk mekanisme for å redusere pro-aterogen cathepsinaktivitet [37].

1.4.2 Cathepsiner regulerer vevsremodellering

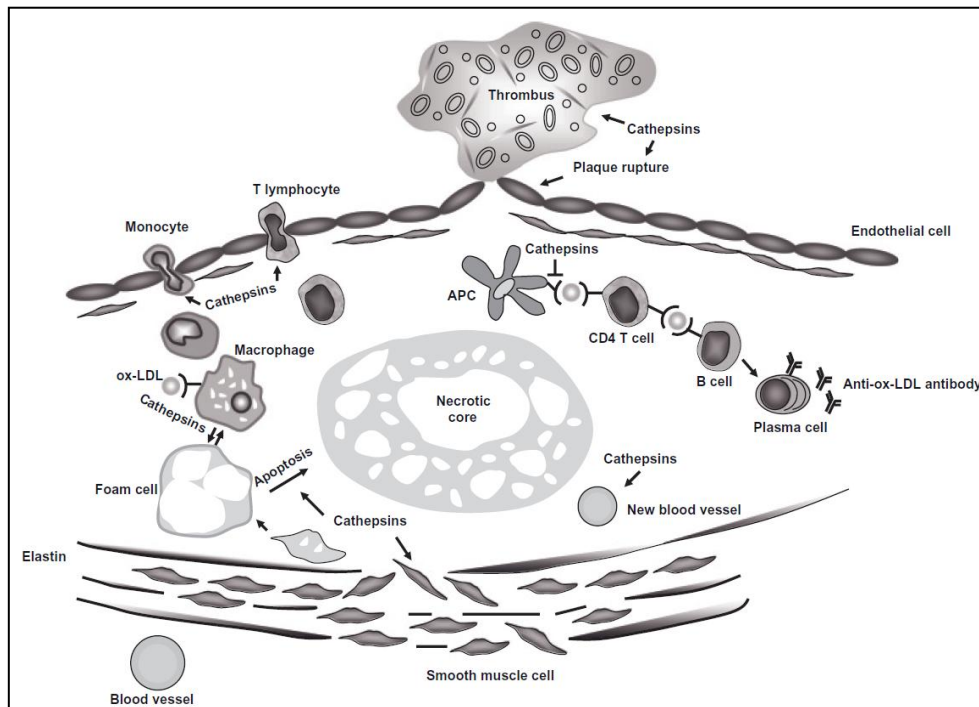
Cathepsinene deltar ikke bare i intralysosomal proteindegradering, men bidrar også i vevsremodelleringer ved degradering av ECM (tabell 1-1). Cathepsin S er uttrykt og utskilt i fettvev [41], og oppreguleres ved fedme, diabetes og hjerte- og karsykdommer [12]. Hos hjertesviktpasienter er det blitt påvist et økt uttrykk av både cathepsin S og B i venstre ventrikkel og i hjertemyokard. Dette kan indikere at enzymene medvirker i utviklingen av hjertesvikt [42]. Videre er det blitt observert forhøyet uttrykk av cathepsin B, D, L og S i flere typer tumorer, og det er dermed antatt at enzymene er involvert i tumorvekst og metastase

[38, 43-48]. Cathepsiner uttrykkes av de fleste plakkceller, som makrofager, EC og SMC. Forskjellige studier har vist at både mRNA- og/eller proteinnivåer av cathepsin B, F, L, K og S var økt i aterosklerotiske lesjoner hos mennesker eller mus, sammenliknet med friske, normale arterier.

Tabell 1-1: Cathepsiner i vevsremodellering [10].

<i>Vevsremodellering</i>	<i>Cathepsin</i>
Degradering av benmatriks (benresorpsjon)	Cathepsin K
Økt dannelse av fettvev	Cathepsin S
Strukturell remodellering av hjertemyokard som fører til ventrikulær dysfunksjon	Cathepsin B og S
Tumorvekst og metastase	Cathepsin B, D, L og S
Nevrodegenerering	Cathepsin D
Degradering av glomerulære basalmembran	Cathepsin B, H og L

Det ble observert spesielt høye konsentrasjoner av cathepsin K og S i makrofager lokalisert i skulderregionene av humane plakk, i SMC i den fibrøse kappen, og i deler av den indre, elastiske laminaen. Dette kan tyde på at SMC og makrofager bruker cathepsiner til å infiltrere og destabilisere aterosklerotiske plakk. EC, som ligger langs lumen av arterien, og mikrovaskulaturen i plaket uttrykte cathepsin S, noe som kan bety at enzymet er involvert i neovaskularisering, en prosess som er involvert i plakkvekst (Fig.1-6) [9, 10]. De små blodårene som dannes ved neovaskularisering er skjøre, og kan føre til blødninger i plaket og forsterket inflammasjon og gi økt risiko for trombotiske komplikasjoner [49]. I apoE-”knock-out”-mus har man sett at en nedgang i cathepsin S, K og L medfører redusert aterosklerose [37]. Dette kan indikere cathepsinenes rolle i aterogenesen. Videre er konsentrasjonen av cathepsin S i serum assosiert med økt kardiovaskulær- og cancermortalitet. Dette ble vist i to svenske kohort-studier (ULSAM- og PIVUS studien) blant eldre pasienter med en gjennomsnittlig alder på 70 år. Assosiasjonen mellom cathepsin S og økt mortalitet så dessuten ut til å være sterkere blant kvinner enn menn [12, 50, 51].



Figur 1-6: Potensielle roller av cathepsiner i aterosklerose. Oversikt over de potensielle rollene til cathepsiner i utviklingen av aterosklerose. Cathepsiner uttrykkes i EC, SMC, makrofager og skumceller. De kan degradere ECM som består av elastin og kollagen, noe som bidrar til migrasjon av SMC og T-lymfocytter fra media eller sirkulasjonen over i intima. ECM-degradering ved cathepsiner kan medføre neovaskularisering. Cathepsiner inngår i dannelsen og apoptose av skumceller, og kan indukere plakkruptur og trombosedannelse [10].

1.4.3 Cathepsin B

I en studie hvor cathepsin B ble målt i ustabile og stabile plakksegmenter, ble det sett en signifikant økning av cathepsin B-proteinuttrykket i de ustabile segmentene [13]. Cathepsin B er substrat for legumain [13, 16], og uttrykkes hovedsakelig av makrofager, men også av SMC. I aterosklerotiske lesjoner fra apoE-^{-/-} "knock-out"- mus, er det blitt vist forhøyede nivåer av både mRNA og protein av cathepsin B. Proteasen sekreseres som procathepsin B, men aktiveres ved kløyving i surt miljø etter reopptak i Golgi og lysosomer [52].

1.5 Matriks metalloproteaser (MMP-er)

MMP-er er en gruppe av sinkavhengige endopeptidaser (tabell 1-2). Enzymenes evne til å degradere ekstracellulær matriks, herunder kollagen, elastin, gelatin og kasein, skiller dem fra andre endopeptidaser [53-56]. MMP-er har blitt vist å være viktige medspillere i celleproliferasjon, apoptose og ikke minst i aktivitetsreguleringen av kjemokiner og cytokiner. Humane makrofager er kjent for å produsere MMP-er, inkludert MMP-1, -3, -7, -9 og -12 [54]. MMP-er skilles ut som proenzymmer, og kan degradere alle ekstracellulære matrikskomponenter etter aktivering. Av de ulike MMP-ene viser studier at legumain kan prosessere og aktivere proMMP-2 [21]. De proteolytiske egenskapene til MMP-er kan bli regulert av komplekse mekanismer på transkripsjons- og translasjonsnivået, av posttranslasjonelle modifikasjoner, og av deres endogene hemmere TIMPs («tissue inhibitors of metalloproteinases») [13, 56, 57].

Tabell 1-2: Inndeling og oversikt over de ulike MMP-ene [53].

MMP-gruppe	MMP
Kollagenaser	MMP-1, MMP-8 og MMP-13
Gelatinaser	MMP-2 og MMP-9
Stromeolysiner	MMP-3 og MMP-11
Matrilysiner	MMP-7
Membranbundet MMP	MMP-14
Andre MMP-er	MMP-12

Forandringer i MMP-uttrykk i hjerte og blodkar er blitt observert i patogenesen av ulike aterosklerotiske tilstander og det er antatt at enzymene bidrar i utviklingen og progresjonen av aterosklerose. Vekst av aterosklerotiske plakk, også kjent som negativ remodelering, innebærer proliferasjon og migrasjon av SMC i åreveggen. Denne progresjonen er hovedsakelig avhengig av MMP-2 og -9, som kan degradere type IV og V kollagen som omgir SMC [53, 56-58]. Dette betyr at det er MMP-2 og -9 som står for mesteparten av degraderingen av kollagen i aterosklerotiske plakk. Kollagen er hovedkomponenten i fibrøse kappevegger som bidrar til økt kappestyrke. Ved plakkruptur er det vist et lavere innhold av

kollagen og SMC (kollagensyntetiserende celler) i forhold til intakte kapper [57]. Det er blitt observert forhøyede nivåer av MMP-1, -2, -3, -7, -9, -10, -11 og -12 i aterosklerotiske blodårer, sammenliknet med normale. Aktiverte makrofager i aterosklerotiske lesjoner utgjør den største kilden til MMP-protein- og mRNA-uttrykk. Videre er det strukturelle komponenter i åreveggen som også er en kilde til MMP-produksjon, herunder SMC og/eller EC som kan uttrykke MMP-1, -2, -3, -11, -13 og -14 [53, 57].

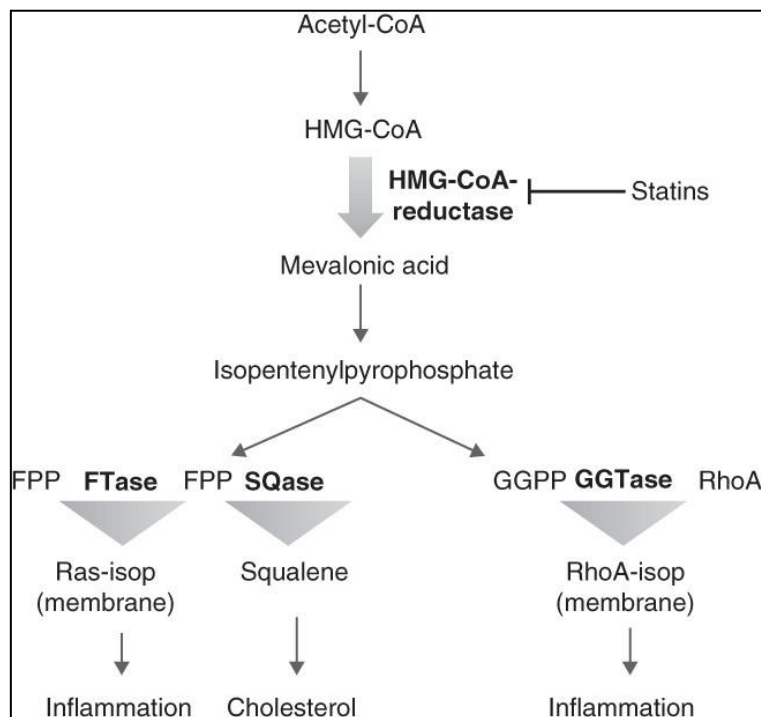
1.6 Statiner

Tre-hydroksey-3-metylglutaryl koenzym A (HMG-CoA) reduktasehemmere, også kjent som statiner, er kolesterolsenkende legemidler som reduserer mortaliteten av kardiovaskulære sykdommer. De virker ved å hemme HMG-CoA-reduktase som er nøkkelenzymet i konverteringen av HMG-CoA til mevalonsyre. Mevalonsyre er en kjent forløper til kolesterol, og gjennomgår en konvertering til farnesyl pyrofosfat (FPP). To molekyler av FPP konverteres videre til presqualene difosfat, som igjen konverteres til squalen ved en totrinns-enzymatisk reaksjon, katalysert av squalensyntase. Denne synteseveien fører til syntese av kolesterol [54, 58, 59]. Årsaken til myotoksisitet, som er en kjent bivirkning ved bruk av statiner, kan forklares delvis gjennom hemmingen av mevalonsyresyntesen. Mevalonsyre er nemlig et intermediat for syntesen av coenzymet Q₁₀ (CoQ₁₀) og CoQ₁₀ er et steroid isoprenoid som spiller en viktig rolle i den cellulære energiomsetningen i mitokondrienes elektrontransportkjede [54].

1.6.1 Statiners pleiotrope effekter

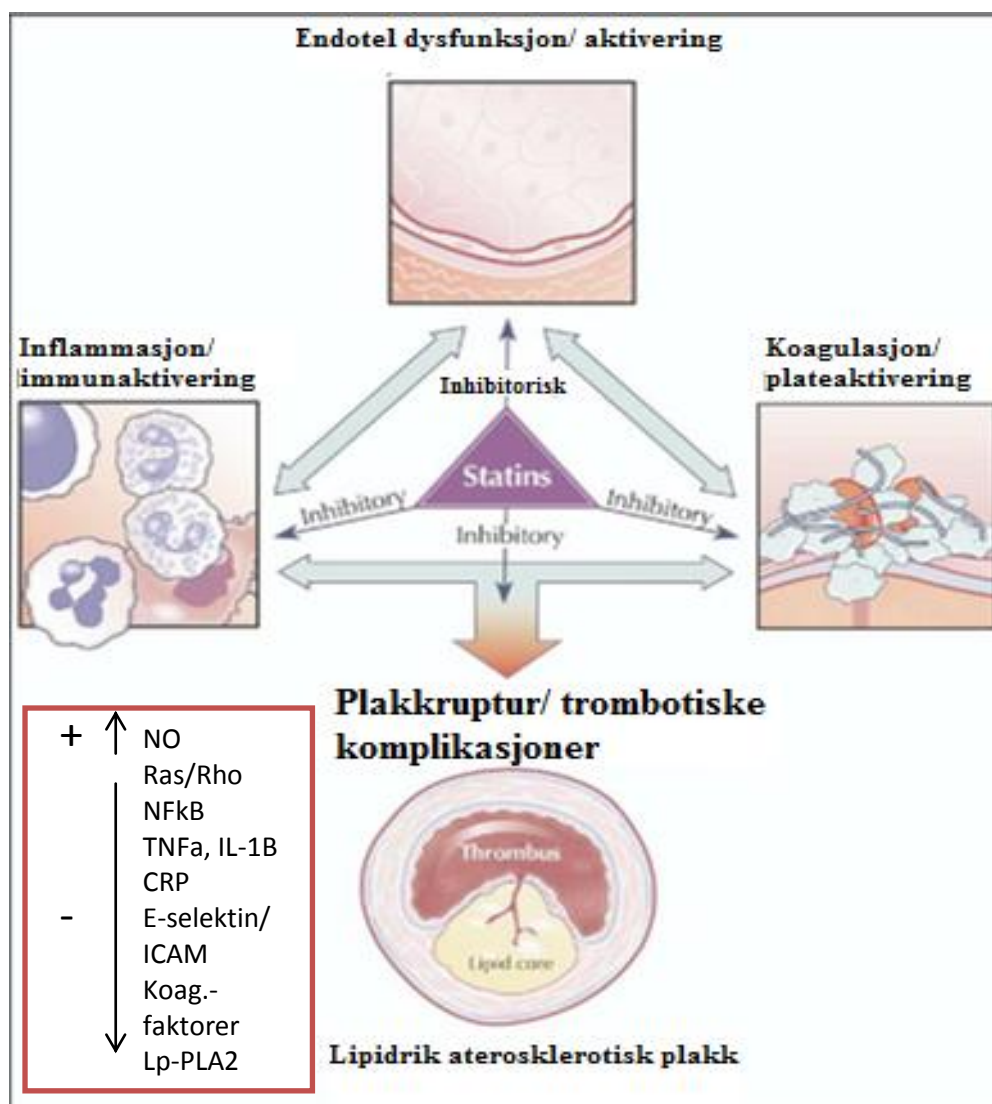
Nylig har statinene fått mye oppmerksomhet rundt deres pleiotrope effekter, det vil si effekter som strekker seg utover de velkjente kolesterolsenkende effektene. Disse kolesterol-uavhengige egenskapene av statiner inkluderer antiinflammatoriske, antikoagulerende, antitrombotiske og antioksidanteffekter, og bedring av endotel dysfunksjon [8, 60, 61]. Ved å hemme mevalonsyresyntesen, hemmer statinene også produksjonen av enkelte isoprenoid-intermediater som FPP og geranylgeranyl pyrofosfat (GGPP), som har en sentral rolle ikke bare i syntesen av kolesterol, men også i modifiseringen av enkelte proteiner [54, 61]. Statiner kan inhibere prenyleringen og dermed aktiveringen av små GTP-bindende proteiner inkludert Ras og Rho (Fig. 1-7), noe som kan medføre en redusert produksjon av inflammatoriske mediatorer. Inaktivering av Ras og Rho har vist å redusere NF- κ B-migrasjonen inn i

cellekjernen og derav binding til DNA og gentranskripsjon [54, 61, 62]. NF- κ B produseres blant annet i aktiverte makrofager og spiller en viktig rolle i cellulær respons til stress, cytokiner, ultrafiolett (UV) stråling og frie radikaler. Deregulering av NF- κ B er blitt observert ved kreft, sepsis og autoimmune- og inflammatoriske sykdommer. NF- κ B i cytoplasma er bundet til et inhibitorisk protein ("inhibitory κ B-binding protein" (I κ B)). Ved isoprenylering av Ras og Rho aktiveres en spesifikk I κ B-kinase (IKK) som dermed fosforilerer og degraderer I κ B. Etter degradering av I κ B vil NF- κ B være fri og migrere inn i cellekjernen og aktivere transkripsjon av inflammatoriske mediatorer som TNF- α og IL-1 β . Disse mediatorene kan igjen aktivere IKK og forsterke produksjonen av inflammatoriske mediatorer. Dette bidrar til å indusere økt proliferasjon og produksjon av inflammatoriske cytokiner, kjemokiner og proteaser hos makrofager. Denne inflammasjonskaskaden hemmes altså av statiner ved inhibering av mevalonsyresyntesen [54, 59].



Figur 1-7: Virkningsmekanismen av statiner. Statinene hemmer HMG-CoA-reduktase, enzymet som konverterer HMG-CoA til mevalonsyre. Mevalonsyre er forløper til kolesterol og isoprenoidene farnesyl pyrofosfat (FPP) og geranyl geranyl pyrofosfat (GGPP). FPP og GGPP isoprenylerer to små G-proteiner (Rho og Ras) og aktiverer dem, noe som muliggjør binding av proteinene til membranen. Ved å hemme dannelsen av FPP og GGPP så hemmes isoprenyleringen av intracellulære signalmolekyler som Rho og Ras [54].

Statinenes fordelaktige effekter på endotelfunksjon er relatert til oppregulering av nitrogenoksid (NO) (Fig.1-8). NO produseres av endotelceller og fungerer som en viktig vasodilator i blodkar, og er involvert i hemmingen av blodplateaktivering. Endotel-dysfunksjon kjennetegnes blant annet ved redusert NO-produksjon eller -aktivitet [63]. En skadet endoteloverflate som eksponeres for koagulasjonsfaktorer i blod kan trigge trombosedannelse. Statiner kan fremskynde helingsprosessen i skadet endotelvev ved å øke antall og overlevelse av sirkulerende endotelstamceller og mobilisere de til skadet endotelvev.



Figur 1-8: Pleiotrope effekter av statiner. Statiner kan uavhengig av de kolesterolsenkende egenskapene ha antiinflammatoriske, antitrombotiske og antioksidanteffekter og forebygge endotel dysfunksjon [60].

Studier viser også at statiner reduserer uttrykk av adhesjonsmolekyler som E-selektin, VCAM-1 og ICAM-1 på endoteloverflaten, som resulterer i at færre inflammatoriske celler binder seg til aktivert endotel, og statiner kan dermed gi økt plakkstabilitet [60, 64, 65]. Statiner har også evne til å øke uttrykket av trombomodulin (TM) på celleoverflaten og redusere uttrykket av vevsfaktor (TF) i endotelceller ved å hemme Rho. Dette fører til redusert produksjon av trombin og økt aktivering av protein C som stimulerer antikoagulasjonskaskaden. I tillegg utviser statiner systemiske effekter på koagulering ved å redusere nivåer eller aktivering av koagulasjonsfaktorer som faktor VII, protrombin, faktor Va og XIII [60]. Studier har vist at statiner også utviser antioksidantegenskaper blant annet ved å redusere lipoprotein-assosiert fosfolipase A2 (Lp-PLA2). Lp-PLA2 sekreses av inflammatoriske celler, katalyserer hydrolyse av plateaktiverendefaktor (PAF) og oksiderte fosfolipaser som dannes under oksidativ modifisering av LDL. Hemming av Lp-PLA2 kan stabilisere ustabile plakk. Antioksidantmekanismer av statiner har også vist reduksjon av hjertehypertrofi [8, 61].

1.6.2 Statiner og aterosklerose

Aktiverte makrofager spiller en svært sentral rolle i utviklingen av aterosklerotiske plakk. I en klinisk studie ble effekten av atorvastatin på monocytter/makrofager målt hos pasienter med påvist hjerte- og karsykdom. Det ble vist at atorvastatin hadde en antiinflammatorisk effekt, hvor mRNA av både legumain og MMP-1 ble signifikant redusert etter 2 ukers behandling. Legumainuttrykket ble redusert ytterligere ved forlenget behandlingstid over 2 uker [8].

Studier på humane primærceller, dyr og cellelinjer har vist at statiner reduserer MMP-2 og -9 sekresjon fra makrofager [54, 56-58]. Hemmet uttrykk av MMP-2 og -9 førte til begrenset progresjon av aterosklerose i LDL-reseptor (LDLR)-"knock-out"-mus [58]. Dette antas å skje gjennom hemmingen av mevalonsyresyntesen [54, 57]. Ved tilsetning av mevalonolakton til statinbehandlede makrofager, ble den hemmende effekten på MMP-2 og -9 reversert [57]. I ApoE-"knock-out"-mus med hjertehypertrofi etter fôring med en vestlig diettstil, er det blitt observert reduserte nivåer av både MMP-9 og cathepsin S etter behandling med simvastatin. Dette ble antatt å være i sammenheng med økte nivåer av aktiverte PPAR- α og - γ som følge av statinbehandlingen [55]. *In vitro* studier viser at statiner forsterker apoptosen av vaskulære SMC, som har evne til å sekreere ulike proteaser, inkludert MMP-er og cathepsiner. Videre viser studiene og genanalyser i aneurismiske vev at gennuttrykket av MMP-9 og cathepsin B, C, K og L nedreguleres etter behandling med statiner [66].

2. Mål for oppgaven

Makrofager spiller en svært sentral rolle i utviklingen av aterosklerose. Det er observert økt mRNA- og proteinuttrykk av legumain, cathepsin B, MMP-2 og -9 i områder med ustabile aterosklerotiske plakk [13, 67]. Disse proteasene produseres og utskilles hovedsakelig av makrofager i plakket. En nylig masteroppgave i gruppen har indikert hemming av aktivitet av legumain og cathepsin B, samt økt sekresjon av MMP-9 fra makrofager etter behandling med statiner [68], og målet var å bekrefte disse funnene.

Der er derfor interessant å:

- Studere effekten av atorvastatin på regulering av proteinuttrykk og aktivitet av cysteinproteasene legumain og cathepsin B, samt sekresjon av matriks metalloproteasene MMP-2 og -9 fra RAW 264,7 makrofager.
- Undersøke om effekter av atorvastatin på proteasene skjer gjennom hemming av mevalonsyresyntesen.
- Studere betydningen av serum i cellemediet for proteinuttrykk og aktivitet av legumain og cathepsin B ved behandling med atorvastatin med eller uten mevalonolakton tilstede.
- Undersøke mulige toksiske effekter av atorvastatin og mevalonolakton på celleviabilitet.

3. Materialer og metoder

3.1 Kjemikalier og reagenser

Kjemikalier	Leverandør
Akrylamid/Bis løsning (30 %) (161-01 56)	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA
Albumin standard (23209)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Atorvastatin-lakton (A791780)	Toronto Research Chemicals (TRC), North York, Ontario, Canada
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006)	Bio-Rad laboratories
Brij™ 35 (Polyoksyetylen lauryleter)	Sigma-Aldrich™, St. Louis, MI, USA
Dinatrium-EDTA (00 064)	Ferak Berlin, Tyskland
Dinatriumhydrogenfosfat (28029.292)	VWR Prolabo, Fontenay, Frankrike
DMSO, dimetylsulfoksid, (CH ₃) ₂ SO (D2650)	Sigma-Aldrich™
DTT, ditiotreitotol (438117)	Sigma-Aldrich™
FBS gold, Føtalt bovinserum gold, (PAA A15-649)	PAA Laboratories, Pasching, Australia
Fettfri tørrmelk	Normilk, Levanger, Norge
Immun Star™ WesternC™ Kit	Bio Rad laboratories
Kodak X-Ray developer, fremkaller (5070933)	Carestream Health, Rochester, NY, USA
Kodak X-Ray fixer (507 1071)	Carestream Health
Metanol, CH ₃ OH (1.06018.2500)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Mevalonolakton (BCBC8522V)	Sigma-Aldrich™
Natriumacetat, NaC ₂ H ₄ O ₂ ·3H ₂ O (6267.0500)	Merck
Natriumklorid, NaCl (1.06404.1000)	Merck
NuPAGE® MOPS SDS Running buffer (20X) (NP0001)	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Penicillin-Streptomycin (P0781)	Sigma-Aldrich™
Ponceau S solution (P7170-1L)	Sigma-Aldrich™
Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (161-0374)	Bio Rad Laboratories
Human Legumain Affinity Purified Polyclonal Antibody, Goat IgG (AF2199)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins (P0160)	Dakocytomation, Glostrup, Denmark
SDS, natriumlaurylsulfat (161-0301)	Bio-Rad laboratories
Super Signal® West Dura Extended Duration Subs, 34075	Thermo Scientific

TEMED (161-0800)	Bio-Rad laboratories
Tris (base), (T1503)	Sigma-Aldrich™
Tris/Glycine Buffer (10X) (161-0771)	Bio Rad Laboratories
Triton X-100, (22142)	Chemi-Teknik A/S, Oslo, Norge
Tween® 20 (170-6531)	Bio-Rad laboratories
Z-Ala-Ala-Asn-NHMec, legumainsubstrat	Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK
Z-Arg-Arg-AMC, cathepsin B substrat (I-1135)	Bachem, Bubendorf, Sveits

3.2 Utstyr

Utstyr	Leverandør
Molecular Image® ChemiDoc Lab™ XRS+, 721BR03414	Bio-Rad laboratories
Class II type A2 LAF-benk	Esco, Singapore
Corning 75 cm ² dyrkningsflaske (3275)	Corning, NY, USA
Costar 6-brønners brett (3506)	Corning
Costar 96-brønners mikrotiterplate, svart (3915)	Corning
Countess automated cell counter	Invitrogen
Dri-Block DB-2A	Techne, Cambridge, Storbritannia
ECL Semi-dry Blotters, blottemaskin	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Storbritannia
Hoefer® (Automated Gel Stainer)	Pharmacia Biotech, NY, USA
Holten Lamin Air LAF-benk	Medinor, Oslo, Norge
Inkubatorskap (modell 3548)	Forma Scientific, Ohio, USA
Kodak® Biomax MS Film (Z363073-50EA)	Sigma-Aldrich™
Nunc 96-brønners mikrotiterplate (260836)	Nunc, Roskilde, Danmark
NUPAGE® (4-12 % Bis-Tris Gel)	Invitrogen
Olympus CKX41 lysmikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
Universal 32 R sentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
Varmeskap	Termaks, Bergen, Norge
Wallac 1420 Victor ³ Multilabel counter, mikroplateleser	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA

3.3 Celledyrking

3.3.1 RAW 264,7 celler

RAW 264,7 celler (American Type Culture Collection, ATCC; TIB-71) er en adherent, makrofagliknende cellelinje fra svulster induisert i mus (*Mus musculus*) ved intraperitoneal injeksjon av "Abelson murine leukemia virus" (A-MuLV) [69]. Cellelinjen tilhører dermed «Biosafety level» 2 (BSL-2), men produserer ikke viruspartikler. Cellelinjen brukes ofte i studier av metabolisme, inflammasjon og apoptose [70].

3.3.2 Tining og utsåing av celler

Før tining og utsåing hadde RAW-celleene gjennomgått en langsom nedfrysningsprosess før oppbevaring i flytende nitrogen ved minus 196 °C. DMSO ble tilsatt før nedfrysning for å begrense graden av celledskade og for å øke celleoverlevelse [71]. Under opptinningsprosessen ble cellene tatt ut av nitrogentanken og tint raskt i 40-60 sekunder på vannbad ved 37 °C og under stadig omdreining. En rask opptining begrenser graden av celledskade [71]. Ampullen ble deretter tørket utvendig med 70 % etanol, og cellematerialet ble overført til en 75 cm² dyrkningsflaske med tilsatt medium. Neste dag ble mediet byttet for å fjerne rester av DMSO. Bytte av medium ble deretter utført ca. hver 3. dag, og cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂. Splitting av cellene foregikk ukentlig.

3.3.3 Splitting og telling av celler

Ved splitting ble mediet i dyrkningsflasken fjernet, og det ble tilsatt 10 ml nytt medium. Deretter ble det benyttet en celledskraper for å løsne cellene som var festet i flaskebunnen. Etter skrappingen ble det undersøkt om cellene var tilstrekkelig separert fra hverandre (fritt for celleklumper) ved hjelp av et mikroskop. Cellene ble overført til et 50 ml rør. Hvis det var klumper i celledsuspensjonen, ble cellene overført 1 ml av gangen med en 1 ml finnpipette for å løsne celleklumpene. Ved telling av celler ble 10 µl av celledsuspensjonen tatt ut og blandet med 10 µl tryptanblått. Deretter ble 10 µl av blandingen tilsatt et tellekammer for automatisk telling av celler ved bruk av en Countess celledteller. For opprettholdelse og videre dyrkning av celledkulturen ble 1 x 10⁶ celler overført til en ny dyrkningsflaske og tilsatt nytt medium til et totalvolum på 10 ml.

3.3.4 Høsting av celler

Kondisjonert medium fra cellebrønnene (6-brønners brett) etter celleforsøk ble sugd av forsiktig over i eppendorfrør, og spunnet ved 1000 rpm i 5 minutter, før supernatantene ble overført til nye merkede rør. Brønnene ble vasket forsiktig med 1 ml PBS (Appendiks), som ble fjernet før tilsetning av 0,5 ml lysisbuffer (Appendiks) til hver brønn. Cellene ble skrapet og overført til nye eppendorfrør, og deretter frosset ved minus 196 °C i 15 minutter og tint ved 30 °C. Fryse-tiningsprosessen ble utført 3 ganger. Etter den siste tiningsprosessen ble cellelysaten sentrifugert ved 10 000 G og 4 °C i 5 minutter. Supernatantene ble så overført til nye merkede eppendorfrør, og både cellelysater og kondisjonert medium ble oppbevart nedfrosset eller på is før analyse.

3.4 Celleforsøk

3.4.1 Celleforsøk med atorvastatin med eller uten mevalonolakton

RAW 264,7 celler (5×10^5 per brønn) ble splittet og telt (3.3.3) før de ble sådd ut i 6-brønners brett, og inkubert i 24 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Dagen etter ble mediet sugd av før det ble tilsatt 2 ml nytt medium inneholdende 0,5 % DMSO, som var løsningsmidlet for atorvastatin og mevalonolakton. Cellene ble behandlet med atorvastatin (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 og 200 µM) og/eller mevalonolakton (50 eller 1000 µM) i duplikater. Deretter ble cellene inkubert i 24 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Dagen etter ble cellene høstet og lysatene ble fryse-tint (3.3.4) og oppbevart på is eller nedfrost før analyser.

Det ble også utført tilsvarende celleforsøk i fravær av serum i mediet. Forsøkene ble basert på det samme prinsippet som i ovennevnte forsøk (3.4.1), med unntak av at cellene ble inkubert i 4 døgn i stedet for 24 timer etter tilsetning av atorvastatin med eller uten mevalonolakton. Cellemediet fra disse forsøkene ble brukt til zymografi.

3.4.2 Tillaging av oppløsninger med atorvastatin og mevalonolakton

Nødvendige beregninger ble foretatt før tillaging av de ulike fortyningene med atorvastatin og/eller mevalonolakton. To ulike prosedyrer ble brukt:

Prosedyre 1: Innledningsvis ble forskjellige mengder stamløsning av atorvastatin (0,5 mg/ml) og mevalonolakton (2 mg/ml) i metanol overført til hvert sitt 15 ml sentrifugerør (tabell 3-1).

For å dampe bort metanolen ble løsningene tilført nitrogen-gass til det ble tørt. Etter inndampingen ble tørrstoffet i rørene løst i 23 µl DMSO før tilsetning av 4,5 ml cellemedium. Mengde DMSO tilsatt ga liten toksisitet til cellene og sikret samtidig at tørrstoffene ble tilstrekkelig løst. Dette ga en sluttkonsentrasjon på 0,5 % DMSO i cellemediet.

Tabell 3-1: Eksempel på prosedyre 1 for tillaging og uttak av atorvastatin (AL) og mevalonolakton (ML) for RAW-celleforsøk.

Brønnnummer (løsning)	Atorvastatin (AL) stockløsning (0,5 mg/ml) dampet inn under N ₂ (µl)	Mevalonolakton (ML) stockløsning (2 mg/ml) dampet inn under N ₂ (µl)	0,5 % DMSO (µl)	Sluttvolum (ml)	Sluttkons. µM AL	Sluttkons. µM ML
1, 2 (A)	0	0	23	4,5	0	0
3,4 (B)	49	0	23	4,5	10	0
5,6 (C)	243	0	23	4,5	50	0
7, 8 (D)	487	0	23	4,5	100	0
9, 10 (E)	973	0	23	4,5	200	0
11, 12 (F)	0	293	23	4,5	0	1000
13, 14 (G)	49	293	23	4,5	10	1000
15, 16 (H)	243	293	23	4,5	50	1000
17, 18 (I)	487	293	23	4,5	100	1000
19, 20 (J)	973	293	23	4,5	200	1000

Prosedyre 2: Senere ble en annen og mer lettvinnt metode anvendt for å lage oppløsninger av atorvastatin og mevalonolakton, hvor stamløsningene ble laget med atorvastatin og mevalonolakton løst direkte i DMSO, som kunne fortynnes videre i medium til stimulering av cellene (tabell 3-2).

Tabell 3-2: Eksempel på prosedyre 2 for tillaging og uttak av atorvastatin (AL) og mevalonolakton (ML) for RAW-celleforsøk.

Brønnnummer (løsning)	0,5 % DMSO	Atorvastatin (AL)	Mevalonolakton (ML)	Sluttkons. μM AL	Sluttkons. μM ML
1, 2 (A)	23 μl	0	0	0	0
3, 4 (B)	11,5 μl	11,5 μl av 0,4 mM	0	1	0
5, 6 (C)	11,5 μl	11,5 μl av 2 mM	0	5	0
7, 8 (D)	11,5 μl	11,5 μl av 4 mM	0	10	0
9, 10 (E)	11,5 μl	11,5 μl av 10 mM	0	25	0
11, 12 (F)	11,5 μl	11,5 μl av 20 mM	0	50	0
13, 14 (G)	11,5 μl	11,5 μl av 40 mM	0	100	0
15, 16 (H)	11,5 μl	11,5 μl av 80 mM	0	200	0
17, 18 (I)	11,5 μl	0	11,5 μl av 20 mM	0	50
19, 20 (J)	0	11,5 μl av 0,4 mM	11,5 μl av 20 mM	1	50
21, 22 (K)	0	11,5 μl av 2 mM	11,5 μl av 20 mM	5	50
23, 24 (L)	0	11,5 μl av 4 mM	11,5 μl av 20 mM	10	50
25, 26 (M)	0	11,5 μl av 10 mM	11,5 μl av 20 mM	25	50
27, 28 (N)	0	11,5 μl av 20 mM	11,5 μl av 20 mM	50	50
29, 30 (O)	0	11,5 μl av 40 mM	11,5 μl av 20 mM	100	50
31, 32 (P)	0	11,5 μl av 80 mM	11,5 μl av 20 mM	200	50
33, 34 (Q)	11,5 μl	0	11,5 μl av 400 mM	0	1000
35, 36 (R)	0	11,5 μl av 0,4 mM	11,5 μl av 400 mM	1	1000
37, 38 (S)	0	11,5 μl av 2 mM	11,5 μl av 400 mM	5	1000
39, 40 (T)	0	11,5 μl av 4 mM	11,5 μl av 400 mM	10	1000
41, 42 (U)	0	11,5 μl av 10 mM	11,5 μl av 400 mM	25	1000
43, 44 (V)	0	11,5 μl av 20 mM	11,5 μl av 400 mM	50	1000
45, 46 (W)	0	11,5 μl av 40 mM	11,5 μl av 400 mM	100	1000
47, 48 (X)	0	11,5 μl av 80 mM	11,5 μl av 400 mM	200	1000

3.5 Totalproteinmåling

Metoden er beskrevet av Bradford *et al.* [72]. Proteinmålingen baserer seg på binding av et fargereagens, Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250), til proteiner i prøven. Protein-farge-komplekset forårsaker en endring i absorbanse fra 365 til 595 nm, og det er endringen i absorbanse ved 595 nm som måles. En visuell fargeendring fra rød til sterk blåfarge ved kompleksdannelse indikerer høyt proteininnhold i prøven. Albumin ble brukt som proteinstandard.

Standardmetode for mikrotiterplate (måleområde fra 0 til 300 µg/ml totalprotein): Selve metoden ble utført ved at 10 µl proteinstandard i konsentrasjoner på 0, 50, 100, 150, 200, 250 og 300 µg/ml ble pipettert i 2 paralleller i en 96 brønners mikrotiterplate. Prøvene ble pipettert på tilsvarende måte. Fargereagens (200 µl) ble tilsatt i hver brønn 5-10 minutter før absorbansmåling i en mikroplateleser. Fargereagenset ble tillaget ved blanding av Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent og destillert vann i forholdet 1:5. Temperaturen i mikroplateleseren ble innstilt på 25 °C.

Mellomversjon for mikrotiterplate (måleområde fra 0 til 160 µg/ml): Prøver som inneholdt mindre enn 50 µg/ml totalprotein etter måling med standardmetoden, ble målt på nytt med standardløsninger 0, 10, 20, 40, 80 og 160 µg/ml albumin for mer nøyaktig proteindeteksjon. Til forskjell fra standardmetoden ble det tilsatt 20 µl prøve og standardløsning. Metoden var ellers basert på det samme prinsippet som standardmetoden.

3.6 Enzymaktivitetsmåling

3.6.1 Måling av legumainaktivitet

Prinsippet for metoden er hentet fra Chen *et al.*[17] og Johansen *et al.*[73], og baserer seg på at en prøve med innhold av legumain fortynnes i assaybuffer (Appendiks). Denne bufferen inneholdt et reduksjonsmiddel, ditiotreitotol (DTT), som gjør at enzymet blir aktivt. Det tilsettes så et peptidsubstrat som kløyves av legumain og fluorescerer. Økningen i fluorescens per sekund måles over tid i mikroplateleser.

Ved enzymaktivitetsmålingen ble det tilsatt 20 µl prøve og blindprøve (lysisbuffer) i 3 paralleller på en svart 96-brønners mikrotiterplate. Blindprøven måler primært substratets stabilitet under prøvebetingelsene. Mikrotiterplaten ble plassert i mikroplateleseren til analyse; hver brønn fikk automatisk tilsatt 100 µl legumain assaybuffer med DTT (1 mM) og påfølgende 50 µl Z-Ala-Ala-Asn-NH₂Mec substratløsning (34 µM) til en sluttkonsentrasjon av substrat på 10 µM i brønnen. Det gikk 10 minutter mellom tilsetting av buffer og måling av aktivitet, for å sikre tilstrekkelig aktivering av legumain. Substratet er spesifikt for legumain, og spaltes karboksyterminalt for asparagin (Asn). Ved peptidspaltningen frigis NH₂Mec som gir fluorescens ved 360 nm eksitasjon og 460 nm emisjon.

3.6.2 Måling av cathepsin B-aktivitet

Metoden for måling av cathepsin B-aktivitet er beskrevet av Werle *et al.*[74] og Barrett & Kirsche [75], og bygger på samme prinsippet som ovennevnte målemetode for legumain, men med en annen buffer (cathepsin B-assaybuffer; Appendiks). Peptidsubstratet Z-Arg-Arg-NH₂Mec (68 µM) som er spesifikt for cathepsin B, kløyves på karboksylsiden av arginylarginin (Arg-Arg) av cathepsin B, som medfører avspalting av fluorescerende NH₂Mec. Økningen i fluorescens per sekund måles over tid i mikroplateleseren, ved en konstant temperatur på 30 °C.

3.7 Måling av celleviabilitet (MTS)

Måling av celleviabilitet ble foretatt med ”CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay”, som inneholder en MTS-tetrazoliumforbindelse (MTS-reagens) og et elektronbindende reagens kalt PES (fenazin etolsulfat). Det er en kolorimetrisk metode for å bestemme antall levende celler ved analyse av proliferasjon, cytotoksisitet eller kjemosensitivitet. MTS-tetrazoliumforbindelsen reduseres av levende celler til et farget (rødbrunt) formazanprodukt, som er løselig i dyrkningsmedium. Reduksjonen antas å skyldes NADPH eller NADH som produseres av dehydrogenase-enzymet i metabolsk aktive celler. Mengden formazanprodukt som dannes er direkte proporsjonalt med mengde levende celler.

Ved utsåing ble det tilsatt 200 µl cellesuspensjon (5×10^4 levende celler per brønn) i en Nunc 96-brønners steril mikrotiterplate. Cellene ble deretter inkubert i 24 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Dagen etter ble mediet fjernet, og nytt medium med atorvastatin (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 og 200 µM) ble tilsatt med eller uten mevalonolakton (50 eller 1000 µM) i 4 replikater. Cellene ble deretter inkubert i 24 timer ved 37 °C og 5 % CO₂.

Etter 24 timers inkubering ble det tilsatt 20 µl MTS-reagens til alle brønnene i mikrotiterplaten, og cellene ble deretter inkubert i 4 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Det ble målt absorpsjon (490 nm) (det vil si mengden formazan dannet i hver brønn) ved hjelp av en mikroplateleser (Wallac 1420 Victor³ Multilabel counter) etter 0, 1, 1,5, 2, 3 og 4 timer. Data ble behandlet og fremstilt ved bruk av programmet GraphPad og data ved tid 2 timer ble brukt til å bestemme celleviabiliteten da det ble observert størst forskjeller ved dette tidspunktet.

3.8 Western blotting

Western blotting er en analytisk og sensitiv metode som brukes for å detektere proteiner i prøver, som serum, urin og cellelysater. Først separeres proteinene ved hjelp av natriumdodekylsulfat-polyakrylamid-gelelektroforese (SDS-PAGE). SDS er en effektiv detergent som denaturer proteiner til ikke-foldete polypeptider. Detergenten sikrer at polypeptidene i prøven får en uniform ladning, og de kan deretter separeres etter molekylvekt (kDa) ved elektroforese. Videre overføres proteinene fra SDS-gelen til en nitrocellulosemembran ved blotting (elektrisk overføring). Deretter detekteres proteinene på membranen ved tilsetning av et primærantistoff mot det proteinet som skal undersøkes, og inkuberes over natt. Dagen derpå inkuberes membranen med et sekundærantistoff, et antistoff-HRP («horseradish» peroksidase)-konjugat, som binder seg til primærantistoffet [76]. Helt til slutt brukes det et ECL («enhanced chemiluminescent») substrat til fremkalling av proteinbåndene i membranen [77].

ECL består av to komponenter: en stabil peroksidløsning, og en forsterket (”enhanced”) luminolløsning. Disse løsningene er aktive når de først blandes i like mengder. Når membranen med antistoff-HRP-konjugatet inkuberes i ECL vil luminol, som er et luminescerende substrat, spaltes av HRP-delen i konjugatet og en kjemisk reaksjon vil dermed oppstå og produsere lys som kan detekteres på røntgenfilm eller ved bruk av ChemiDoc Lab™ XRS+ (Fig.3-1) [78].

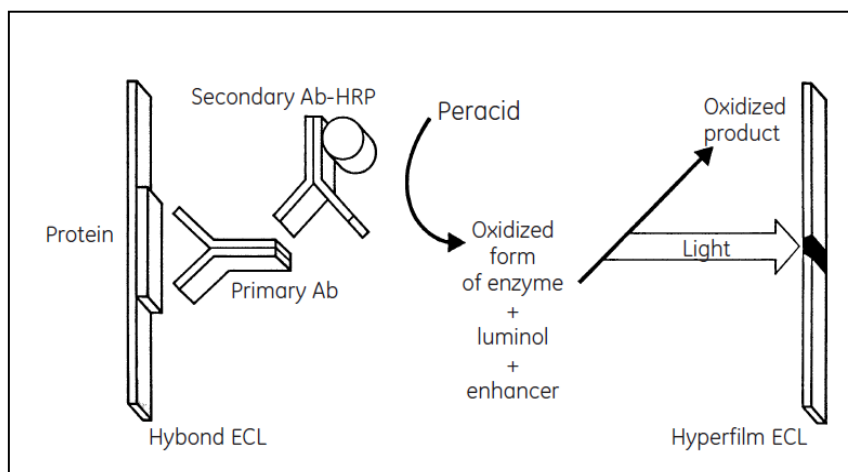


Fig. 3-1: Prinsipp for ECL. Fremkallingen går ut på at antistoff-HRP-konjugatet katalyserer oksidasjonen av luminol. Dette gjør at luminol emitterer lys når det går fra

eksitert tilstand til grunntilstand. Dette lyset forsterkes og detekteres på film eller kamera [78].

Cellelysater ble oppkonsentrert ved hjelp av acetonfelling (Appendiks). Det ble tilsatt 15 µg totalprotein per brønn før proteinene ble separert ved SDS-PAGE (4-12 % Bis-Tris Gel) ved 200 V i 50 minutter. Videre ble proteinene overført til en nitrocellulosemembran ved bruk av blottemaskin ved 32 mA per gel i ca. 1,5 time. Etterpå ble membranen vasket 3 ganger med blotto (Appendiks) i 10 minutter, før den ble inkubert med primærantistoff (1:1000) (tabell 3-3) over natt. Dagen etter ble membranen vasket 3 ganger med T-TBS (Appendiks) før inkubering med et sekundærantistoff i 1 time. Samme vaskerutine med T-TBS ble gjentatt før membranen ble fremkalt på røntgenfilm i mørkerom eller ved bruk av ChemiDoc Lab™ XRS+.

Tabell 3-3: *Oversikt over primær- og sekundærantistoffer som ble brukt i Western blotting*

Antistoffer	Type	Konsentrasjon
Anti-legumain, AF 2199	Primær	1:1000
Rabbit anti goat	Sekundær	1:5000
GAPDH	Primær	1:200
Goat anti mouse	Sekundær	1:1500

3.9 Zymografi

Zymografi er en elektroforesebasert metode, som muliggjør detektering og karakterisering av ulike proteaser i prøver. Metoden er basert på proteasenes evne til å hydrolysere proteinsubstrater som proteoglykaner, gelatin og kasein i polyakrylamidgeler, og brukes i stor grad for å studere MMP-er [79, 80]. I denne oppgaven ble sekresjonen av gelatinasene MMP-2 og -9 fra RAW 264,7 celler studert, og gelatin ble brukt som substrat.

Ved tillaging av polyakrylamid gel (Appendiks) ble de forskjellige ingrediensene blandet i en form til gelestøping, hvor separerende gel (med gelatin) ble lagd først, og konsentrerende gel med tilsetningsbrønner ble støpt på toppen. Gelatin ble tilsatt i den separerende gelen før polymerisering, slik at gelatinen ble ”fanget” i gelporene og ikke migrerte ut av gelen under elektroforesen. Prøvene ble fortynnet med 2X samplebuffer (Appendiks), og 15 µl ble tilsatt per brønn før elektroforese med avkjølingsystem ved 200 V i ca 1,5 time. Etter elektroforesen ble gelen vasket 2 ganger i 30 minutter med 2,5 % Triton X-100, som er en nonionisk detergent. Vasketrinnet med Triton X-100 fjernet SDS og renaturerte delvis de separerte proteinene i gelen. Deretter ble gelen inkubert i inkuberingsbuffer (Appendiks) ved 37 °C på vippestativ i varmeskap over natt. Inkuberingsbufferen gir gode forhold for enzymatisk aktivitet, og gjør det mulig for MMP-ene å hydrolysere gelatin i deres ”vandringssone” i gelen [81]. Dagen etter ble gelen farget med Coomassieblått i en Hoefer® automatiske fargemaskin. Etter kvantifisering ved hjelp av Chemi Doc ble gelen inkubert i en blanding av glyserol og avfargingsvæske (Appendiks) 2 ganger i ca. 5 minutter, og tørket i cellofan i ca. 3-4 dager.

3.10 Statistiske analyser

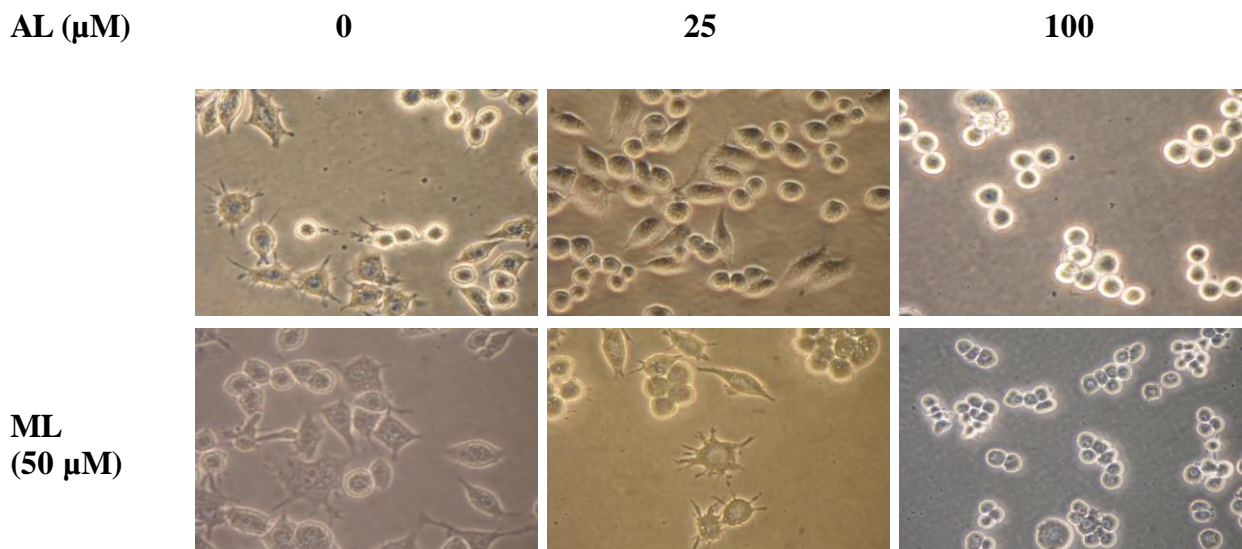
I forsøkene er det to behandlingsgrupper som skal sammenlignes. Det var ønskelig å undersøke om eventuelle forskjeller mellom de to gruppene var signifikante.

Dataene i oppgaven er presentert som gjennomsnittsverdi \pm standardfeil (SEM). Det ble benyttet en tosidig, toutvalgs t-test som statistisk modell. Et signifikansnivå på 0,05 ble valgt. Dataene viste ingen ekstremverdier (uteliggere), men det forelå store forskjeller i SEM ved enkelte statinkonsentrasjoner. Dataprogrammet GraphPad ble brukt til de statistiske analysene. Gjennomsnittsverdien fra hvert forsøk er regnet fra 1-4 replikater, og antall forsøk (n) var 2-5.

4. Resultater

4.1 Endret morfologi av RAW 264,7 makrofager etter behandling med atorvastatin og/eller mevalonolakton

RAW 274,7 makrofager ble inkubert med økende konsentrasjoner av atorvastatin (AL, 0-200 μM), både med og uten mevalonolakton (ML, 50 eller 1000 μM). For å undersøke om behandlingene påvirket cellenes morfologi, ble det tatt bilder av cellene ved bruk av et lysmikroskop etter 24 timers inkubering (Fig. 4-1).



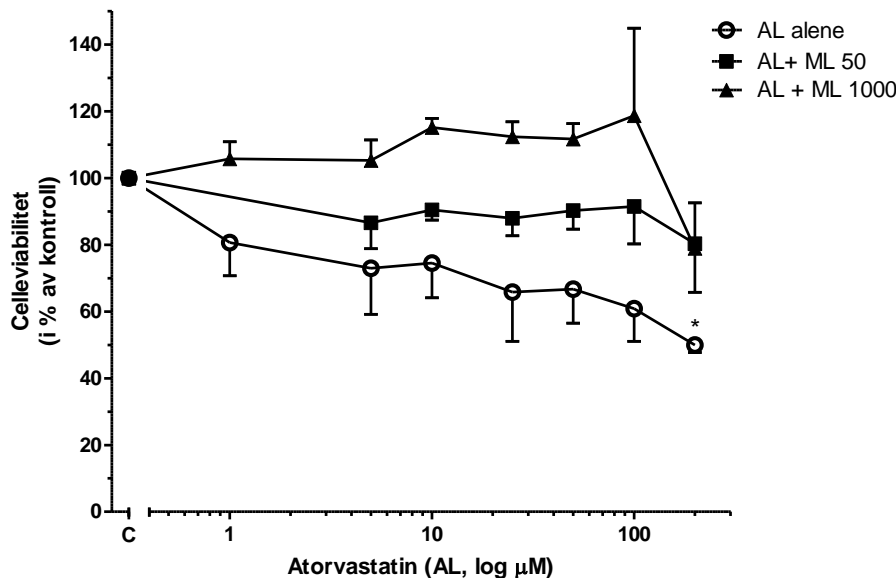
Figur 4-1: Lysmikroskopibilder av RAW 264,7 celler etter behandling med eller uten atorvastatin og/eller mevalonolakton (50 μM). Cellene (5×10^5) ble inkubert i 24 timer før fotografering. Bildene er forstørret 40X.

Det ble observert flere løse celler ved økende konsentrasjon av atorvastatin og/eller mevalonolakton i forhold til ubehandlede kontrollceller. Videre utviste cellene som ble behandlet med atorvastatin alene en tydeligere sirkulær form, enn de cellene som ble behandlet med atorvastatin sammen med mevalonolakton. Sistnevnte hadde en mer irregulær og mindre sirkulær form.

4.2 Viabilitetsmålinger av RAW-makrofager etter behandling med atorvastatin med eller uten mevalonolakton

For å undersøke om atorvastatin med eller uten mevalonolakton påvirket viabiliteten til cellene, ble det utført MTS-celleviabilitetstest. RAW-makrofagene ble inkubert med økende konsentrasjoner av atorvastatin alene (0-200 μM) eller atorvastatin sammen med mevalonolakton (50 eller 1000 μM) i 24 timer. Deretter ble celleviabiliteten målt i løpet av 4 timer.

Målingene etter 2 timer viste at atorvastatin alene ga en signifikant reduksjon av celleviabiliteten ved 200 μM i forhold til kontroll (Fig.4-2). IC_{50} sier noe om konsentrasjonen som reduserer enzymaktiviteten med 50 %, og den ble beregnet til å være omlag 200 μM . Videre ble det observert at behandling med atorvastatin sammen med både 50 og 1000 μM mevalonolakton ga en signifikant beskyttende effekt på celleviabiliteten ($p=0,01$ og $0,0002$), i forhold til behandling med atorvastatin alene.



Figur 4-2: Celleviabilitet av RAW 264,7 makrofager etter behandling med økende konsentrasjoner av atorvastatin og/eller mevalonolakton målt ved MTS. RAW-makrofager (5×10^5 celler) ble inkubert med økende konsentrasjoner av atorvastatin (AL; 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 og 200 μM) med eller uten mevalonolakton (ML; 50 eller 1000 μM) i 24 timer. Figuren viser celleviabilitet ved bruk av et MTS-reagens etter 2 timers inkubering. Målinger av celleviabilitet er normalisert (mot 0 μM AL alene for samtlige behandlinger) og presentert

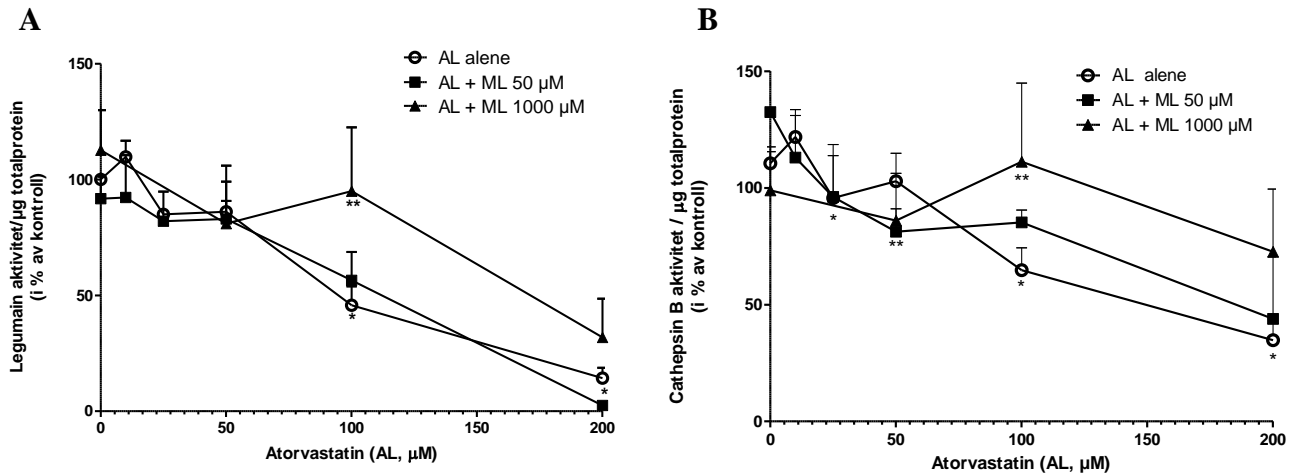
som prosent av kontroll \pm SEM (n = 3). Signifikant forskjell mellom aktuell atorvastatinkonsentrasjon i forhold til kontroll (0 μ M AL alene; $p < 0,01$) er markert (). C = kontroll.*

4.3 Atorvastatin hemmer legumain- og cathepsin B-aktivitet i RAW 264,7 makrofager

RAW 264,7 makrofagene ble inkubert med atorvastatin (0-200 μ M) og/eller mevalonolakton (50 eller 1000 μ M) i 24 timer, før legumain- og cathepsin B-aktivitet og proteinuttrykk ble analysert i cellelysatsene.

RAW 264,7 makrofagene hadde basalaktivitet av legumain (51 dF/sekund per μ g totalprotein; 100 %; Fig.4-3A). Det ble observert en signifikant reduksjon i legumainaktivitet (legumainaktivitet/ μ g totalprotein) etter stimulering med 100 og 200 μ M atorvastatin alene i forhold til kontroll. IC_{50} ble beregnet til å være 91 μ M, 211 μ M og 195 μ M for celler som ble behandlet med henholdsvis atorvastatin alene, eller sammen med 50 eller 1000 μ M mevalonolakton (tabell 4-1). Det ble ikke observert noen signifikante forskjeller mellom behandlingene med eller uten mevalonolakton med unntak av samtidig behandling med 100 μ M atorvastatin og 1000 μ M mevalonolakton, som viste en signifikant høyere enzymaktivitet enn behandling med 100 μ M atorvastatin alene.

RAW 264,7 makrofagene hadde basalaktivitet av cathepsin B (543 dF/ μ g totalprotein; 100 %; Fig.4-3B). Det ble observert en signifikant reduksjon i cathepsin B-aktivitet (cathepsin B-aktivitet/ μ g totalprotein) etter behandling med 25, 100 og 200 μ M atorvastatin alene i forhold til kontroll. Kalkulert IC_{50} var henholdsvis 147 μ M for celler som ble behandlet med atorvastatin alene og 182 μ M for celler behandlet med atorvastatin sammen med 50 μ M mevalonolakton. Ved behandling med atorvastatin sammen med 1000 μ M mevalonolakton, ble ikke enzymaktiviteten redusert med 50 %, slik at IC_{50} ble umulig å beregne. Ved sammenligning av enkeltbehandling med atorvastatin med eller uten mevalonolakton, var det signifikant forskjell mellom 50 μ M atorvastatin alene sammenlignet med tilsetning av 50 μ M mevalonolakton. Dette gjaldt også ved behandling med 100 μ M atorvastatin med eller uten 1000 μ M mevalonolakton.

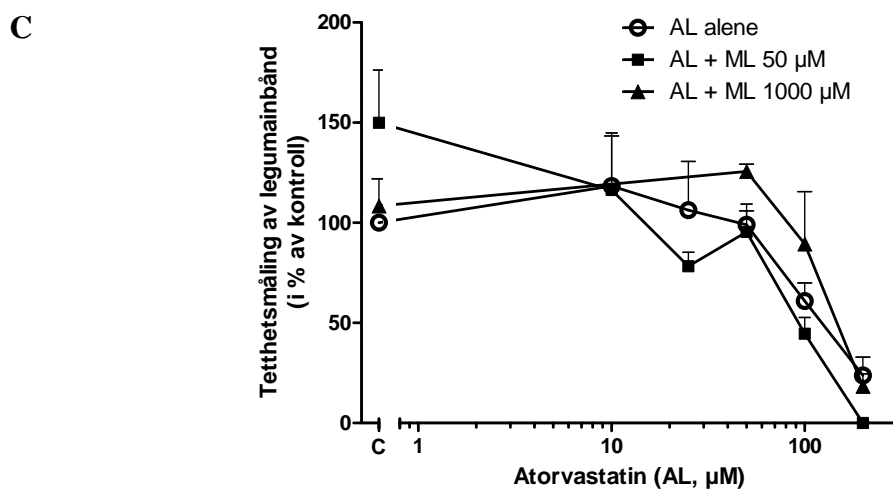
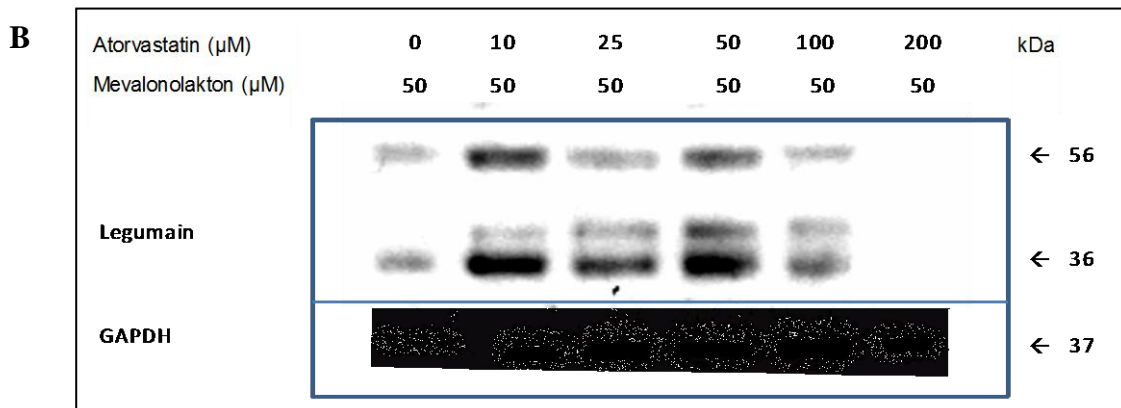
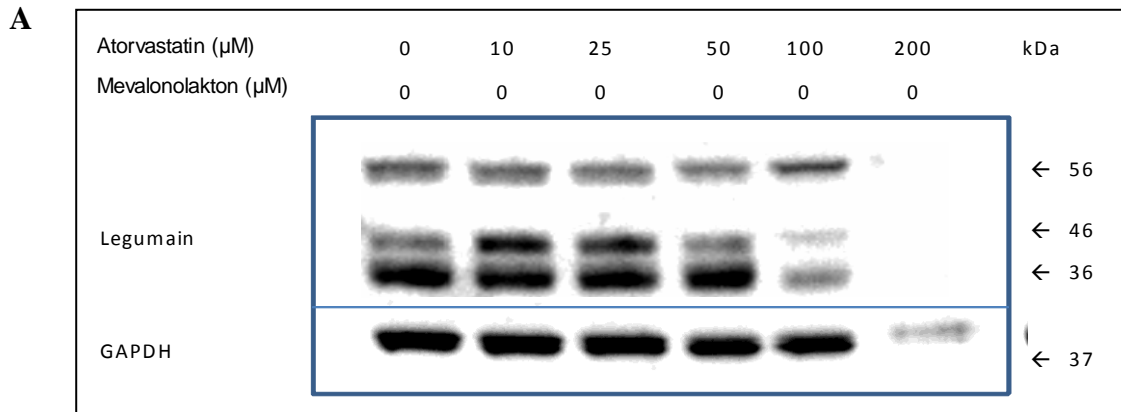


Figur 4-3: Legumain- (A) og cathepsin B (B)-aktivitet i cellelysater av RAW 264,7 makrofager etter inkubering med økende konsentrasjoner av atorvastatin. RAW 264,7 makrofager (5×10^5 celler) ble inkubert med atorvastatin (AL; 0-200 μM) med eller uten mevalonolakton (ML; 50 eller 1000 μM) i 24 timer og legumain- og cathepsin B-aktivitet (dF/sekund per μg totalprotein) ble målt ved bruk av spesifikke fluorescerende peptidsubstrater. Målinger av aktivitet er normalisert (mot 0 μM AL alene for samtlige behandlinger) og presentert som prosent \pm SEM ($n = 2-5$). Signifikante forskjeller mellom aktuell AL-konsentrasjon i forhold til kontroll (0 μM AL alene; $p < 0,05$) er markert (*). Signifikante forskjeller mellom behandling med atorvastatin sammen med mevalonolakton (AL + 50 μM og AL + 1000 μM) i forhold til behandling med atorvastatin uten mevalonolakton (AL alene) ved de aktuelle atorvastatin-konsentrasjonene ($p < 0,05$) er markert (**).

I de samme cellelysatene var det ønskelig å undersøke om atorvastatin og mevalonolakton også regulerte proteinuttrykket av legumain i RAW 264,7 makrofager. Etter elektroforese og Western blotting ble det detektert legumainbånd for både proform, intermediære former og aktiv form av legumain med størrelse på henholdsvis 56, 46/47 og 36 kDa (Fig.4-4) i ubehandlede celler. GAPDH ble brukt som "loading"-kontroll, i tillegg til at det ble tilsatt like mengder totalprotein (15 μg) i hver brønn. Rekombinant prolegumain (rhLeg) ble dessuten brukt som kontroll (ikke vist i figur).

Proteinbåndene for alle formene av legumain ble svakere med økende konsentrasjon av atorvastatin alene og etter behandling med 200 μM var det ingen proteinbånd detektert, men GAPDH ble også redusert (Fig. 4-4A). Behandling med 50 μM mevalonolakton alene viste redusert uttrykk av både legumain og GAPDH (Fig. 4-4B), som skyldes at det ble påsatt mindre prøve (ca. 5 μg totalprotein versus 15 μg) på grunn av mangel på prøve; dette ble det justert for etter tetthetsmålingen. Etter samtidig tilsetning av atorvastatin og mevalonolakton

ble reduksjonen i legumainuttrykk motvirket. Etter densitometrisk skanning av proteinbåndene, ble proteinuttrykket av legumain justert i forhold til uttrykket av GAPDH (Fig. 4-4B).



Figur 4-4: Western blott og kvantifisering av legumain i atorvastatin-behandlede RAW 264,7 makrofager. RAW 264,7 makrofager (5×10^5 celler) ble inkubert i 24 timer

*med atorvastatin (0-200 μM) og/eller mevalonolakton (50 μM). Cellelysate ble oppkonsentrert (acetonfelling) og 15 μg totalprotein (men 5 μg for 50 μM ML alene) ble applisert ved gelelektroforese, og blottene ble analysert ved bruk av legumain- eller GAPDH-spesifikt antistoff. **A:** Western blott ved behandling med atorvastatin alene. **B:** Western blott ved behandling med atorvastatin og mevalonolakton. **C:** Kvantifisering av legumain-båndene i A og B (36, 46/47 og 56 kDa). Båndintensiteten ble kvantifisert og normalisert i forhold til kontroll (100 %) \pm SEM ($n = 1-3$). C= kontroll (0 μM AL alene).*

Dette viste tendens til at den høyeste konsentrasjonen av mevalonolakton (1000 μM) motvirket atorvastatineffekten på legumainuttrykket, men det ble ikke vist en signifikant forskjell (Fig. 4-4C). Ved behandling med 200 μM atorvastatin ble legumainuttrykket totalt hemmet, noe som samsvarte med aktivitetsmålingene (Fig. 4-3A).

4.4 Forsterket atorvastatineffekt på reduksjon av enzymaktivitet i celler inkubert i fravær av serum versus med serum

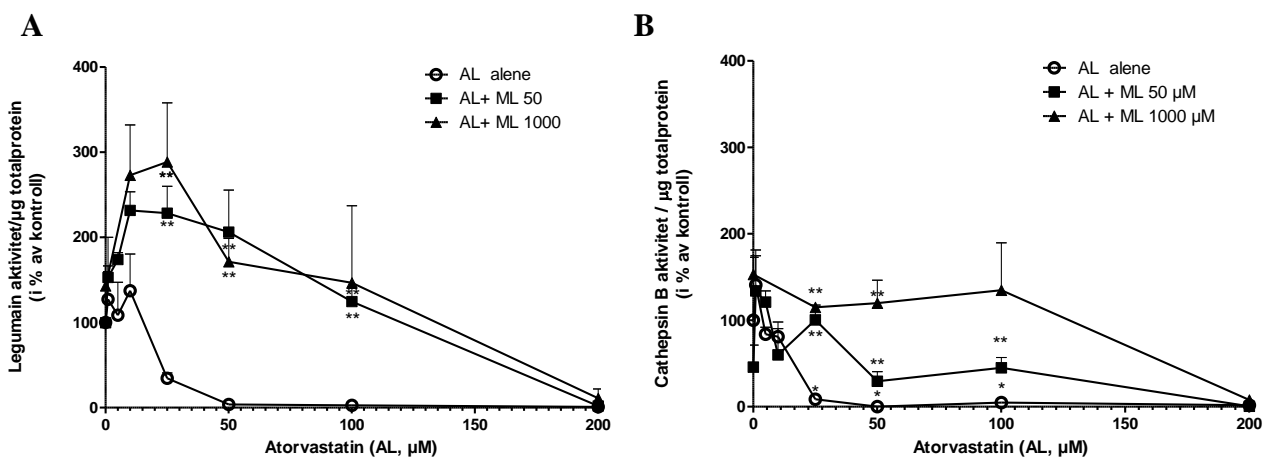
RAW 264,7 makrofager ble inkubert med atorvastatin (1-200 μM) og/eller mevalonolakton (50 eller 1000 μM) i fravær av serum i 4 døgn. Legumain- og cathepsin B-aktivitet og proteinuttrykk ble deretter målt i cellelysaten.

RAW 264,7 makrofagene hadde basalaktivitet av både legumain (26,45 dF/ μg totalprotein; 100 %; Fig.4-5A) og cathepsin B (787,20 dF/ μg totalprotein; 100 %; Fig.4-5B). For de cellene som ble behandlet med atorvastatin alene eller sammen med 50 eller 1000 μM mevalonolakton, ble IC_{50} beregnet til å være henholdsvis 23, 161 og 171 μM for legumain, og 17, 43 og 169 μM for cathepsin B. Den atorvastatinreduserende effekten på enzymaktivitet ble mye kraftigere i cellene som ble inkubert i fravær av serum, sammenliknet med de som ble inkubert med serum. Denne forskjellen blir tydelig ved sammenlikning av IC_{50} -verdiene i forsøkene med og uten serum (tabell 4-1). Reduksjonen i enzymaktivitet ble forhindret ved tilsetning av mevalonolakton. Behandling av makrofagene med atorvastatin alene viste en signifikant reduksjon av legumainaktivitet ved alle konsentrasjoner. Dette ble også observert i celler som ble behandlet med 25, 50 og 100 μM atorvastatin sammen med mevalonolakton (både 50 eller 1000 μM).

Tabell 4-1: Oversikt over IC_{50} av legumain- og cathepsin B-aktivitet i celleforsøk etter stimulering med atorvastatin (AL) og/eller mevalonolakton (ML) med og uten serum i dyrkningsmedium

		Konsentrasjon som gir 50 % reduksjon i enzymaktivitet, IC_{50}		
Medium	Enzym	AL (μ M)	AL + 50 μ M ML	AL + 1 mM ML
Med serum	Legumain	91	211	195
	Cathepsin B	147	182	-
Uten serum	Legumain	23	161	171
	Cathepsin B	17	43	169

Når det gjelder cathepsin B-aktivitet, ble det ikke observert signifikant reduksjon før cellene ble behandlet med høye konsentrasjoner av atorvastatin (25, 50, 100 og 200 μ M) alene (Fig.4-5B). Samtidig behandling med mevalonolakton (50 eller 1000 μ M) viste en signifikant høyere enzymaktivitet enn behandling med atorvastatin alene ved 25, 50 og 100 μ M. Dette med unntak av behandling med 100 μ M atorvastatin alene sammen med 1000 μ M mevalonolakton.

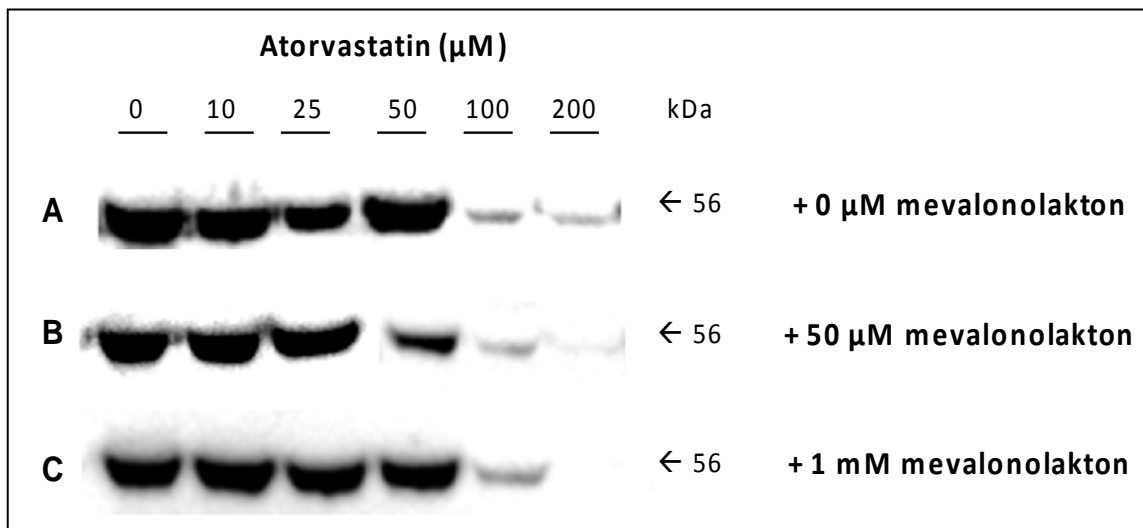


Figur 4-5: Legumain- og cathepsin B-aktivitet i cellelysater av RAW 264,7 etter inkubering med økende konsentrasjoner av atorvastatin og uten serum. RAW 264,7

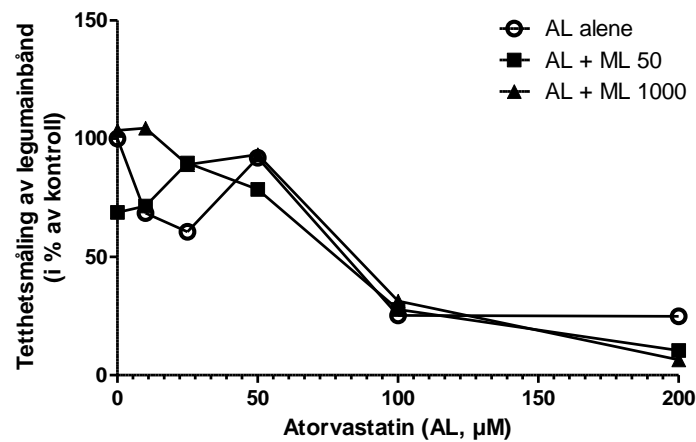
makrofager (5×10^5 celler) ble inkubert med atorvastatin (0-200 μM) med eller uten mevalonolakton (50 eller 1000 μM) i 4 døgn og legumainaktivitet (dF/sekund per μg protein) ble målt ved bruk av spesifikke fluorescerende peptidsubstrater. Målinger av aktivitet er normalisert og presentert som prosent av kontroll \pm SEM ($n = 1-4$). Signifikante forskjeller mellom aktuell AL-konsentrasjon i forhold til kontroll (0 μM AL alene; $p < 0,05$) er markert (*). Signifikante forskjeller mellom behandling med atorvastatin sammen med mevalonolakton (AL + 50 μM og AL + 1000 μM) i forhold til behandling med atorvastatin uten mevalonolakton (AL alene) ved de aktuelle atorvastatin-konsentrasjonene ($p < 0,05$) er markert (**). **A:** Legumainaktivitet i % av kontroll. **B:** Cathepsin B-aktivitet i % av kontroll.

I de korresponderende cellemediene var det ønskelig å undersøke om atorvastatin og mevalonolakton også regulerte sekresjonen av legumain fra RAW 264,7 makrofager. Etter elektroforese og Western blotting, ble det detektert store mengder proform av legumain med en størrelse på 56 kDa fra ubehandlede celler (figur 4-6A).

Proteinbåndene for prolegumain ble svakere med økende konsentrasjon av atorvastatin alene (figur 4-6A), og tilsetning av mevalonolakton (50 og 1000 μM) samtidig motvirket ikke denne reduksjonen (figur 4-6B og C). Det ser derimot ut som om tilsetning av 1 mM mevalonolakton sammen med 200 μM atorvastatin forårsaket en total inhibisjon av legumainsekresjonen.



D

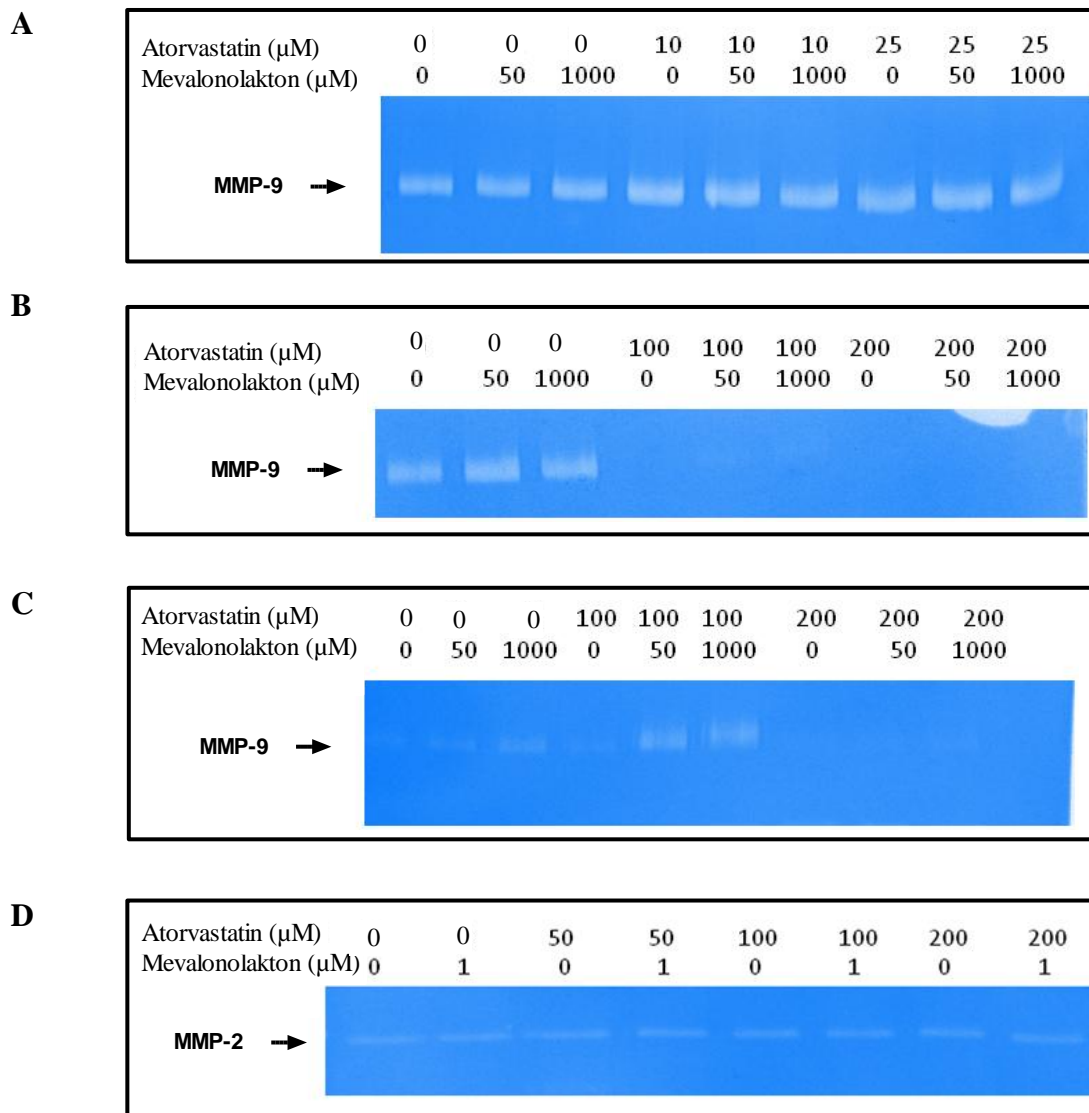


Figur 4-6: Western blott og kvantifisering av legumain i kondisjonert medium fra atorvastatin-behandlede RAW 264,7 makrofager dyrket i fravær av serum. RAW 264,7 makrofager (5×10^5 celler) ble inkubert i 4 døgn med atorvastatin (0-200 μM) og/eller mevalonolakton (50 eller 1000 μM). Prøve (15 μl medium) ble applisert i hver brønn, og blottene ble analysert ved bruk av et legumainspesifikt antistoff. **A:** Med eller uten atorvastatin alene. **B:** Atorvastatin og mevalonolakton (50 μM). **C:** Atorvastatin og mevalonolakton (1000 μM). **D:** Kvantifisering av legumain-båndene i A, B og C. Båndintensiteten ble kvantifisert og normalisert (mot 0 μM AL alene for samtlige behandlinger) i forhold til kontroll (100 %) ($n = 1$).

4.5 Effekt av atorvastatin og mevalonolakton på sekresjon av MMP-2 og -9 fra RAW 264,7 makrofager

RAW 264,7 makrofager ble inkubert med atorvastatin (1-200 μM) og/eller mevalonolakton (50 eller 1000 μM) i fravær av serum i 4 døgn (4.4). Etter elektroforese og zymografi av kondisjonerte medier ble det detektert lysissoner i gelene som representerte MMP-2 og -9 fra både ubehandlede celler og fra celler behandlet med atorvastatin og/eller mevalonolakton. Lysisbånd av MMP-2 (72 kDa) og MMP-9 (92 kDa) ble bestemt ved hjelp av blodstandard (ikke vist i figur). Lysisbåndene som representerte MMP-9 ble visuelt sterkere med økende konsentrasjoner av atorvastatin (til og med 50 μM atorvastatin, både med og uten mevalonolakton 50 eller 1000 μM) selv om mediet var fortynnet 1:10 (Fig.4-7A). De høyeste konsentrasjonene av atorvastatin (100 og 200 μM) viste derimot en reduksjon i MMP-9-sekresjonen. Dette medførte at båndene ble veldig svake ved fortynningen 1:10 av disse

mediene (Fig.4-7B). Det ble derfor utført en ny zymografi hvor de samme medieprøvene ble applisert uforynnet (Fig.4-7C), noe som førte til at MMP-9-båndene kom noe tydeligere fram. I sistnevnte tilfelle ble lysisbåndene som representerte MMP-9 visuelt sterkere ved behandling med atorvastatin sammen med mevalonolakton tilstede. Atorvastatin hadde ingen effekt på sekresjonen av MMP-2 og svake bånd kunne sees i medier fra både ubehandlet kontroll og etter behandlinger (Fig.4-7D).

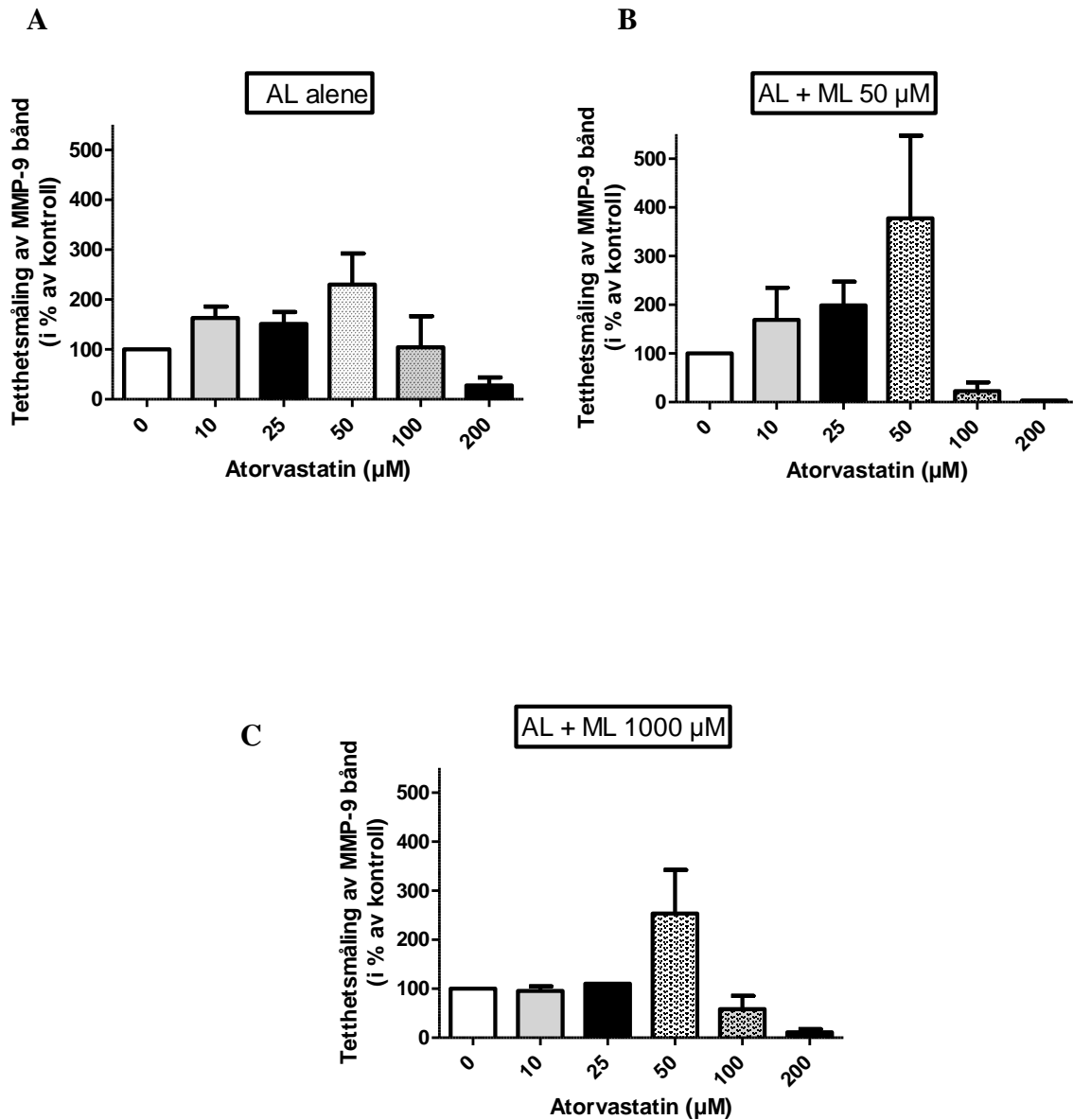


Figur 4-7: Zymografi av kondisjonert serumfritt medium fra RAW 264,7 celler etter inkubering med økende konsentrasjoner av atorvastatin med eller uten mevalonolakton. RAW 264,7 makrofager (5×10^5 celler/brønn) ble inkubert med atorvastatin (0-200 μM) med eller uten mevalonolakton (50 og 1000 μM) i 4 døgn. Cellemedium med samplebuffer

*(1:1; 15 μ l) ble applisert i hver brønn. **A og B:** MMP-9, kondisjonert medium fortynnet 1:10. **C:** MMP-9, kontrollene både med og uten mevalonolakton (50 eller 1000 μ M) ble fortynnet 1:10, mens resten av prøvene ble applisert ufortynnet. **D:** MMP-2, kondisjonert medium fortynnet 1:5.*

Størrelsen av MMP-9-båndene ble kvantifisert ved hjelp av tetthetsmålinger. Tetthetsmålinger av behandlingene med atorvastatin alene eller med atorvastatin sammen med mevalonolakton (50 eller 1000 μ M) var ikke signifikant forskjellige fra hverandre, eller i forhold til kontroll. Behandlingene er fremstilt hver for seg i stolpediagram (Fig.4-8).

RAW-celler som ble stimulert med økende konsentrasjoner av atorvastatin alene (10-50 μ M), viste en forsterket økt av MMP-9 i forhold til kontroll (Fig.4-8A). Behandling med de høyeste konsentrasjonene av atorvastatin alene (100-200 μ M) virket derimot hemmende på MMP-9-sekresjonen. Tilsvarende ble målt for MMP-9-sekresjonen ved tilsetning av 50 μ M mevalonolakton i tillegg til atorvastatin (Fig.4-8B). Tetthetsmålinger av MMP-9-lysissonene etter behandling med atorvastatin (10-25 μ M) sammen med 1000 μ M mevalonolakton, viste ingen effekt fram til cellene ble behandlet med 50 μ M atorvastatin, hvor det ble målt en stimulert MMP-9-sekresjon som tilsvarte tetthetsmålingene fra behandlingene med 50 μ M atorvastatin med og uten 50 μ M mevalonolakton (Fig.4-8C). Målingene som ble gjort med de høyeste konsentrasjonene av atorvastatin (100-200 μ M) sammen med 1000 μ M mevalonolakton, viste en hemmende effekt på MMP-9-sekresjonen.



Figur 4-8: Kvantifisering av MMP-9 i serumfritt medium fra atorvastatinbehandlede RAW 264,7 makrofager. RAW 264,7 makrofager (5×10^5 celler/brønn) ble inkubert med atorvastatin (AL; 0-200 µM) med eller uten mevalonolakton (ML; 50 og 1000 µM) i 4 døgn. Etter zymografi (figur 3-7) ble tetthetsmålinger utført og verdiene normalisert (mot 0 µM AL) og presentert som prosent av kontroll (100 %) \pm SEM ($n = 2-4$). **A:** AL alene. **B:** AL med 50 µM ML. **C:** AL med 1000 µM ML.

5. Diskusjon

Nyere studier viser at utviklingen av aterosklerose skyldes en gradvis økt inflammasjonsprosess med omfattende remodellering av ekstracellulær matriks (ECM), endotelceller (EC) og glatte muskelceller (SMC) i blodkarene, hvor aktive monocytter/makrofager og ulike proteaser er involvert [5, 9, 13, 82]. I en studie hvor genuttrykket ble undersøkt i ustabile og stabile aterosklerotiske plakk, ble det observert en signifikant økning i mRNA for CD68 (markør for makrofager), cysteinproteasene legumain og cathepsin B, samt matriks metalloproteasen MMP-9 [13]. Differensierte makrofager i ustabile plakk uttrykker høye proteinnivåer av prolegumain som blir utskilt ekstracellulært [16, 83]. Hvordan genuttrykket av legumain reguleres i makrofager ved aterosklerose er ukjent, men proinflammatoriske cytokiner som IL-1 β , IFN- γ eller TNF α kan være involvert, siden disse er vist å forsterke uttrykket av cysteinproteaser i monocytter [84, 85]. I tillegg til legumain, uttrykker makrofager også MMP-er og cathepsiner [8, 13].

Nyere data viser at legumain kan degradere fibronectin som er en viktig bestanddel i ECM. Dette kan indikere en potensiell rolle for legumain i remodellering av ECM [20]. Videre kan legumain bidra til remodelleringen indirekte ved å prosessere og/eller aktivere kollagen- og elastindegraderende proteaser, som proMMP-2 [21] og cathepsin B, H og L [22]. De proteolytiske prosessene kan føre til destabilisering av den fibrøse kappen i plakket [8, 16, 53, 55, 83]. I enkelte studier assosieres proteasene med iskemisk hjerneskade i etterkant av et hjerneslag [86] og med økt dødelighet blant eldre [12]. Legumain er veldig interessant i denne sammenhengen, men kunnskap om legumains molekylære funksjoner er fortsatt begrenset. I oppgaven ble hovedfokuset rettet mot cysteinproteasene legumain og cathepsin B, samt matriksmetalloproteasene MMP-2 og -9.

Statiner har utover de kolesterolsenkende effektene fått økt oppmerksomhet rundt deres pleiotrope effekter. LDL-kolesterolsenkende statinterapi har vist vesentlige kliniske fordeler hos aterosklerotiske pasienter. I en studie av monocytter fra aterosklerotiske pasienter stimulert med 20 og 80 mg atorvastatin, ble det observert reduserte nivåer av både legumain og MMP-1 etter 12 ukers behandling. En langvarig behandling med lave atorvastatindoser viste seg å være mer effektivt for å redusere legumain gradvis enn kortvarig behandling med høye doser. Videre i studien ble det observert økt uttrykk av gener involvert i apoptose av monocytter/makrofager, herunder tumorsuppressorgenet p53, som følge av statinbehandlingen

[8]. De pleiotrope effektene av statiner er i likhet med den kolesterolreducerende effekten antatt å skyldes en hemming av mevalonsyresyntesen gjennom hemming av HMG-CoA-reduktase. Dette medfører en nedregulering av isoprenoidene FPP og GGPP som er nedstrømsproduktene i mevalonsyresyntesen. Isoprenoidene inngår i syntesen av små GTP-bindende proteiner, herunder Ras og Rho. Hemming av Rho i makrofager medfører at transkripsjonsfaktoren "nuclear factor κ B" (NF- κ B) ikke migrerer til cellekjernen for å aktivere transkripsjon av inflammatoriske mediatorer [87].

I denne oppgaven var det ønskelig å bekrefte hypotesen om at statiner utøver sin pleiotrope effekt gjennom hemming av mevalonsyresyntesen, og undersøke om statiner nedregulerer syntese av cysteinproteasene legumain og cathepsin B, og matriks metalloproteasene MMP-2 og -9 i makrofager gjennom denne virkningsmekanismen. En nylig masteroppgave i gruppen har indikert hemming av aktivitet av legumain og cathepsin B, samt økt sekresjon av MMP-9 fra makrofager [68] og målet var å bekrefte disse funnene. Analyser av cystein- og matriks metalloproteasene ble utført ved bruk av protein- og enzymaktivitetsmålinger, immunoblotting og zymografi.

5.1 Valg av cellemodell og analysemetoder

Aterosklerose er en inflammasjonssykdom karakterisert ved økt rekruttering av monocytter som differensieres til makrofager i aterosklerotiske lesjoner i karendotel. Disse makrofagene deltar i opptak og metabolisme av lipider i endotelet og utvikles til skumceller, som undergår apoptose og utgjør den nekrotiske kjernen i plakket. Skumcellene er en stor kilde til proinflammatoriske cytokiner og kjemokiner som fører til økt rekruttering av flere monocytter [8]. Makrofagene kan skille ut proteaser som legumain, cathepsin B, MMP-2 og -9, som kan degradere ECM og dermed svekke den fibrøse kappen og predisponere plakket for ruptur [8, 11, 13]. På grunn av makrofagenes viktige rolle i utviklingen av aterosklerose og i produksjonen av proteaser, er makrofager godt egnet som surrogat for aterosklerotisk vev for å studere effekten av statiner hos aterosklerotiske pasienter [8]. I oppgaven ble RAW 264,7 makrofager fra mus benyttet som cellemodell for å studere effekten av atorvastatin. RAW 264,7 celler er blitt brukt som *in vitro* modell for humane makrofager i flere studier [68, 88, 89]. Cellemodellen har egenskaper som gjør den fordelaktig i forsøkssammenheng, i form av lang levetid i kultur (brukes i 20-30 passasjer), reduserte krav til serum og andre medietilsetninger og kort doblingstid.

Av flere statiner falt valget på atorvastatin til behandling av RAW 264,7 cellene for å undersøke statinets effekt på cellenes uttrykk av legumain, cathepsin B, MMP-2 og -9. Atorvastatin er blitt brukt i flere studier for å studere de ovennevnte proteasene i celler [8, 56, 90, 91]. Cellene ble tilsatt atorvastatin med eller uten mevalonolakton til stede for å undersøke om statinets nedregulerende effekter på enzymaktivitet skjedde gjennom hemming av mevalonsyresyntesen.

Det var interessant å studere legumain nærmere i sammenheng med aterosklerose, da det er en nyoppdaget protease i aterosklerotiske plakk og har som nevnt vært involvert i prosesseringen av cathepsin B og MMP-2, og er en potensiell aktivator av MMP-9 [8, 13, 21]. Aktivitet av legumain og cathepsin B ble målt i cellelysater ved bruk av ulike, spesifikke peptidsubstrater. Metodene som ble brukt var beregnet for å kunne brukes på ulike typer vev, heriblant cellelysater, og var av den grunn godt egnet [17, 73-75]. Z-Ala-Ala-Asn-NH₂Mec som er et legumainspesifikt substrat ble brukt i aktivitetsmålingen. Sannsynligheten for at det var legumain som ble detektert er høy, da legumain er den eneste kjente endopeptidasen med restriktiv spesifisitet for Asn i P1-posisjon [92]. Tilsvarende gjelder for cathepsin B som er spesifikk for Z-Arg-Arg-NH₂Mec-substratet. Arg-Arg-sekvensen er ekstremt sensitiv for cathepsin B, men er resistent mot cysteinproteasene cathepsin H og L [75]. Måling av totalprotein ble utført etter Bradford-metoden, som er en meget utbredt metode til kvantifisering av proteiner [72, 93]. Enzymaktivitetsmålinger ble delt på mengde totalprotein i prøven (dF/sekund per µg totalprotein) for å korrigere enzymaktivitet med antall celler per prøve. Rådata ble normalisert ved fremstilling og presentasjon på grunn av store spredningsvariasjoner i enkelte av forsøkene.

Western blotting som anvendes til kvalitative og kvantitative analyser er en veletablert, sensitiv og robust metode som ble brukt til å kvantifisere legumainprotein i prøver fra RAW 264,7 celler [77]. Metoden har blitt brukt til detektering av legumain i prøver fra aterosklerotiske pasienter i flere studier [13, 83]. Zymografi ble anvendt til analyse av MMP-2 og -9, en metode som er mye brukt til analyse av MMP-er med gelatinaseaktivitet [79, 80].

5.2 Atorvastatin hemmer legumain og cathepsin B

I celleviabilitetsforsøkene viste cellene en doseavhengig reduksjon i celleviabilitet med økende konsentrasjoner av atorvastatin. IC₅₀ ble beregnet til å være om lag 200 µM. Den reduserte celleviabiliteten ble forebygget når cellene ble behandlet med mevalonolakton

sammen med atorvastatin. Dette kan være en indikasjon på at atorvastatin utøver sine pleiotrope effekter gjennom hemming av mevalonsyresyntesen, og at effektene ikke skyldes celletoksisitet etter atorvastatinbehandling. De pleiotrope effektene kan utøves ved hemming av HMG-CoA-reduktase og dermed forårsakes en reduksjon av isoprenoidene FPP og GGPP. Isoprenoidene er essensielle for produksjon og funksjoner av enkelte G-proteiner og cytokiner [54], som kan ha vært nødvendige for RAW-cellenes proliferasjon. Tilsetning av mevalonolakton kan via denne mekanismen ha motvirket den celletoksiske effekten av atorvastatin, og dermed virket beskyttende på cellene ved å oppregulere nivået av isoprenoide. Tilsvarende observasjoner er publisert i en studie av Kwak *et al.*[94], på celler behandlet med atorvastatin både med og uten mevalonolakton til stede.

Det er tidligere nevnt at statiner hemmer aktivitet av legumain og cathepsin B i flere studier. Forsøkene i oppgaven viste at de høyeste konsentrasjonene (100 og 200 μM) med atorvastatin reduserte legumain- og cathepsin B-aktivitet i cellelysater fra RAW-makrofager etter 24 timers inkubering. Denne nedreguleringen ble motvirket ved tilsetning av mevalonolakton ved samtidig behandling med høye konsentrasjoner av atorvastatin (50 og 100 μM). Mevalonolaktonets motvirkende effekt kan antas å skje gjennom økt syntese av isoprenoidene FPP og GGPP. Dette kan undersøkes nærmere ved å måle FPP og GGPP direkte i celler før og etter behandling med atorvastatin og/eller mevalonolakton.

I forsøkene hvor RAW-celler ble inkubert i 4 døgn i fravær av serum, ble cellene mer sårbare ved behandling med atorvastatin og/eller mevalonolakton, sammenliknet med cellene som ble inkubert i 24 timer med serum. Dette ble vist ved at IC_{50} for cellene som ble behandlet med atorvastatin og/eller mevalonolakton ble beregnet til å være mye lavere ved inkubering i 4 døgn i stedet for 24 timer (tabell 4-1). Effekten av atorvastatin på enzymaktiviteten ble mye tydeligere ved lave konsentrasjoner i fravær av serum, sammenliknet med når cellene ble inkubert med serum. Tilsvarende ble observert ved tilleggsbehandling med mevalonolakton: de motvirkende effektene av mevalonolakton på atorvastatins effekter ble mer markant uten serum tilstede. Forsøkene ble utført med det formål å måle MMP-2 og -9-sekresjon, og det var derfor viktig å inkubere cellene i fravær av serum da serum inneholder MMP-er og det blir umulig å bestemme cellenes bidrag til MMP-nivået. Serum inneholder også blant annet vekstfaktorer og hormoner (EGF, PDGF, insulin, IL-6 m.m.) og albumin (fungerer som transportprotein for lipider og fettsyrer, steroider og fettløselige vitaminer, som buffersubstans og beskytter celler mot mekanisk skade). Disse stoffene kan ha vært viktige for å gjøre cellene motstandsdyktige og robuste mot atorvastatineffekter. Cellene som ble inkubert i fravær av

serum kan av den grunn ha vært mer sårbare ved behandling med atorvastatin. Serumet kan også ha bidratt til et miljø som ligger nærmere det ”naturlige” miljøet for cellene å leve i. Fordelen med å studere cellene i fravær av serum er at forskjellen mellom behandlingene med atorvastatin alene og atorvastatin med eller uten mevalonolakton kommer tydeligere fram.

Legumain er en cysteinprotease som finnes i flere former. Prosesseringen av de ulike formene er pH-avhengig og skjer autokatalytisk ved sur pH. Inaktivt og fullkjedet prolegumain på 56 kDa syntetiseres i prelysosomale områder med innhold av et C-terminalt domene og et N-terminalt propeptid. Når pH reduseres til ca. 5,5 vil legumain undergå en autokatalytisk kløyving av det C-terminale domenet ved asparagin³²³ som resulterer i en inaktiv og intermediær form på 47 kDa. En ytterligere senkning av pH til ca. 4,5 vil medføre kløyving av det N-terminale propeptidet ved aspartat²⁵ som fører til dannelse av den aktive formen av legumain på 46 kDa. *In vivo* vil lysosomale proteaser supplementere den autokatalytiske prosesseringen av aktivt legumain på 46 kDa til den modne aktive formen på 36 kDa [17, 18].

Ved Western Blotting ble det detektert legumainbånd ved 36, 46/47 og 56 kDa, noe som stemmer godt overens med molekylvektene av aktiv-, intermediære- og proform av legumain [18]. Bestemmelse av proform på 56 kDa ble bekreftet ved bruk av rekombinant legumainstandard og molekylvektsstandard (Precision Plus Protein™ Standards Dual Color) (standardene er ikke vist i blottene i oppgaven). Proteinbåndet for proformen av legumainstandard ble detektert med en noe høyere molekylvekt (57 kDa) grunnet fusjonering med ”polyhistidin (HIS)-tag” på C-terminale side av prolegumain [95], som brukes ved rensing av rekombinant legumain. Proteinbåndene for pro-, intermediær- og aktiv form av legumain i cellelysater ble svakere med økende konsentrasjoner av atorvastatin både med og uten mevalonolakton tilstede. Disse resultatene står i motsetning til aktivitetsdata av legumain etter supplerende mevalonolaktonbehandling, som viste at mevalonolakton motvirket atorvastatineffekten. En mulig forklaring på resultatene fra Western blottingen kan være at de detekterte legumainbåndene på 36 kDa ikke nødvendigvis indikerer at det er aktivt legumain tilstede. Har det vært endringer i pH eller i lokaliseringen av legumain intracellulært, som videre har forårsaket nøytralisering av pH eller endret tertiærstruktur av legumain kan dette ha medført tap av aktivitet for legumain. Det uttrykte legumainproteinet på 36 kDa vil fortsatt være tilstede ved Western blotting og vil kunne detekteres, men vil ikke nødvendigvis være en indikasjon på aktivt legumain, til forskjell fra enzymaktivitetsdata.

Det ble også kjørt Western blotting på kondisjonert medium fra RAW-celler etter inkubering i 4 døgn i fravær av serum. Det ble detektert proteinbånd for proformen av legumain ved 56 kDa som ble svakere ved behandling med økende konsentrasjoner av atorvastatin både med og uten mevalonolakton. Det ble ikke detektert proteinbånd for intermediære- og aktiv form. Resultatene kan tolkes som at proformen av legumain sekreses ut i medium fra RAW-celler, og at behandling med atorvastatin reduserer sekresjon av proformen. Når sekresjonen av prolegumain reduseres av statiner, medfører dette blant annet at det blir mindre prolegumain i cytosol som kan autoaktiveres i surt miljø ved f.eks. inflammasjon i aterosklerotiske plakk. De proteasene som er substrater for legumain, herunder cathepsin B og MMP-2, vil dermed ikke prosesseres uten aktivt legumain tilstede. Statinenes reduserende effekter på sekresjon av prolegumain kan dermed bidra til å stabilisere aterosklerotiske plakk ved å redusere prosessering av proteaser som er substrater for legumain. Atorvastatin stimulerer MMP-9 sekresjon

I tidligere studier er det blitt observert oppregulerte nivåer av MMP-2 og -9 i aterosklerotiske plakk. MMP-ene står for størsteparten av kollagendegraderingen i plakk [58, 96]. Flere studier viser at statiner nedregulerer sekresjon av MMP-2 og -9 i aterogene områder [8, 55, 56, 58, 97]. I denne oppgaven ble RAW-celler behandlet med økende konsentrasjoner av atorvastatin og/eller mevalonolakton i fravær av serum i 4 døgn. Data viste at konsentrasjoner opptil 100 μM av atorvastatin alene stimulerte sekresjon av MMP-9. Ved behandling med atorvastatin og/eller mevalonolakton, ble sekresjonen av MMP-9 hovedsakelig redusert. Sekresjonen av MMP-2 var upåvirket av statinbehandlingen.

De funnene som er blitt gjort med hensyn på MMP-2 og -9 i denne oppgaven, står i strid med de studiene som beskriver statinenes hemmende effekt på sekresjon av MMP-2 og -9. Samtidig finnes det også enkelte studier som bekrefter de resultatene som er blitt vist i denne oppgaven. I en *in vivo* studie utført av Muehling *et al.* ble effekter av simvastatin og fluvastatin på MMP-2 og -9 aktivitet undersøkt. Ingen av statinene utviste reduserende effekter på MMP-ene i serum [98]. En annen studie utført med atorvastatin på abdominale aortiske aneurismer viste heller ingen reduksjon på MMP-2 og -9 aktivitet [99]. Det kan virke som om det er flere studier som motsier hverandre med tanke på statinenes effekt på MMP-er. Det kan være flere mulige årsaker til de motstridende resultatene. MMP-studier utført på forskjellige cellemodeller med varierende behandlingstider og betingelser kan ha hatt innvirkning på resultatene. De ulike statinene som ble brukt til behandling av cellene kan inneha varierende effektivitet og lipofilisitet/hydrofilisitet. Denne variasjonen kan ha noe å si

for statinets halveringstid, cellepermeabilitet og potensiale. Dog er det vist at statinets lipo- og hydrofilisitet ikke er relevant for den kliniske og pleiotrope effekten [100, 101]. Videre kan utvalget av pasienter og antall forsøk ha vært for små til å kunne gi sikre resultater.

De serumfrie forsøkene ble utført med hensyn på å studere MMP-2 og -9 spesielt. Studier på MMP-er er blitt utført på tilsvarende måte med den hensikt å studere utvalgte MMP-er [55, 57, 58, 102]. Det fins totalt 28 MMP-er, hvorav 11 er involvert i biologiske prosesser assosiert med aterosklerose [67]. Hvordan samspillet mellom de ulike MMP-ene fungerer er ennå ikke studert. Det kan hende at flere MMP-er er avhengige av hverandre og til sammen gir en synergistisk effekt for å utøve skadelige effekter som er blitt observert ved aterosklerose. Å undersøke sekresjon av MMP-2 og -9 alene etter behandling med atorvastatin, er kanskje ikke tilstrekkelig for å kunne si noe om den helhetlige sammenhengen, og det kan være andre celler enn makrofagene som også bidrar til sekresjon av MMP-er.

Konsentrasjonene av atorvastatin i denne oppgaven har variert fra 1-200 μM . Terapeutiske doser av 40 mg atorvastatin oppgitt med C_{max} (maksimal plasmakonsentrasjon) har vist å være 4,2 ng/ml, som tilsvarer $<0,01 \mu\text{M}$ atorvastatin [103]. I oppgaven er behandlingstiden med atorvastatin kortere enn i klinisk praksis, og atorvastatindosene er mye høyere enn de terapeutiske dosene. Men korttidsbehandling med høye atorvastatindoser kan gi en indikasjon på langtidseffektene ved behandling med lave atorvastatindoser.

6. Konklusjon

Basert på funnene som er gjort i studien, kan det konkluderes med at:

- Behandling av RAW-makrofager med økende konsentrasjoner av atorvastatin påvirker cellenes morfologi.
- Atorvastatin alene reduserer cellenes viabilitet ($IC_{50} = 200 \mu M$), mens supplerende behandling med 50 eller 1000 μM mevalonolakton har en signifikant beskyttende effekt på celleviabiliteten ($p=0,01$ og $0,0002$).
- Atorvastatin har en signifikant nedregulerende effekt på aktivitet av cysteinproteasene legumain ($IC_{50} = 91 \mu M$) og cathepsin B ($IC_{50} = 147 \mu M$) i RAW-makrofager. Samtidig tilsetning av mevalonolakton har en motvirkende tendens til atorvastatineffekten.
- Fravær av serum gjør makrofager mer følsomme for atorvastatineffekter på proteaseaktivitet (legumain; $IC_{50} = 23 \mu M$ og cathepsin B; $IC_{50} = 17 \mu M$). Samtidig tilsetning av mevalonolakton i fravær av serum har en sterk motvirkende tendens til atorvastatineffekten.
- Atorvastatin stimulerer sekresjon av MMP-9 fra RAW 264,7 celler, men har ingen effekt på sekresjon av MMP-2.

Litteraturliste

1. Linton, M.F. and S. Fazio, *Macrophages, inflammation, and atherosclerosis*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27 Suppl 3**: p. S35-40.
2. Lutgens, E., et al., *Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(12): p. 2123-30.
3. Ohtani, H., *Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions*. Pathol Int, 1998. **48**(1): p. 1-9.
4. Libby, P. and R.T. Lee, *Matrix matters*. Circulation, 2000. **102**(16): p. 1874-6.
5. Parks, W.C., *Who are the proteolytic culprits in vascular disease?* J Clin Invest, 1999. **104**(9): p. 1167-8.
6. Libby, P., *Molecular bases of the acute coronary syndromes*. Circulation, 1995. **91**(11): p. 2844-50.
7. Libby, P., *Changing concepts of atherogenesis*. J Intern Med, 2000. **247**(3): p. 349-58.
8. Wang, Z.H., et al., *Pleiotropic effects of atorvastatin on monocytes in atherosclerotic patients*. Journal of Clinical Pharmacology, 2010. **50**(3): p. 311-319.
9. Liu, J., et al., *Lysosomal Cysteine Proteases in Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2004. **24**(8): p. 1359-1366.
10. Bai, L., E. Lutgens, and S. Heeneman, *Cathepsins in Atherosclerosis*, in *Atherosclerosis 2010*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 173-191.
11. Lutgens, S.P.M., et al., *Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease*. The FASEB Journal, 2007. **21**(12): p. 3029-3041.
12. Jobs, E., et al., *Association Between Serum Cathepsin S and Mortality in Older Adults*. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 2011. **306**(10): p. 1113-1121.
13. Papaspyridonos, M., et al., *Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006. **26**(8): p. 1837-1844.
14. Turk, B., *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 785-799.
15. Bei R., M.L., Palumbo C., Modesti A., *Autoantibodies to Extracellular Matrix Components as Outcome of Tissue Chronic Inflammation*, in *Autoantibodies Research Progress*, Q.P. Dubois, Editor 2008, Nova Science Publishers, Inc.: New York. p. 99-125.
16. 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.
17. Chen, J.-M., et al., *Cloning, Isolation, and Characterization of Mammalian Legumain, an Asparaginyl Endopeptidase*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(12): p. 8090-8098.
18. Li, D.N., et al., *Multistep Autoactivation of Asparaginyl Endopeptidase in Vitro and in Vivo*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(40): p. 38980-38990.
19. Sarandeses, C.S., et al., *Prothymosin alpha is processed to thymosin alpha 1 and thymosin alpha 11 by a lysosomal asparaginyl endopeptidase*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 13286-93.
20. Morita, Y., et al., *Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells*. FEBS Letters, 2007. **581**(7): p. 1417-1424.

21. Chen, J.M., et al., *Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase*. Biol Chem, 2001. **382**(5): p. 777-83.
22. Shirahama-Noda, K., et al., *Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33194-9.
23. Hatsugai, N., et al., *A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death*. Science, 2004. **305**(5685): p. 855-8.
24. Manoury, B., et al., *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 695-9.
25. Manoury, B., et al., *Destructive processing by asparagine endopeptidase limits presentation of a dominant T cell epitope in MBP*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 169-174.
26. Burster, T., et al., *Cathepsin G, and Not the Asparagine-Specific Endoprotease, Controls the Processing of Myelin Basic Protein in Lysosomes from Human B Lymphocytes*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(9): p. 5495-5503.
27. Abe, Y., et al., *Asparaginyl endopeptidase of jack bean seeds. Purification, characterization, and high utility in protein sequence analysis*. J. Biol. Chem., 1993. **268**(5): p. 3525-3529.
28. Sepulveda, F.E., et al., *Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 737-48.
29. Gawenda, J., et al., *Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **102**(1): p. 1-6.
30. Luo, Y., et al., *Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2132-2141.
31. Choi, S.J., et al., *Identification of human asparaginyl endopeptidase (legumain) as an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27747-53.
32. Choi, S.J., et al., *Osteoclast inhibitory peptide 2 inhibits osteoclast formation via its C-terminal fragment*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(10): p. 1804-11.
33. Chen, J.M., et al., *Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase*. Biochem J, 1998. **335** (Pt 1): p. 111-7.
34. Cheng, T., et al., *Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15893-9.
35. 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.
36. Chwieralski, C.E., T. Welte, and F. Buhling, *Cathepsin-regulated apoptosis*. Apoptosis, 2006. **11**(2): p. 143-9.
37. Lafarge, J.-C., et al., *Cathepsins and cystatin C in atherosclerosis and obesity*. Biochimie, 2010. **92**(11): p. 1580-1586.
38. Colbert, J.D., et al., *Internalization of exogenous cystatin F suppresses cysteine proteases and induces the accumulation of single-chain cathepsin L by multiple mechanisms*. J Biol Chem, 2011. **286**(49): p. 42082-90.
39. Briggs, J.J., et al., *Cystatin E/M suppresses legumain activity and invasion of human melanoma*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 17.
40. Shi, G.P., et al., *Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms*. J Clin Invest, 1999. **104**(9): p. 1191-7.

41. Taleb, S., et al., *Cathepsin S Promotes Human Preadipocyte Differentiation: Possible Involvement of Fibronectin Degradation*. *Endocrinology*, 2006. **147**(10): p. 4950-4959.
42. Ge, J., et al., *Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy*. *Eur J Heart Fail*, 2006. **8**(3): p. 284-9.
43. Nomura, T. and N. Katunuma, *Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells*. *J Med Invest*, 2005. **52**(1-2): p. 1-9.
44. Gocheva, V., et al., *Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis*. *Genes Dev*, 2006. **20**(5): p. 543-56.
45. Burden, R.E., et al., *Recombinant cathepsin S propeptide attenuates cell invasion by inhibition of cathepsin L-like proteases in tumor microenvironment*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(3): p. 538-47.
46. Fernandez, P.L., et al., *Expression of cathepsins B and S in the progression of prostate carcinoma*. *Int J Cancer*, 2001. **95**(1): p. 51-5.
47. Wang, B., et al., *Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(9): p. 6020-9.
48. Yang, Y., et al., *Cathepsin S mediates gastric cancer cell migration and invasion via a putative network of metastasis-associated proteins*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(9): p. 4767-78.
49. Packard, R.R. and P. Libby, *Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction*. *Clin Chem*, 2008. **54**(1): p. 24-38.
50. Sandhagen, B. and L. Lind, *The Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2012. **50**(4): p. 301-11.
51. Universitet, U. *Uppsala Longitudinal Study of Adult Men (ULSAM)*. 26.01.2011 [cited 2012 10.05.]; Available from: <http://www2.pubcare.uu.se/ULSAM/publ/indexpub.htm>.
52. Jevnikar, Z., Kos J. *CTSB (cathepsin B)*. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2008 24.03.2012; Available from: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/CTSBID40202ch8p23.html>.
53. Ketelhuth, D. and M. Bäck, *The Role of Matrix Metalloproteinases in Atherothrombosis*. *Curr Atheroscler Rep*, 2011. **13**(2): p. 162-169.
54. Marin, L., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease: patho-physiology, current methods of treatment and the potential for simvastatin in disease management*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2011. **8**(9): p. 1205-1220.
55. Qin, Y.-w., et al., *Simvastatin inhibited cardiac hypertrophy and fibrosis in apolipoprotein E-deficient mice fed a [ldquo]Western-style diet[rdquo] by increasing PPAR [alpha] and [gamma] expression and reducing TC, MMP-9, and Cat S levels*. *Acta Pharmacol Sin*, 2010. **31**(10): p. 1350-1358.
56. Izidoro-Toledo, T., et al., *Effects of statins on matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in human endothelial cells*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2011. **383**(6): p. 547-554.
57. Bellosta, S., et al., *HMG-CoA Reductase Inhibitors Reduce MMP-9 Secretion by Macrophages*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1998. **18**(11): p. 1671-1678.
58. Guo, H., et al., *Rosuvastatin Inhibits MMP-2 Expression and Limits the Progression of Atherosclerosis in LDLR-deficient Mice*. *Archives of Medical Research*, 2009. **40**(5): p. 345-351.
59. Quist-Paulsen, P., *Statins and inflammation: an update*. *Current Opinion in Cardiology*, 2010. **25**(4): p. 399-405 10.1097/HCO.0b013e3283398e53.

60. Ray, K.K. and C.P. Cannon, *The Potential Relevance of the Multiple Lipid-Independent (Pleiotropic) Effects of Statins in the Management of Acute Coronary Syndromes*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(8): p. 1425-1433.
61. Zhou, Q. and J.K. Liao, *Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives*. Circ J, 2010. **74**(5): p. 818-26.
62. Ali, O.F., et al., *Pleiotropic effects of statins in distal human pulmonary artery smooth muscle cells*. Respir Res, 2011. **12**: p. 137.
63. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 suppl 1): p. III-27-III-32.
64. Rasmussen, L.M., et al., *Diverse effects of inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase on the expression of VCAM-1 and E-selectin in endothelial cells*. Biochem J, 2001. **360**(Pt 2): p. 363-70.
65. Rezaie-Majd, A., et al., *Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(3): p. 397-403.
66. Abisi, S., et al., *Effect of statins on proteolytic activity in the wall of abdominal aortic aneurysms*. British Journal of Surgery, 2008. **95**(3): p. 333-337.
67. Bäck, M., D.F.J. Ketelhuth, and S. Agewall, *Matrix Metalloproteinases in Atherothrombosis*. Progress in Cardiovascular Diseases, 2010. **52**(5): p. 410-428.
68. Tewolde, E.A., *Effekt av statiner på de lysosomale cysteinproteasene legumain, cathepsin B og L i monocytter/makrofager*, 2011, The University of Oslo: Oslo.
69. (ATCC®), A.T.C.C., *Product Information Sheet for ATCC® TIB-71™*. 2012.
70. Raschke, W.C., et al., *Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus*. Cell, 1978. **15**(1): p. 261-267.
71. Solberg, S. and O.D. Lærum, *Kryobiologi – nedfrysing og oppbevaring av levende celler og vev*. Tidsskr Nor Lægeforen, 2004(124): p. 3.
72. Marion M, B., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
73. 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*. Analytical Biochemistry, 1999. **273**(2): p. 278-283.
74. Werle, B., et al., *Assessment of cathepsin L activity by use of the inhibitor CA-074 compared to cathepsin B activity in human lung tumor tissue*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1995. **376**(3): p. 157-64.
75. Barrett, A.J. and H. Kirschke, [41] *Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L, in Methods in Enzymology*, L. Laszlo, Editor 1981, Academic Press. p. 535-561.
76. Carlsson, G.H., et al., *Complexes of Horseradish Peroxidase with Formate, Acetate, and Carbon Monoxide†*. Biochemistry, 2004. **44**(2): p. 635-642.
77. Ma, H., *Western Blotting Method*. The Journal of American Science, 2006(2 (2)): p. 23-27.
78. Healthcare, G., *Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system*, 2002. p. 8-10.
79. Kjeldsen, L., et al., *Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10425-32.
80. Itoh, Y., et al., *Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24360-7.

81. Troeberg, L. and H. Nagase, *Zymography of Metalloproteinases*, in *Current Protocols in Protein Science* 2001, John Wiley & Sons, Inc.
82. Reddy, V.Y., Q.Y. Zhang, and S.J. Weiss, *Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(9): p. 3849-53.
83. Mattock, K.L., et al., *Legumain and cathepsin-L expression in human unstable carotid plaque*. *Atherosclerosis*, 2010. **208**(1): p. 83-89.
84. Sukhova, G.K., et al., *Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998. **102**(3): p. 576-583.
85. Liu, J., et al., *Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells*. *Atherosclerosis*, 2006. **184**(2): p. 302-311.
86. Ishizaki, T., et al., *The asparaginyl endopeptidase legumain after experimental stroke*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010. **30**(10): p. 1756-1766.
87. Liao, J.K. and U. Laufs, *Pleiotropic effects of statins*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. **45**: p. 89-118.
88. Lee, Y.S., H.T. Lan Tran, and Q. Van Ta, *Regulation of expression of matrix metalloproteinase-9 by JNK in Raw 264.7 cells: presence of inhibitory factor(s) suppressing MMP-9 induction in serum and conditioned media*. *Exp Mol Med*, 2009. **41**(4): p. 259-68.
89. Fava, R.A., et al., *The synthetic triterpenoid TP-222 inhibits RANKL stimulation of osteoclastogenesis and matrix metalloproteinase-9 expression*. *J Rheumatol*, 2007. **34**(5): p. 1058-68.
90. Kim, D.-E., et al., *Molecular imaging of cathepsin B proteolytic enzyme activity reflects the inflammatory component of atherosclerotic pathology and can quantitatively demonstrate the antiatherosclerotic therapeutic effects of atorvastatin and glucosamine*. *Molecular imaging*, 2009. **8**(5): p. 291-301.
91. Shirakabe, A., et al., *Immediate administration of atorvastatin decreased the serum MMP-2 level and improved the prognosis for acute heart failure*. *Journal of Cardiology*, (0).
92. Dando, P.M., et al., *Pig kidney legumain: an asparaginyl endopeptidase with restricted specificity*. *Biochem J*, 1999. **339** (Pt 3): p. 743-9.
93. Kruger, N.J., *The Bradford Method for Protein Quantitation The Protein Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor 2002, Humana Press. p. 15-21.
94. Kwak, H.-B., et al., *Simvastatin impairs ADP-stimulated respiration and increases mitochondrial oxidative stress in primary human skeletal myotubes*. *Free Radical Biology and Medicine*, (0).
95. novoprotein, *Recombinant Human Legumain/Asparaginyl Endopeptidase*, 2010.
96. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
97. Luan, Z., A.J. Chase, and A.C. Newby, *Statins Inhibit Secretion of Metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 From Vascular Smooth Muscle Cells and Macrophages*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003. **23**(5): p. 769-775.
98. Muehling, B., et al., *Effect of statin therapy on serum activity of proteinases and cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm*. *Vasc Health Risk Manag*, 2008. **4**(6): p. 1433-7.

99. Rahman, M.N.A.A., et al., *A Randomized Placebo Controlled Trial of the Effect of Preoperative Statin Use on Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases in Areas of Low and Peak Wall Stress in Patients Undergoing Elective Open Repair of Abdominal Aortic Aneurysm*. *Annals of Vascular Surgery*, 2011. **25**(1): p. 32-38.
100. Kim, M.C., et al., *Comparison of clinical outcomes of hydrophilic and lipophilic statins in patients with acute myocardial infarction*. *Korean J Intern Med*, 2011. **26**(3): p. 294-303.
101. Fujita, M., et al., *Pleiotropic effects of statins on cardiovascular events in the Japanese Coronary Artery Disease study*. *International Journal of Cardiology*, 2008. **129**(2): p. 294-296.
102. Johnson, J.L., et al., *Matrix Metalloproteinase (MMP)-3 Activates MMP-9 Mediated Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointima Formation in Mice*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011. **31**(9): p. e35-e44.
103. Shitara, Y. and Y. Sugiyama, *Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions*. *Pharmacol Ther*, 2006. **112**(1): p. 71-105.

Appendiks

CELLEDYR KING

RAW 264,7 dyrkingsmedium:

DMEM med 4 mM L-glutamin, 4,5 g/l glukose 500 ml

Natriumbicarbonat 10 ml

Føtalt bovint serum (FBS) 50 ml

Penicillin 10000 U/ml og streptomycin 10 mg/ml 5 ml

1 x PBS:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g

$\text{Na}_2 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 6 g

NaCl 8 g

dH₂O ad 1,0 l

Lysisbuffer (pH 5,8):

$\text{Na}_3 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM

$\text{Na}_2(\text{EDTA})$ 1 mM

N-oktyl- β -D-glukopyranosid 1 % (w/V)

ENZYM AKTIVITETSMÅLING

Legumain

Legumain-assaybuffer (pH 5,8):

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$, sitronsyre 39,5 mM

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

$\text{Na}_2(\text{EDTA})$ 1mM

CHAPS 0,01 %

DTT (tilsettes rett før bruk) 1 mM

Cathepsin B

Cathepsin B-assaybuffer (pH 5,5):

Natriumacetat 200 mM

Na₂EDTA 4 mM

DTT (tilsettes rett før bruk) 8 mM

Cathepsin B-substratløsning (68 µM):

1 mM Z-Arg-Arg-NH₂Mec (løst i DMSO) 2 ml

dH₂O 27,4 ml

Brij (0,1 %):

Brij 35 0,5 g

dH₂O 0,5 l

Hjelpeopløsning (8 mM DTT med 0,1 % Brij):

DTT (200 mM) 400 µL

Brij (0,1 %) 10 ml

TOTALPROTEINMÅLING

Coomassieopløsning (1:5):

Coomassiekonsentrat "Protein Assay Dye Reagent Concentrate" 10 ml dH₂O 40 ml

ZYMOGRAFI

Separerende gel 10 % (til 2 geler):

1,5 M Tris pH 8,8 3,25 ml

Acrylamid/Bis (monomer) 4,33 ml

SDS 10 % 130 µl

2 % gelatin 650 µl

dH₂O 4,58 ml

Ammoniumpersulfat (APS) 10 % 65 µl

TEMED 6,5 µl

Konsentrerende gel:

0,5 M Tris pH 6,8 2,5 ml
Acrylamid/Bis (monomer) 1,3 ml
SDS 10 % 100 µl
dH₂O 6,10 ml
APS 10 % 50 µl
TEMED 10 µl

“Sample” buffer:

0,5 M Tris pH 6,8 1 ml
SDS 10 % 1,6 ml
Glycerol 100 % 0,8 ml
Bromfenolblått 0,5 % 80 µl
dH₂O 520 µl

Inkuberingsbuffer (pH 7,6):

50 mM Tris 3 g
0,2 M NaCl 5,84 g
5 mM CaCl₂·2H₂O 0,37 g
0,02 % Brij (polyoxyetylen) 0,1 g
Justér pH til 7,6 med HCL eller NaOH

2,5 % Triton-x:

Triton X-100 2,5 ml
dH₂O 100 ml

Avfargingvæske:

50% MeOH
10% kons. Eddiksyre
60 % destillert vann

WESTERN BLOTTING

Blotto (100 ml):

5 g fettfri tørrmelk

10 ml T-TBS

Fyller opp med destillert vann til 100 ml

Oppskrift T-TBS (10 X)

20 mM Tris

150 mM NaCl

pH justeres til 7,5

0,1% Tween 20

Fortynnes til 1 X T-TBS ved bruk

Acetonfelling av proteinprøver :

- Beregn oppkonsentrering av prøver med aceton. Dette gjøres først ved å beregne mengde totalprotein i prøven som har lavest totalproteinmengde (f.eks. 25 µg/ml). Deretter beregner man det volumet man må ta ut av de andre prøvene for å få tilsvarende mengde totalprotein som i den førstnevnte prøven (25 µg/ml). Prøvevolumet blandes med 100 % iskald aceton i forholdet 1:5 i egne eppendorfrør.
- Vortex
- Inkuber i 1 time i -20 °C i fryser
- Sentrifuger i 20 min ved 15000G og 4 °C, og avpippeter supernatanten forsiktig
- Vask med 1 ml iskald aceton
- Sentrifuger i 10 min ved 15000G og 4 °C og avpippeter supernatanten forsiktig
- Tørk protein pelletten ca 20-30 min i romtemp (ikke overtørk)
- Tilsett 2 µl 0,5 M DTT (under avtrekk) og 13 µl vann. Kontroller at stoff er løst
- Tilsett 5 µl 4x Sample = totalvolum 20 µl
- Vortex
- Frys ved -20 °C fram til prøvene oppvarmes i 5 min ved 70°C rett før Western-analyse



Effects of atorvastatin on regulation of protease activities in macrophages

Anny Thi Tran, Robert Smith, Rigmor Solberg, Harald T. Johansen,

Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo, PO Box 1068 Blindern, Oslo

INTRODUCTION

Besides the established effects of statins on lowering plasma cholesterol, new studies indicate that the statins exhibit additional effects that could explain their therapeutic success (pleiotropic effects). Recently, it was shown that mRNA for the cysteine protease legumain was down-regulated in monocytes/macrophages from patients treated with atorvastatin. In the atherosclerotic plaque, transformed macrophages play a pivotal role in pathophysiology and legumain has previously been found to be upregulated in human unstable versus stable atherosclerotic plaques. The proteolytic machinery of macrophages is considered to be a critical factor in the progression of atherosclerosis. Here we present studies on the effects of atorvastatin on the regulation in macrophages of the cysteine proteases legumain and cathepsin B, as well as the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9.

METHODS

Murine RAW 264.7 macrophages (ATCC) were used as a cell model and stimulated with atorvastatin lactone (AL; 0-200 μ M) and/or mevalonolactone (ML; 50 μ M or 1 mM). Legumain and cathepsin B were analyzed by activity measurements using specific fluorogenic substrates and immunoblotting, whereas activities of MMP-2 and -9 were analyzed by zymography. Cell viability was measured by MTS-analyses.

Abbreviations: MTS, tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, AL; atorvastatin lactone, ML; mevalonolactone

RESULTS

Treatment with atorvastatin +/- mevalonate altered macrophage morphology

- Treatment with atorvastatin alone (0-100 μ M) reduced the total cell number and caused a change in cell morphology, which made them more circular
- Treatment with atorvastatin and mevalonate made the cells less circular, and showed a higher amount of attached cells (not shown)

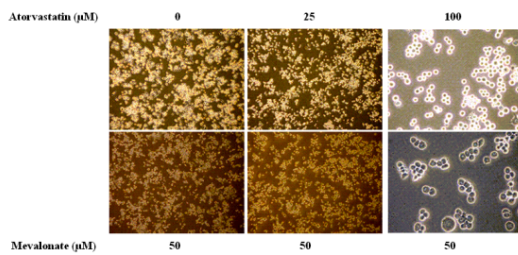


Figure 1. Stimulation of RAW 264.7 cells with AL (0, 25, 100 μ M) +/- 50 μ M ML for 24 hours. Magnification 4X or 20X.

Reduced cell viability after treatment with atorvastatin

- Atorvastatin caused some degree of reduced viability on RAW cells when exposed to atorvastatin with increasing concentrations
- Mevalonate 50 μ M and 1000 μ M showed prevented effects on cells treated with Atorvastatin up to 100 μ M ($p = 0.0205$ and $p = 0.0023$ respectively).

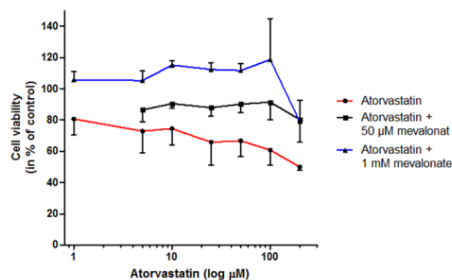


Figure 2. Cell viability measured by MTS. RAW cells were treated with 0-200 μ M atorvastatin. Cell viability were measured with MTS after 2 hours. (n=3)

Atorvastatin down-regulates activities and expressions of cysteine proteases

- Increasing concentrations of atorvastatin (AL 0-200 μ M) exhibited a dose-dependent reduction of both legumain (A) and cathepsin B (B) activities (IC₅₀ values in the range 170-190 μ M) in macrophages
- Addition of mevalonate (50 μ M or 1 mM) seemed not to prevent this effect

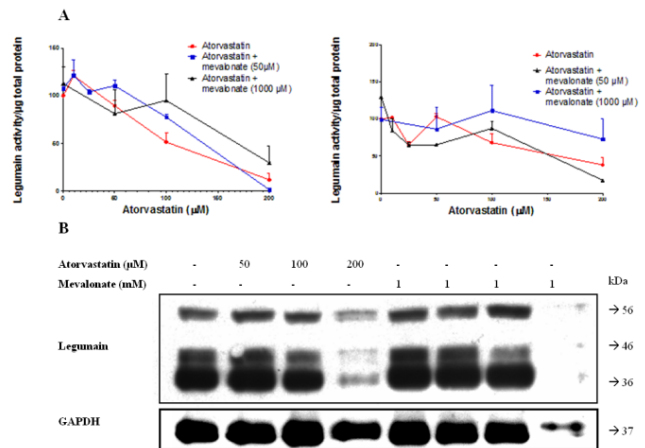


Figure 3. Activities and expressions of legumain and cathepsin B in RAW 264.7 cells, cultured in the presence of atorvastatin and/or mevalonate. RAW cells were treated with 0-200 μ M atorvastatin lactone. Activities of legumain (A) and cathepsin B (B) were measured and immunoblotting was performed (C). Concentrations of atorvastatin and mevalonate are indicated above each lane. (n=1-4)

Atorvastatin enhances the secretion of matrix metalloproteinase MMP-9

- Macrophages secreted increased levels of MMP-9 with increasing concentrations of atorvastatin (0-100 μ M) (A)
- No differences were observed for MMP-2 (A)
- No consistent effect of mevalonate was observed
- 50 μ M atorvastatin caused a 3-fold increase in MMP-9 secretion (B)

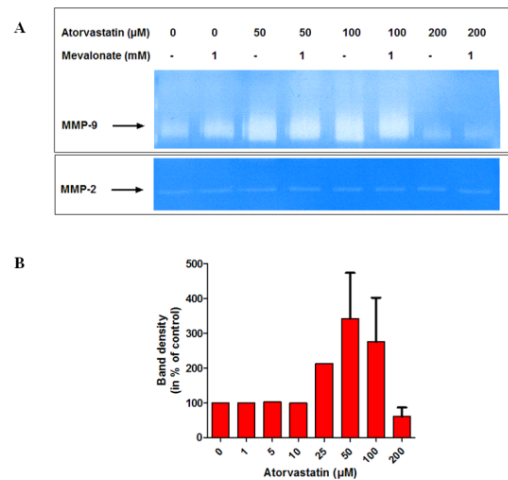


Figure 4. Secretion of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 from RAW 264.7 cells. Cells were treated with atorvastatin (0-200 μ M) for 4 days. A: zymography gels. B: band density in % of control. (n=1-2)

Conclusions

- ❖ Atorvastatin reduce legumain and cathepsin B activities; which could be an advantage in the context of atherosclerosis
- ❖ Surprisingly atorvastatin had an enhancing effect on MMP-9 secretion.
- ❖ Mevalonolactone partly reverse the negative effect of atorvastatin on cell viability